



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE DE COMPLEXOS NANOESTRUTURADOS FORMADOS
POR ÓXIDOS DE FERRO E SULFATO DE CONDROITINA**

LUIS MIGUEL RAMÍREZ RIVERA

2013

LUIS MIGUEL RAMÍREZ RIVERA

**SÍNTESE DE COMPLEXOS NANOESTRUTURADOS FORMADOS
POR ÓXIDOS DE FERRO E SULFATO DE CONDROITINA**

ORIENTADORA:

PROF^A. DR^A. MARIA APARECIDA GODOY SOLER

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BRASÍLIA, DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANBIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Luis Miguel Ramirez Rivera

Título:

**“SÍNTESE DE COMPLEXOS NANOESTRUTURADOS
FORMADOS POR ÓXIDO DE FERRO E SULFATO DE
CONDROITINA.”**

Comissão Examinadora:

Profª. Dra. Maria Aparecida Godoy Soler Pajanian
Presidente / Orientadora
UnB / IF

Prof. Dr. Paulo Eduardo Narciso de Souza
Interno Vinculado ao Programa
UnB / IF

Prof. Dr. Gustavo Braga Alcântara
Membro Titular Externo Não Vinculado ao Programa
IF / UFSCAR

Prof. Dr. Paulo Cesar de Moraes
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB / IF

Brasília, 27 de dezembro de 2013.

*À minha esposa e companheira Tathyana
e ao meu filho Theo, pela compreensão, pelo amor
incondicional e pela paciência durante estes
longos anos. Não há palavras que descrevam o
meu sentimento por vocês e a minha gratidão.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Aparecida Godoy Soler, pela sua confiança depositada em mim na realização não somente deste projeto, mas também de outros trabalhos; pela ótima orientação e conselhos tanto mais do que acadêmicos, e principalmente pela oportunidade de me permitir crescer neste meio científico totalmente novo a mim.

Ao Professor Dr. Leonardo Giordano Paterno, pelo vasto tempo cedido à mim para discussões principalmente sobre o trabalho, pela quantidade de ajuda imensurável no laboratório e pela confiança na participação de outros trabalhos.

À Professora Dra. Emília Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pelo apoio no projeto na realização das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À Prof. Dra. Maria José Araújo Sales, pela realização das análises termogravimétricas.

Ao Professor Dr. Osmino Júnior e ao técnico Adolfo do Laboratório de Toxinologia do Instituto de Biologia, por ter gentilmente realizado a liofilização das amostras.

Ao Coordenador e Professor Dr. Sebastião William da Silva, pelos ensinamentos e discussões técnico-científicos e administrativos.

À Professora Dra. Camila Messias, pelo apoio que muito me ajudou desde a minha chegada ao laboratório.

À Queila, pelo treinamento para a utilização tanto do espectrômetro FT-IR quanto do UV-Vis.

Ao Nilton Cláudio de Oliveira, pelo apoio nos laboratórios de química na realização da síntese e caracterização dos coloides produzidos.

À todos os meus colegas e ex-colegas do grupo pelo apoio na preparação deste trabalho: Ana Paula, Ariane Pandolfo, Jéssica Versiani, Nábyla Paixão, Natália Lemos, Jose de Souza Filho, Mosar Corrêa, Ana Lygia Câmara, Karen Rapp, Marcelo Parise e em especial à Camila Letti, que me acolheu na minha chegada a esta área que me era totalmente desconhecida, pelos ensinamentos de física e orientação técnica, pela companhia, amizade e discussões. Faço das suas palavras as minhas: “ainda temos um caminho a percorrer como uma equipe”.

À Kelly Cristina, da secretaria do Programa de Pós-Graduação, por todo o apoio administrativo, principalmente nos momentos finais da preparação deste trabalho.

Ao INCT Centro-Oeste e Norte de Nanobiotecnologia e à CAPES, por fornecerem os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

À FINATEC, pelo auxílio financeiro para participação em congresso internacional.

Finalmente, mas não menos importante, à minha família: a mis padres, Rafael y Irma, que independiente de la distancia, están siempre cerca y apoyándome en mis decisiones más difíciles y cruciales, ao meu irmão Rafael, meus avôs Aracy Guimarães Guitton e Roberto Henri Guitton (*in memoriam*) e sogros Ana

Lúcia e Givon, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim e à minha irmã Julhyana Guitton, por todo o apoio moral, familiar e científico.

E, claro, em especial à minha amada esposa, Tathyana, pelo seu amor, carinho e paciência incondicionais e surreais. Obrigado pelo apoio na superação dos nossos obstáculos não somente durante esta parte importante das nossas vidas, mas durante todo o tempo que nos conhecemos e que ainda temos pela frente; e ao meu querido filho Theo, também pela sua paciência inacreditável e alegria contagiante.

“The only place success comes before work is in the dictionary”

– Vince Lombardi

RESUMO

O objetivo deste projeto é sintetizar complexos nanoestruturados formados por óxidos de ferro e 4-sulfato de condroitina (4-SC). Dois métodos de síntese química foram empregados. No primeiro, nanopartículas de magnetita foram sintetizadas por meio da técnica de coprecipitação em meio aquoso, funcionalizadas com 4-sulfato de condroitina por meio da técnica de automontagem e em seguida dispersas em pH neutro. Na segunda rota de síntese, as nanopartículas de magnetita foram coprecipitadas na presença do 4-sulfato de condroitina e suspensas em meio aquoso com pH neutro. A espectroscopia Raman foi empregada para identificar a fase do óxido de ferro produzido, cujo resultado confirmou a síntese de magnetita. A análise dos espectros obtidos no infravermelho e dos dados de potencial zeta confirmaram a presença da cobertura de 4-sulfato de condroitina. Em adição, os resultados mostraram também diferenças no modo de interação do 4-SC com a superfície das partículas produzidas por meio dos diferentes métodos de síntese. Também foi realizado um monitoramento da estabilidade coloidal em meio biológico tais como a solução tampão fosfato (PBS) e meio de cultura DMEM.

ABSTRACT

The aim of this study is to produce nanostructured complexes of iron oxides and chondroitin-4-sulphate (C4S). Two synthesis routes were employed. On the first, magnetite nanoparticles were synthesized via the technique of coprecipitation in aqueous media, functionalized with chondroitin-4-sulphate via the layer-by-layer technique and then dispersed in neutral pH. On the second method, the magnetite nanoparticles were precipitated in the presence of chondroitin-4-sulphate and peptized in aqueous media with neutral pH. Raman spectroscopy was used to identify the iron oxide phase, confirming the synthesis of magnetite. The analysis of the infrared spectra and the data from zeta potential confirmed the presence of chondroitin-4-sulphate on the nanoparticles surface. In addition, the results indicated that the attachment of chondroitin-4-sulphate at the nanoparticle surface depends on the synthesis method. The colloidal stability was monitored in biological media, including phosphate buffer solution and DMEM culture medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1 – Ilustração dos momentos de dipolo magnético nos materiais diamagnéticos após a aplicação de um campo magnético.	26
Figura 2.1.2 – Ilustração dos momentos de dipolo magnético nos materiais paramagnéticos.	27
Figura 2.1.3 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolo magnético nos materiais ferromagnéticos.	27
Figura 2.1.4 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolo magnético nos materiais ferrimagnéticos.	27
Figura 2.1.5 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolo magnético nos materiais antiferromagnéticos.	28
Figura 2.1.6 – Ilustração de uma curva de histerese mostrando a magnetização de saturação (MS), a magnetização remanente (MR) e o campo coercivo (HC)	29
Figura 2.1.7 – Esquema de variação do campo coercivo H_c em relação ao diâmetro de partículas.	31
Figura 2.2.1 – Representação dos arranjos tetraédrico (roxo) e octaédrico (vermelho) e das posições dos átomos de oxigênio que formam a estrutura espinélio cúbica. As esferas azuis representam a posição dos íons de oxigênio, enquanto que as esferas A e B representam os cátions de ferro.	32
Figura 2.2.2 – Ilustração dos sítios octaédricos (vermelho) e tetraédrico (roxo) para a Fe_3O_4 . As esferas azuis representam os íons de oxigênio.	34

Figura 2.4.1 – Representação de duas nanopartículas com momentos magnético m alinhados, distância entre superfícies s e distância entre os centros r , com espessura de camada protetora δ	39
Figura 2.4.2 – Ilustração de um fluido magnético formado por nanopartículas dispersas em meio ácido, onde as setas representam os momentos magnéticos.	40
Figura 2.4.3 – Esquema de estabilidade de um FMI em função do pH. Em pH alcalino ($\text{pH} > 10$), as nanopartículas adquirem carga superficial $\Sigma < 0$, enquanto que em pH ácido ($\text{pH} < 6$) a carga superficial é $\Sigma > 0$, proporcionando forças repulsivas suficientes para o processo de peptização. Em pH em torno do ponto isoelétrico ($\text{pH} \cong 7,5$), $\Sigma \cong 0$ e as nanopartículas floculam.....	41
Figura 3.1.1 – Mecanismo de espalhamento de um fóton.	47
Figura 3.1.2 – Espectro Raman de magnetita. As bandas anti-Stokes ($\nu < 0$) e Stokes ($\nu > 0$) possuem arranjo simétrico com o centro em $\nu = 0 \text{ cm}^{-1}$. Adaptado de Shebanova e Lazor, 2003 ^[66]	48
Figura 5.1.1 – Estrutura molecular do 4-sulfato de condroitina e do 6-sulfato de condroitina.	62
Figura 5.1.2 – Protonação e desprotonação do (a) 4-sulfato de condroitina e (b) 6-sulfato de condroitina.	63
Figura 5.1.3 – Espectro FT-IR do sulfato de condroitina.....	64
Figura 5.1.4 – Análise termogravimétrica do sulfato de condroitina.	66

Figura 5.2.1 – (a) Imagem de MET obtida da amostra FMI. (b) Histograma de distribuição do diâmetro de nanopartículas da amostra FMB.	69
Figura 5.2.2 – (a) Imagem de MET obtida da amostra FMB. (b) Histograma de distribuição do diâmetro de nanopartículas da amostra FMB.	70
Figura 5.3.1 – Espectro Raman obtido das amostras SNI (preto) e SNA (laranja). Na parte inferior da figura, o ajuste obtido do espectro da amostra SNI utilizando funções lorentzianas.	72
Figura 5.3.2 – Espectro Raman obtido da amostra SNB, produto da síntese realizada na presença de 4-SC, e o respectivo ajuste com as funções lorentzianas.	73
Figura 5.3.3 – Espectros infravermelho obtido para as amostras SNA e SNB, conforme indicação.	74
Figura 5.3.4 – Ilustração do modelo proposto para a configuração da superfície das nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas com 4-SC por meio da técnica de automontagem (amostra FMA).	76
Figura 5.3.5 – Ilustração dos tipos de coordenação do grupo carboxílico com íons metálicos. No exemplo, o íon metálico é representado pelo ferro.....	77
Figura 5.3.6 – Ilustração do modelo proposto para a coordenação entre o 4-SC e as nanopartículas sintetizadas com 4-SC <i>in situ</i> (amostra SNB).	78
Figura 5.3.7 – Curvas termogravimétricas obtidas das nanopartículas sintetizadas com sulfato de condroitina <i>in situ</i> (SNB) e sem cobertura (SNI).	80

Figura 5.4.1 – Imagens obtidas no monitoramento da estabilidade coloidal dos FMs produzidos. Para cada coluna relativa ao tipo de FM, o primeiro tubo à esquerda é o FM puro, o segundo é o FM diluído em meio de cultura DMEM e o terceiro tubo é o FM diluído em tampão fosfato. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.1 – Modos Raman atribuídos à magnetita <i>bulk</i> ^[66]	49
Tabela 5.1.1 – Bandas vibracionais e respectivas origens observadas no sulfato de condroitina.....	65
Tabela 5.1.2 – Estágios de decomposição térmica dos sulfato de condroitina.....	66
Tabela 5.2.1 – Concentrações de ferro obtidas para as amostras sintetizadas.	68
Tabela 5.2.2 – Diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ das amostra sintetizadas.....	69
Tabela 5.2.3 – Diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas obtido por MET....	70
Tabela 5.3.1 – Modos vibracionais observados nas nanopartículas sintetizadas.....	73
Tabela 5.3.2 – Posição das bandas dos espectros infravermelho apresentados nas Figuras 5.1.3 e 5.3.3 das amostras sintetizadas e do sulfato de condroitina. $\Delta\nu$ é o deslocamento da banda em relação à posição no espectro da 4-SC. Dados extraídos dos espectros obtidos.	76
Tabela 5.3.3 – Estágios de decomposição térmica das amostras sintetizada.....	79
Tabela 5.4.1 – Análise da sedimentação e separação de fases dos coloides produzidos a partir das imagens apresentadas na Figura 5.4.1.	82
Tabela 5.4.2 – Diâmetro hidrodinâmico das amostras obtidas na análise de estabilidade.	83

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

4-SC	4-Sulfato de Condroitina
6-SC	6-Sulfato de Condroitina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSA	Ácido dimercaptossuccínico
EDL	Espalhamento Dinâmico de Luz
FM	Fluído Magnético
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GAG	Glicosaminoglicano
LbL	<i>Layer-by-layer</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NPM	Nanopartícula magnética
OA	Osteoartrite
PBS	Tampão fosfato salino
PEI	Poli(Etilenoimna)
PEO-PGA	Polietilenoglicol-Ácido Poliglutâmico
RPM	Rotações por Minuto
SC	Sulfato de Condroitina
SP	Superparamagnetismo
SPIO	Óxido de ferro superparamagnético
SPION	Nanopartícula de óxido de ferro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPRIEDADES E SÍNTESE DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS	24
2.1 MAGNETISMO.....	24
2.1.1 Superparamagnetismo	30
2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO	32
2.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO	34
2.4 ESTABILIZAÇÃO DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS	37
2.4.1 Interações atrativas	38
2.4.2 Interações repulsivas.....	40
2.4.3 Métodos de estabilização de FMs	42
3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	44
3.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	44
3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	49
3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	51
3.4 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ.....	52
3.5 ANÁLISE TÉRMICA.....	54
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	56
4.1 MATERIAIS.....	56
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SULFATO DE CONDROITINA.....	57

4.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS MAGNÉTICOS.....	57
4.3.1 Síntese A: Obtenção do FM através da técnica de automontagem	58
4.3.2 Síntese B: Obtenção de FM através de síntese direta	59
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS PRODUZIDOS	60
4.5 ESTABILIDADE DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS.....	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SULFATO DE CONDROITINA.....	62
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS	67
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SÓLIDOS NANOPARTICULADOS.....	71
5.4 ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS EM MEIO BIOLÓGICO.	80
6 CONCLUSÃO	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da nanotecnologia requer um conhecimento multidisciplinar e envolve a pesquisa e o desenvolvimento de materiais que apresentem pelo menos uma das suas dimensões em escala nanométrica (na faixa de 1 a 100 nm)^[1]. Devido à baixa dimensionalidade, os nanomateriais possuem uma redução da simetria translacional de longo alcance e uma grande razão área superficial-volume, em consequência, suas propriedades ópticas, elétricas, mecânicas, químicas e magnéticas tornam-se dependentes das dimensões, e são diferentes das apresentadas pelo mesmo material em escala macroscópica^[2, 3]. Por exemplo, os óxidos de ferro nanoparticulados apresentam comportamento superparamagnético, e são chamados de óxidos de ferro superparamagnéticos, representados por SPIO (do inglês *superparamagnetic iron oxides*)^[2]. O superparamagnetismo é um fenômeno similar ao paramagnetismo, onde os materiais perdem a sua magnetização quando o campo magnético é removido, no entanto, sua magnetização de saturação é muito maior.

A produção de nanomateriais tem se intensificado na última década, e graças ao desenvolvimento da química de coloides, dos processos de funcionalização da superfície dos nanocristais, das técnicas de automontagem e das sofisticadas técnicas de caracterização, é possível fabricar estruturas com dimensões próximas às de células, vírus, proteínas e até de genes^[2, 4-6]. Como exemplo, pode-se citar as nanopartículas magnéticas, os lipossomas, as nanocápsulas, as nanoesferas e os nanotubos de carbono, a maioria deles de interesse para a área biomédica. Entre as partículas magnéticas, os óxidos de ferro de estrutura espinélio cúbica e ordenamento ferrimagnético apresentam comportamento superparamagnético e biocompatibilidade, não sendo tóxicas, propriedades que as credenciam para

aplicações em nanomedicina. A partir desses nanocristais, é possível construir plataformas dispersas em meio líquido, que, uma vez no organismo, podem ser guiadas por um gradiente de campo magnético aplicado, ou por meio de reconhecimento biológico, para atingir um alvo no organismo. As aplicações biomédicas mais promissoras na área de diagnóstico são a melhora de contraste nos exames por ressonância magnética e os biosensores; enquanto que como terapia tem-se a magnetohipertermia, terapia gênica (*magnetofection*) e veículos carreadores de droga (*drug delivery*), com propriedades de liberação controlada de drogas^[4, 7-14]. As drogas podem ter liberação controlada por meio de estímulos químicos, físicos ou biológicos. Em adição, esses sistemas de liberação de drogas apresentam melhor estabilidade e maior taxa de absorção pelos tecidos biológicos e especificidade, resultando na diminuição de efeitos colaterais^[15]. Algumas aplicações, como o aumento do contraste em exames de ressonância magnética, já são utilizados em humanos. Como aplicações *in vitro* pode-se citar as técnicas de separação magnética de alta precisão. Em adição tem-se as aplicações tecnológicas tais como memórias^[16], sensores químicos^[17], transformadores^[18], entre outros.

Dentre os óxidos de ferro nanoparticulados, a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$) são as mais estudadas para aplicações biomédicas. Quando as nanopartículas magnéticas (NPMs) são dispersas em meio líquido, é obtido um coloide estável chamado de fluido magnético (FM), ferrofluido ou nanofluido. Se o FM é colocado sob ação de um campo magnético externo, o sistema age macroscopicamente como uma única fase líquida^[19]. Cada uma das aplicações nas diferentes áreas requerem nanopartículas com características físicas e químicas específicas, como o formato, dimensão, morfologia, carga superficial, grupos funcionais e estabilidade em meios polares ou apolares. Essas características são

controladas durante a fase de fabricação do complexo magnético. O complexo é formado pela nanopartícula magnética (núcleo) com a superfície funcionalizada. Na preparação desses sistemas biológicos híbridos, utilizam-se normalmente nanopartículas magnéticas, com diâmetros inferiores a 15 nm, que são funcionalizadas com moléculas biocompatíveis, as quais desempenham dois papéis fundamentais na preparação desses fluidos: i) conferir às partículas um mecanismo para promover a estabilidade coloidal e ii) servir como agente de acoplamento para a imobilização de biomoléculas passíveis de reconhecimento por receptores específicos. Por exemplo, no caso das aplicações biomédicas, a cobertura deve apresentar sítios disponíveis para ancorar drogas, anticorpos, marcadores, entre outros. Em adição, a cobertura também deve evitar que o complexo seja facilmente reconhecido pelo sistema reticuloendotelial, permanecendo mais tempo na corrente sanguínea, no caso de aplicações *in vivo*. As propriedades estruturais, químicas, magnéticas e biocompatibilidade do complexo são características do núcleo, enquanto que a cobertura, além de ser biocompatível, é responsável pela estabilidade e disponibilidade de sítios para o ancoramento de entidades biológicas, dependendo da aplicação específica.

Entre os processos de preparação do complexo magnético, este pode ser sintetizado na presença do surfactante, por exemplo um polímero em meio aquoso ou outra molécula, obtendo-se o núcleo com a superfície tratada em uma única etapa, e depois disperso em meio aquoso ou apolar. No caso de aplicações em biomedicina, caso o núcleo já funcionalizado seja sintetizado em meio apolar deverá ocorrer a troca de ligante para posterior dispersão em meio aquoso. Em outra técnica, o núcleo de óxido de ferro pode ser sintetizado em meio aquoso, seguido do tratamento superficial e dispersão em meio polar. Entre os materiais biológicos mais

utilizados para a funcionalização de sistemas SPIO estão o DMSA (ácido dimercaptossuccínico), citrato, dextran, entre outros polímeros^[20]. Dada a grande disponibilidade de biopolímeros, as SPIONs com cobertura polimérica, também chamadas de nanocompósitos, são adequadas para aplicações biomédicas *in vivo*, pois exibem os benefícios de uma alta magnetização de saturação, superparamagnetismo, estabilidade coloidal e alta biocompatibilidade devido à sua baixa toxicidade tanto no nível celular quanto fisiológico^[6].

Para o tratamento superficial das nanoestruturas sintetizadas, pode ser acoplado um polímero por meio da técnica de automontagem camada por camada, ou LbL (do inglês, *layer-by-layer*). Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para encapsulamento de SPIONs, seja para a formação de estruturas planares^[21] ou esféricas (cápsulas)^[22]. Em uma abordagem simples, a técnica consiste na adsorção de polieletrólitos ou NPs de cargas opostas através de interações eletrostáticas^[21], produzindo complexos com mono ou multicamadas, podendo encapsular uma grande carga de drogas. Em adição, essas cápsulas podem ser preparadas com propriedades específicas dependendo da aplicação^[23]. Estes complexos com polieletrólitos e nanomateriais magnéticos podem responder a variações do pH do meio, adequados ao papel de carreadores de drogas. A técnica de automontagem permite um controle a nível molecular, bem como a deposição de monocamadas, sendo uma técnica de alta precisão e preparação relativamente simples^[24]. A técnica tem sido utilizada para a produção de nanopartículas de maghemita cobertas com poli(etilenoimna) (PEI) e polietilenoglicol-ácido poliglutâmico (PEO-PGA) para a produção de carreadores^[22].

Um dos polímeros biocompatíveis que tem atraído bastante interesse ultimamente é o sulfato de condroitina (SC)^[25-33]. O SC é um componente importante

da matriz extracelular da cartilagem e é conhecido pela sua ação anti-inflamatória e pela produção de *syndecan*, receptor celular que interage com proteínas de adesão, células e com a matriz extracelular^[34, 35]. O SC é um glicosaminoglicano (GAG) polieletrólito aniônico natural que consiste em unidades repetitivas dos dissacarídeos ácido D-glucoronico e N-acetilgalactosamina, sendo sulfatado na posição 4- ou 6-, obtendo o nome de 4-sulfato de condroitina (4-SC) ou 6-sulfato condroitina (6-SC).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados compõem um grupo de polissacarídeos lineares presentes na matriz extracelular dos tecidos humanos^[36]. Juntamente com os GAGs não-sulfatados, são responsáveis pelas principais propriedades físico-químicas dos diferentes tipos de matrizes extracelulares dos tecidos, contribuindo principalmente para a rigidez e resiliência, mantendo, ao mesmo tempo, a capacidade de retenção intersticial de água^[37]. Quando purificados, possuem uma grande variedade de aplicações farmacológicas e cosméticas. Exemplos de GAGs são o ácido hialurônico, que é utilizado na recuperação de cartilagens^[38] e como modulador da cicatrização^[39]; a heparina, que é muito empregada como agente anticoagulante, e o SC, que, por possuir propriedades hidrofílicas que permitem à cartilagem absorver grandes quantidades de água e, portanto, absorver forças compressivas, pode ser utilizado como pele artificial^[34, 40]. O SC ganhou popularidade nos anos recentes como potencial agente terapêutico para a osteoartrite (OA)^[34].

A OA é uma doença articular crônica, progressiva e degenerativa que é particularmente comum nas articulações que suportam peso, sendo considerada um problema de saúde pública^[34]. Em resposta à demanda por terapias mais eficientes para a OA, vários fármacos têm sido pesquisados, incluindo o uso do SC^[41]. Um estudo recente demonstrou a eficácia de uma dose de SC intra-articular para o

tratamento da OA em equinos^[42]. Em adição, estudos de aplicações do SC realizados *in vitro*^[41, 43] também obtiveram sucesso com a terapia para a OA.

Na literatura existem poucos trabalhos sobre materiais nanoparticulados relacionados com o SC, tais como a síntese de nanopartículas magnéticas (NPMs) em solução de SC e a produção de nanoestruturas de vários formatos de ouro ou prata^[44-46]. Por exemplo, Wilson e colaboradores produziram nanobastões de ouro nos quais moléculas de 4-SC foram acopladas por meio do processo de automontagem via atração eletrostática^[45]. Mais especificamente, estudos envolvendo partículas SPIO foram desenvolvidos por Aoyagi e colaboradores, que prepararam um coloide composto por nanopartículas de magnetita funcionalizadas com 4-SC^[44]. Para obter o coloide, a síntese foi realizada na presença do SC. Os autores constataram que, quanto maior a proporção de Fe^{2+}/Fe^{3+} , menor é o tamanho das nanopartículas. Recentemente, Guilherme e colaboradores desenvolveram um hidrogel com nanoesferas de magnetita contendo 4-SC com a ajuda de um carreador (metacrilato de glicídio)^[46]. Entretanto, não foram encontrados trabalhos que estudassem a toxicidade desses sistemas nanoestruturados com SC e sua influência nos sistemas biológicos.

Neste contexto, este projeto propõe a preparação de biocomplexos magnéticos de óxidos de ferro por meio de duas rotas de síntese diferentes e o estudo da estabilidade dos dois coloides em meio biológico. Em um dos métodos empregados, as partículas de SPIO foram precipitadas na presença de 4-SC; enquanto no segundo, a superfície das partículas SPIO foi funcionalizada com 4-SC por meio da técnica de automontagem. Foi realizada também a avaliação da estabilidade em meio biológico dos complexos produzidos.

A dissertação está organizada da seguinte forma: o Capítulo 2 descreve os conceitos de materiais magnéticos, óxidos de ferro nanoparticulados e suspensões coloidais, assim como as técnicas de síntese. No Capítulo 3, são abordadas as técnicas de caracterização de suspensões coloidais e sólidos nanoparticulados que foram produzidos no decorrer deste projeto. No Capítulo 4, os procedimentos experimentais estão descritos. No Capítulo 5, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. As conclusões são apresentadas no Capítulo 6.

2 PROPRIEDADES E SÍNTESE DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS

2.1 MAGNETISMO

As propriedades magnéticas dos materiais provêm do movimento dos elétrons, em forma de movimento orbital e angular, gerando um momento magnético^[47]. Desta forma, todo material pode apresentar propriedades magnéticas, entretanto, são considerados materiais magnéticos aqueles que possuem comportamento ferromagnético ou ferrimagnético^[48]. Os elétrons que contribuem para o momento magnético do material são aqueles desemparelhados ou presentes nas camadas incompletas, como a 3d nos elementos de transição (ferro, cobalto e níquel) e a 4f, nas terras-raras^[47].

A indução magnética \vec{B} é definida como a resposta do material na presença de um campo magnético \vec{H} e é dada por:

$$\vec{B} = \mu \vec{H} \quad (2.1.1)$$

onde μ é a permeabilidade do meio. É importante notar que μ não é constante para cada material, apesar de que em alguns casos a variação seja pequena. Entretanto, no vácuo, \vec{B} é uma função linear de \vec{H} , portanto:

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H} \quad (2.1.2)$$

onde μ_0 é a permeabilidade no vácuo ($4\pi \times 10^{-8}$ H/m).

Quando os momentos magnéticos individuais associados aos elétrons em um material sólido homogêneo e isotrópico estão alinhados, o material apresenta magnetização (\vec{M}), definida como o momento magnético (\vec{m}) por unidade de volume (V):

$$\vec{M} = \frac{\vec{m}}{V} \quad (2.1.3)$$

A magnetização aumenta à medida que os momentos magnéticos se alinham na mesma direção até atingir a saturação, chamada de magnetização de saturação (M_S), onde todos os momentos magnéticos encontram-se alinhados. Como a própria magnetização do material contribui para a indução magnética, a equação 2.1.2 pode ser reescrita relacionando \vec{B} , \vec{H} e \vec{M} :

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M}) \quad (2.1.4)$$

onde $\mu_0\vec{H}$ é a indução gerada pelo campo \vec{H} , e $\mu_0\vec{M}$ é a indução adicional proveniente do magnetismo do material.

O comportamento magnético dos materiais pode ser classificado de acordo com o arranjo dos seus momentos de dipolo magnético quando estão na presença ou não de um campo magnético. A susceptibilidade magnética (χ) indica a resposta do material a um campo magnético \vec{H} , e é dada por:

$$\chi = \frac{\vec{M}}{\vec{H}} \therefore \vec{M} = \vec{H}\chi \quad (2.1.5)$$

Quando um material possui susceptibilidade magnética negativa ($\chi < 0$), ele é classificado como diamagnético. Se a susceptibilidade for positiva, mas muito pequena em relação à dos materiais ordenados, o material é chamado

paramagnético. Os materiais ordenados podem ser ferromagnéticos, ferrimagnéticos ou antiferromagnéticos.

Os materiais diamagnéticos, na ausência de um campo externo aplicado, não apresentam magnetização, uma vez que os elétrons encontram-se emparelhados com os spins antiparalelos. A formação do momento de dipolo nesses materiais ocorre somente quando são submetidos a um campo externo, o que ocasiona uma variação temporária do movimento orbital. Quando um campo magnético \vec{H} é aplicado, os momentos se alinham em direção oposta à do campo aplicado e a suscetibilidade é negativa. Este comportamento é ilustrado na Figura 2.1.1.

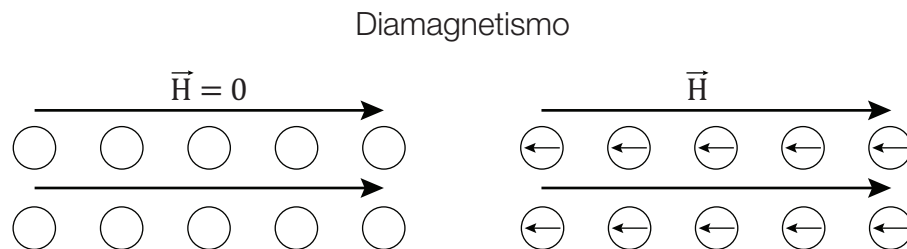


Figura 2.1.1 – Ilustração dos momentos de dipolo magnético nos materiais diamagnéticos após a aplicação de um campo magnético.

Os materiais paramagnéticos, possuem momento magnético por átomo diferente de zero. Na ausência de campo magnético, os momentos magnéticos individuais encontram-se orientados aleatoriamente; entretanto, quando um campo magnético é aplicado, ocorre um alinhamento dos momentos magnéticos na direção do campo, induzindo uma magnetização \vec{M} paralela ao campo e, portanto, uma suscetibilidade positiva. Uma ilustração deste fenômeno é apresentada na Figura 2.1.2. Apesar de possuir susceptibilidade positiva, a sua ordem de grandeza é pequena.

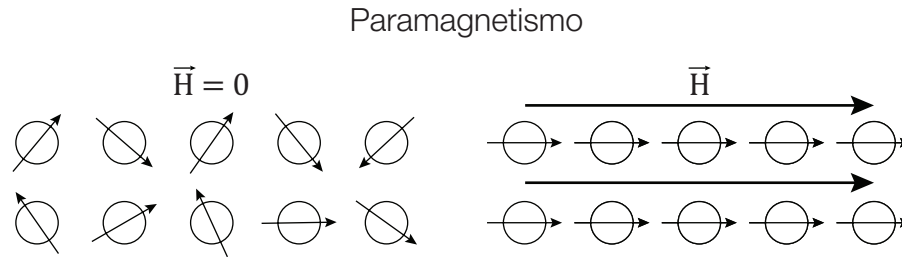


Figura 2.1.2 – Ilustração dos momentos de dipolo magnético nos materiais paramagnéticos.

Dentre os materiais ordenados, os ferromagnéticos são aqueles que possuem magnetização espontânea abaixo da temperatura de Curie (T_C). Acima da temperatura T_C , a magnetização espontânea é nula, uma vez que a energia térmica é suficiente para desordenar os momentos magnéticos. O arranjo dos momentos de dipolo magnéticos destes matérias é ilustrado na Figura 2.1.3.

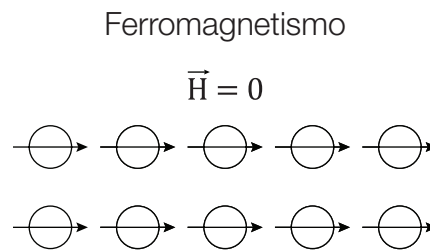


Figura 2.1.3 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolo magnético nos materiais ferromagnéticos.

Nos materiais ferrimagnéticos, a magnetização espontânea é formada por momentos magnéticos antiparalelos de diferentes magnitudes, conforme ilustra a Figura 2.1.4.

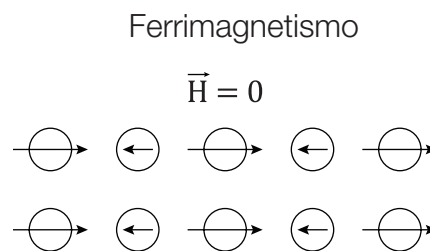


Figura 2.1.4 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolo magnético nos materiais ferrimagnéticos.

Nos materiais antiferromagnéticos, quando na ausência de um campo magnético, os dipolos magnéticos, de mesma intensidade, encontram-se alinhados antiparalelamente, resultando em uma magnetização nula. Este fenômeno é ilustrado na Figura 2.1.5.

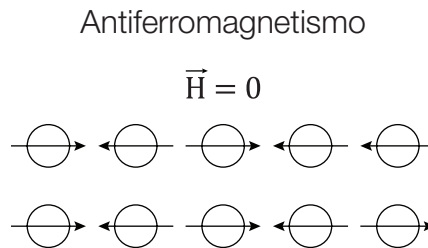


Figura 2.1.5 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolo magnético nos materiais antiferromagnéticos.

No estudo desses materiais, a magnetização \vec{M} ou indução magnética \vec{B} do material é estudada na presença de um campo magnético externo \vec{H} , originando a curva de magnetização (ou curva de histerese), onde \vec{M} ou \vec{B} são representados em função de \vec{H} .

A Figura 2.1.6 mostra uma curva de magnetização típica para um material ferromagnético, cujo comportamento da magnetização (M) em função do campo magnético aplicado (H) pode ser descrito como: iniciando-se com o material desmagnetizado ($M = 0$), à medida que o campo aumenta, a magnetização induzida aumenta gradativamente até atingir a magnetização de saturação ($M = M_S$). Observa-se que mesmo quando o campo magnético é removido, o material apresenta uma magnetização remanente (M_R). Invertendo-se o sinal do campo magnético aplicado, a magnetização do material é reduzida até chegar a zero. O campo necessário para anular a magnetização é chamado de campo coercivo (H_C). O comportamento se repete se o campo, no sentido inverso, continuar crescendo, até se obter novamente a M_S .

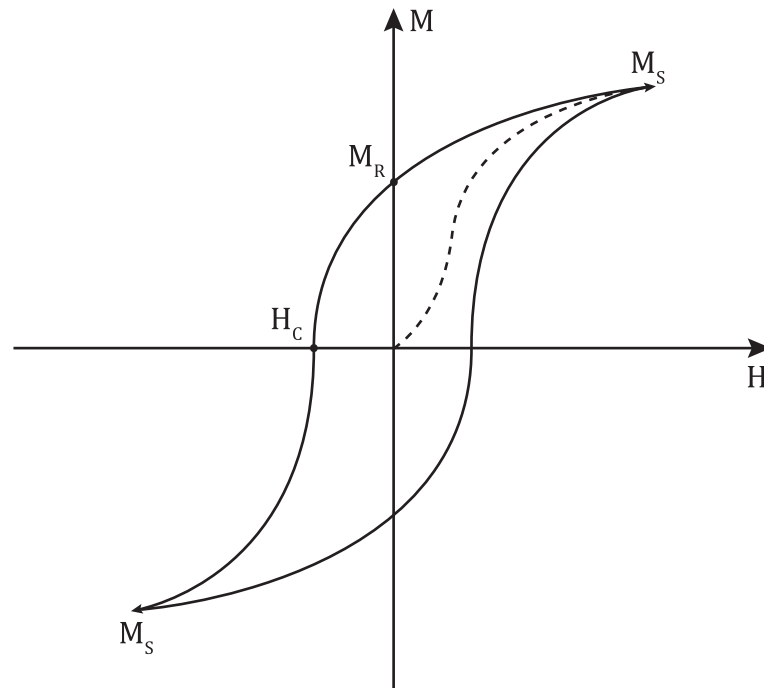


Figura 2.1.6 – Ilustração de uma curva de histerese mostrando a magnetização de saturação (M_S), a magnetização remanente (M_R) e o campo coercivo (H_C).

Dependendo da coercividade do material, este pode ser classificado como magneticamente duro ou macio. Basicamente, um material com grande H_C é chamado de duro (ímãs permanentes, como os de geladeiras), enquanto o material com baixa H_C é chamado de macio (ímãs magnetizados e desmagnetizados facilmente).

Cada uma dessas regiões apresenta, numa primeira aproximação, momentos magnéticos alinhados em diferentes direções. Dessa forma, quando um campo é aplicado, os limites entre esses domínios – as paredes de domínios – movimentam-se, proporcionando uma mudança na magnetização do material, fazendo com que os domínios se orientem na direção do campo magnético aplicado^[49]. Quando o tamanho de um material ferromagnético é reduzido, uma configuração energética favorável composta por multidomínios não é mais viável, formando-se um monodomínio, com propriedades que não são apresentadas pelo mesmo material

em sua forma macroscópica. Este comportamento, denominado de superparamagnético, será apresentado a seguir.

2.1.1 Superparamagnetismo

Descoberto por Elmore em 1938 por meio do estudo de uma suspensão coloidal de partículas de Fe_3O_4 ^[50], o superparamagnetismo é um fenômeno que ocorre apenas em baixa dimensionalidade. Este fenômeno é similar ao paramagnetismo, no sentido em que o material apresenta magnetização nula na ausência de um campo externo, entretanto, a sua magnetização de saturação é muito maior, em torno de 10^2 a 10^4 vezes o momento magnético do elétron^[51].

Considerando-se partículas esféricas, a coercividade (H_C) do material depende do seu tamanho. Quando o diâmetro da partícula se reduz, a coercividade aumenta, atingindo um máximo no limite da passagem de multidomínio para monodomínio. Na região de multidomínios, a magnetização varia de acordo com o movimento das paredes de domínio. No limite de multidomínios para monodomínios, representado pelo diâmetro crítico D_C , a coercividade atinge um máximo, seguido de uma tendência à zero ao atingir o limite do superparamagnetismo (SP)^[52], conforme a Figura 2.1.7. O diâmetro crítico (D_C) é dado pela expressão^[53]:

$$D_c = \frac{2A^{1/2}}{M} \quad (2.1.6)$$

onde A é a constante de troca e M é o momento magnético do material por unidade de volume. Este diâmetro encontra-se normalmente na faixa entre 10 e 20 nm^[2].

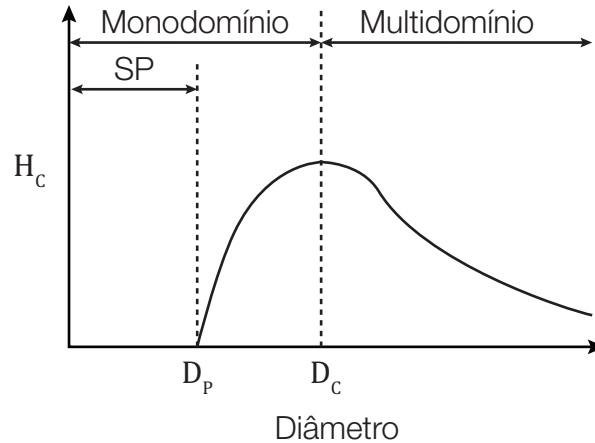


Figura 2.1.7 – Esquema de variação do campo coercivo H_c em relação ao diâmetro de partículas.

No regime superparamagnético, uma vez que não existem paredes de domínios para se moverem, a reversão da magnetização ocorre devido à rotação do momento magnético. Essa rotação espontânea é possível graças à energia térmica presente nos materiais, que induz flutuações nos momentos magnéticos com um determinado tempo de relaxação (τ_N) definido por Néel^[54], que representa o tempo que o momento magnético leva para se reorientar e é dado por:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_{ef}V}{k_B T}} \quad (2.1.7)$$

em que τ_0 assume valores entre 10^{-11} a 10^{-9} segundos, $K_{ef}V$ é a energia da barreira magnetocristalina e $k_B T$ é a energia térmica. Quando a energia térmica excede a energia da barreira, a energia térmica é suficiente para induzir a flutuação no momento magnético.

Nos materiais superparamagnéticos, como a condição de flutuação dos spins depende da energia térmica, existe uma temperatura crítica, chamada de temperatura de bloqueio (T_B) que define o ponto no qual, acima dessa temperatura, ocorre a flutuação espontânea dos spins e o material apresenta uma curva de magnetização sem histerese. Abaixo da temperatura de bloqueio, porém, o material

apresenta magnetização remanescente (M_R), uma vez que a energia térmica não é mais suficiente para superar a energia da barreira magnetocristalina.

2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO

As ferritas cúbicas superparamagnéticas, como maghemita, magnetita e ferrita de cobalto, apresentam estrutura do tipo espinélio e formam monodomínios com diâmetros que variam entre 5 e 20 nm. Na estrutura de espinélio cúbica, os íons de oxigênio ocupam posições que correspondem a uma estrutura cúbica de fase centrada (CFC) e os cátions bivalentes e trivalentes distribuem-se entre os átomos de oxigênio e formam os sítios tetraédricos (sítio A) e os octaédricos (sítio B), conforme a ilustração da Figura 2.2.1. A célula unitária da estrutura espinélio possui aresta de aproximadamente 8 Å e contém 32 íons de oxigênio, gerando 64 interstícios de simetria tetraédrica e 32 de simetria octaédrica, entretanto, apenas 8 sítios tetraédricos e 16 sítios octaédricos são ocupados pelos cátions.

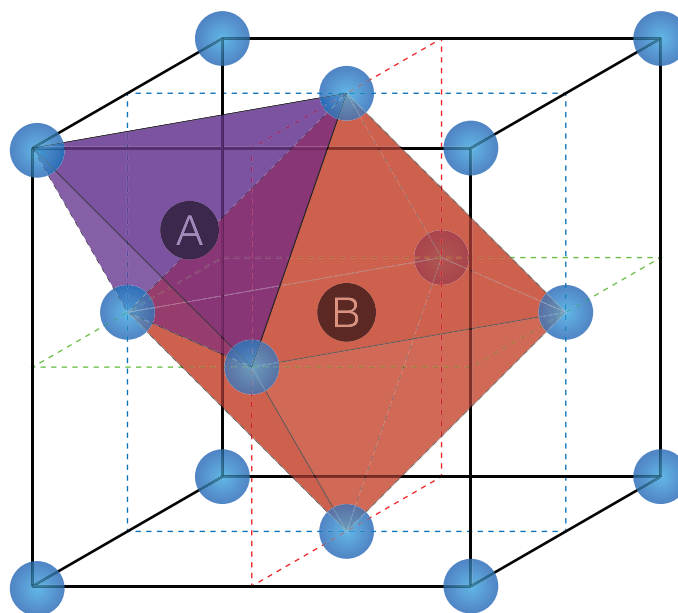


Figura 2.2.1 – Representação dos arranjos tetraédrico (roxo) e octaédrico (vermelho) e das posições dos átomos de oxigênio que formam a estrutura espinélio cúbica. As esferas azuis representam a posição dos íons de oxigênio, enquanto que as esferas A e B representam os cátions de ferro.

As ferritas cúbicas apresentam estruturas cristalinas e composições variadas, podendo ser representadas por:



onde o primeiro termo, entre parênteses, representa o sítio A (tetraédrico) e o segundo, entre colchetes, o sítio B (octaédrico); M um cátion metálico de valência 2+ e δ indica o grau de inversão, onde $\delta = 1$ para estrutura normal, $\delta = 0$ para espinélio inversa e $0 < \delta < 1$ para estrutura mista. Quando $M = Fe$, tem-se um óxido puro.

Segundo a distribuição dos cátions, a estrutura espinélio pode ser classificada como normal (direta), inversa ou mista. Se todos os íons M^{2+} se encontrarem nos sítios tetraédricos e todos os íons Fe^{3+} nos sítios octaédricos, é chamada de estrutura espinélio normal ($\delta = 1$). Como exemplo de ferritas com estrutura espinélio normal, pode-se citar a ferrita de zinco ($ZnFe_2O_4$) e a de manganês ($MgFe_2O_4$). Quando metade dos cátions de Fe^{3+} se localizam no sítio tetraédrico e a outra metade mais os íons M^{2+} no sítio octaédrico, a estrutura é chamada de espinélio inversa ($\delta = 0$). Exemplos de ferritas de estrutura de espinélio inverso são a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma - Fe_2O_3$).

Na magnetita, os átomos de oxigênio formam uma rede cúbica de face centrada com os átomos de ferro ocupando os sítios intersticiais^[55]. Os sítios tetraédricos são ocupados por íons Fe^{3+} e os sítios octaédricos são ocupados por um Fe^{3+} e um Fe^{2+} , conforme a ilustração apresentada na Figura 2.2.2. Os momentos magnéticos de spin dos íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} dos sítios octaédricos se alinham antiparalelamente ao momento magnético de spin do íon de Fe^{3+} do sítio tetraédrico, o que leva a um cancelamento dos momentos magnéticos dos íons Fe^{3+} .

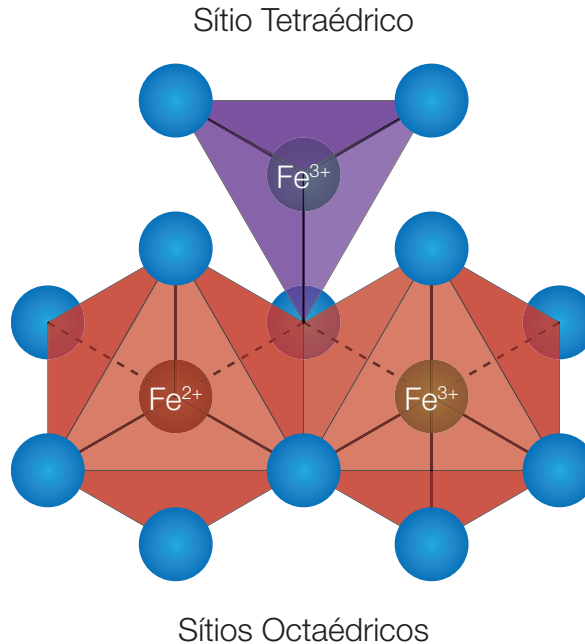


Figura 2.2.2 – Ilustração dos sítios octaédricos (vermelho) e tetraédrico (roxo) para a Fe₃O₄. As esferas azuis representam os íons de oxigênio.

Apesar de a maghemita apresentar também estrutura cristalina do tipo espinélio inversa igual à magnetita, esta possui apenas Fe³⁺ como cátion. A maghemita é obtida por meio de um processo de oxidação da magnetita. Essa oxidação pode ocorrer de forma natural devido à exposição ao ambiente, ou pode ser acelerada devido a tratamentos térmicos. Nas nanopartículas de magnetita, o processo natural de oxidação é mais acelerado devido à grande área superficial.

2.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO

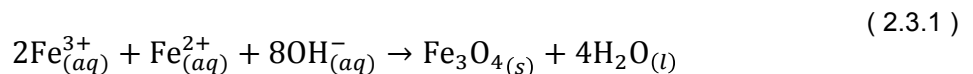
Vários métodos são utilizados para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro, podendo ser físicos ou químicos. Por exemplo, pode-se chegar a nanopartículas partindo de micropartículas que são submetidas a um processo de moagem na presença de um surfactante, obtendo-se um FM estável. Entre os métodos mais empregados pode-se citar o sonoquímico, sol-gel, microemulsão,

coprecipitação e decomposição térmica de precursores organometálicos ou de compostos de coordenação.

As diversas aplicações exigem materiais nanoparticulados com características específicas tais como tamanho, morfologia, distribuição de tamanho uniforme, solubilidade em meios aquosos ou orgânicos, entre outras. Essas características são controladas durante a síntese das nanopartículas e do FM.

Quando as nanopartículas de óxidos de ferro são sintetizadas por meio do método de coprecipitação, pode-se obter um controle razoável da morfologia, tamanho, distribuição, composição, cristalinidade e propriedades físicas^[56]. Em adição, é possível fabricar grandes quantidades por meio desta técnica, a custo relativamente baixo. O método foi introduzido em 1973 por Khalafalla e Reimers e consiste na mistura de sais inorgânicos em ambiente aquoso seguido de precipitação através de reação de hidrólise alcalina^[57]. Em 1981, Massart obteve nanopartículas de magnetita dispersas em solventes polares sem a necessidade de surfactantes^[58].

Nanopartículas de Fe_3O_4 podem ser obtidas ao se dissolver os íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino, conforme a reação química^[2]:



A precipitação total de Fe_3O_4 deve ocorrer em um pH entre 9 e 14, mantendo-se a proporção de $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ em 2:1.

Durante a síntese, normalmente a base é adicionada à solução de íons metálicos sob agitação. O diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas depende de parâmetros da síntese tais como velocidade de agitação, concentração da base e

temperatura da reação. Em adição, o tipo de sais utilizados, a razão molar de $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$, o pH do meio, a concentração dos íons, a presença de surfactantes e a composição da atmosfera também influenciam no tamanho, forma e composição das nanopartículas.

O processo de coprecipitação envolve os fenômenos de nucleação e crescimento cristalino. Na nucleação, os átomos ou moléculas se unem para formar um sólido estável. A nucleação depende da colisão entre os átomos e moléculas devido à difusão térmica, portanto, a nucleação ocorre em meios supersaturados. O crescimento cristalino é obtido pelo crescimento de camadas ordenadas em torno do núcleo por meio da difusão dos solutos na superfície dos cristais. Assim, em um conjunto de partículas com dimensões diferentes, as maiores crescem devido à dissolução das menores, cuja massa é incorporada à das maiores^[7].

Para obtenção de nanopartículas com uma dispersão de tamanho pequena, é necessário controlar a taxa de nucleação e a taxa do crescimento cristalino. A maioria das aplicações exige que as partículas sejam dispersas em meio polar ou apolar, formando suspensões coloidais estáveis. Para que a nanopartícula possa ser peptizada, a superfície deve ser funcionalizada para assegurar a estabilidade da suspensão. A funcionalização pode ser obtida por simples reação ácido-base, que introduz cargas superficiais nas partículas, ou pelo recobrimento com espécies moleculares, tais como pequenas moléculas, como o ácido cítrico, e surfactantes e polímeros. A cobertura também deve propiciar sítios para a ancoragem de outras espécies químicas ou entes biológicos.

2.4 ESTABILIZAÇÃO DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS

Um fluido magnético é definido como um sistema coloidal contendo nanopartículas magnéticas de modo que, quando um campo magnético é aplicado, arrastam o líquido carreador e o sistema age macroscopicamente como um único de fase líquida^[2]. Para aplicações biológicas, normalmente as nanopartículas estão dispersas em meios biológicos compatíveis, como água ou soluções salinas, incluindo tampões, como o tampão fosfato salino (PBS). Dessa forma, o sistema possui propriedades tanto coloidais quanto magnéticas.

As nanopartículas dispersas tendem a se agregar espontaneamente como mecanismo de redução da energia livre proveniente da grande área superficial. Por ser um processo lento, os fluidos magnéticos apresentam uma aparente estabilidade durante longos períodos, chamada de estabilidade coloidal. Essa agregação pode ocorrer por dois processos: a floculação ou a coagulação. Na floculação, há formação de flocos pouco densos que se desfazem por diluição ou adição de eletrólitos. Na coagulação ocorre a formação de um coágulo pela agregação de partículas primárias, sendo mais coeso e denso que o floco^[59].

A estabilidade coloidal depende do tamanho, carga superficial e cobertura das nanopartículas, entre outros. Quando não existem condições favoráveis, ocorre uma separação das fases líquida e sólida do FM. Idealmente, as nanopartículas devem apresentar diâmetros pequenos e com uma distribuição de tamanho uniforme. Se as partículas possuem diâmetro grande, estas precipitam devido à força gravitacional. Para que haja uma estabilidade coloidal, portanto, é necessário um balanço entre as forças repulsivas e atrativas para evitar a formação de aglomerados que prejudiquem a estabilidade do FM como um todo.

2.4.1 Interações atrativas

Dentre as forças atrativas, podem ser citadas as interações dipolar magnéticas e as interações de van der Waals^[60]. A introdução de forças de repulsão que compensem essas interações garante estabilidade coloidal ao FM.

Considerando-se duas nanopartículas separadas por uma distância $s + d$, onde s é a distância entre as superfícies das nanopartículas e d o diâmetro das mesmas, conforme ilustrado na Figura 2.4.1, a energia de interação dipolo-dipolo E_{dd} entre as duas partículas quando seus momentos magnéticos m estão alinhados, é dada por^[60]:

$$E_{dd} = \frac{m^2}{2\pi\mu_0 r^3} \quad (2.4.1)$$

Se $r = (s + d)$ e $m = \frac{\mu_0 M^2 \pi d^3}{6}$, onde M é a magnetização, μ_0 a permeabilidade no vácuo e d o diâmetro das nanopartículas, temos na equação 2.4.1:

$$E_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 \pi d^3}{9(l + 2)^3} \quad (2.4.2)$$

onde $l = \frac{2s}{d}$. Caso as partículas entrem em contato, $l = 0$, portanto:

$$E_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 V}{12} \quad (2.4.3)$$

onde V é o volume da nanopartícula. E_{dd} representa a energia de contato entre as nanopartículas.

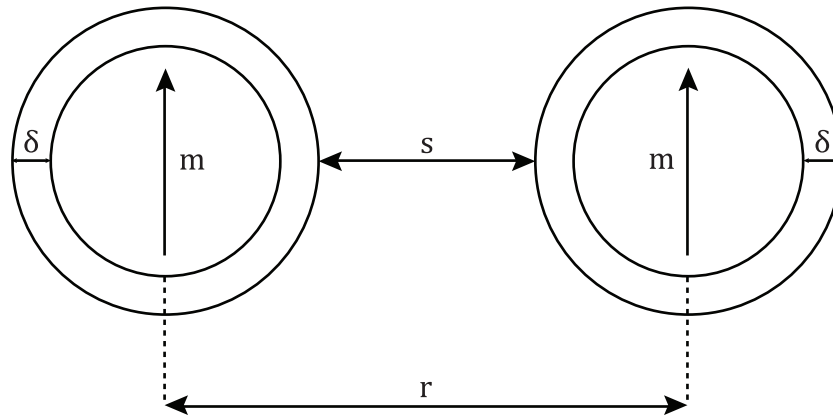


Figura 2.4.1 – Representação de duas nanopartículas com momentos magnético \vec{m} alinhados, distância entre superfícies s e distância entre os centros r , com espessura de camada protetora δ .

A interação atrativa provocada pela interação de van der Waals produz atrações entre átomos neutros ou moléculas e entre cargas elétricas devido à flutuação de energia das forças dipolo-dipolo que estão presentes, como os dipolos induzidos e os dipolos permanentes. A energia de interação entre duas partículas esféricas idênticas, E_{vw} , é dada por:

$$E_{vw} = -\frac{A}{6} \left[\frac{2}{l^2 + 4l} + \frac{2}{(l + 2)^2} + \ln \frac{l^2 + 4l}{(l + 2)^2} \right] \quad (2.4.4)$$

onde A é a constante de Hamaker, que depende das propriedades dielétricas das nanopartículas e do meio, e $l = \frac{2s}{d}$. Segundo a equação 2.4.4, a força de van der Waals é proporcional à l^{-1} para partículas que estão próximas e a l^{-6} para partículas distantes. Dessa forma, quando as partículas estão próximas, a energia necessária para separar um par de partículas que se agregaram tende ao infinito.

As forças atrativas estão presentes em todos os fluidos magnéticos, portanto é necessário introduzir no sistema forças repulsivas para obter a estabilização do fluido.

2.4.2 Interações repulsivas

Se as partículas possuírem cargas e potenciais de superfície de mesmo sinal (positivo ou negativo), será formada uma camada elétrica dupla que impede a agregação das partículas através de uma repulsão eletrostática. Esta camada é composta por uma parte interna, devido à presença dos contra-íons, e uma difusa, formada pelos contra-íons em excesso e os co-íons, ilustrada na Figura 2.4.2. Devido à origem dessa repulsão, essa estabilidade é chamada de estabilidade eletrostática.

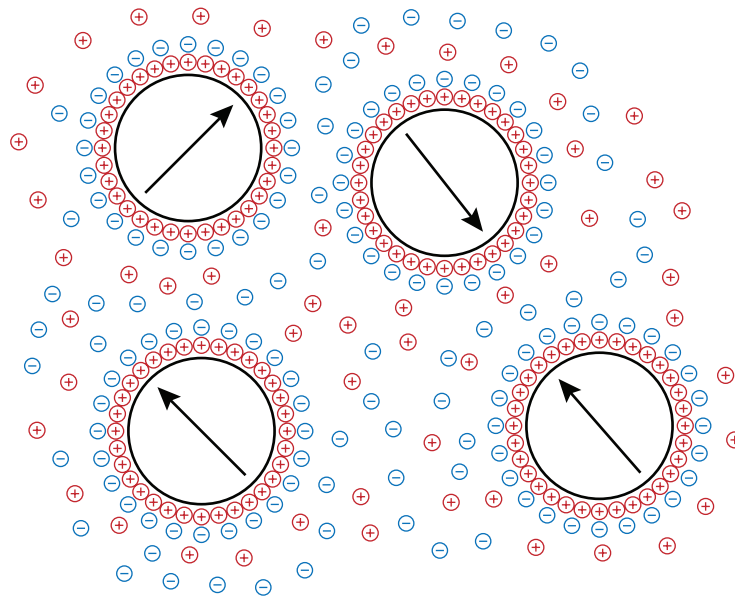
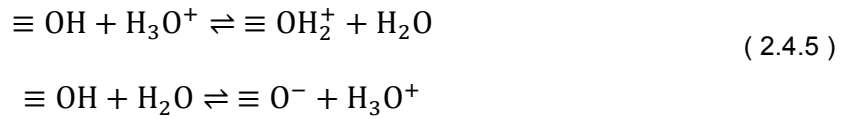


Figura 2.4.2 – Ilustração de um fluido magnético formado por nanopartículas dispersas em meio ácido, onde as setas representam os momentos magnéticos.

Partículas sintetizadas por meio da técnica de coprecipitação são consideradas macroânions devido à presença da carga superficial^[61] e os fluidos magnéticos em pH ácido ou básico produzidos são chamados de fluidos magnéticos iônicos (FMIs)^[2], ou seja, a dispersão das nanopartículas é feita em meios ácidos ou alcalinos. A reação de equilíbrio ácido-base leva à uma grande carga superficial Σ através da adsorção de grupos hidroxila anfotéricos, proporcionando uma carga

negativa em meios alcalinos e positivos em meios ácidos, conforme se observa na Figura 2.4.3. A equação do equilíbrio ácido-base na superfície da nanopartícula pode ser escrita como:



onde \equiv representa a superfície da nanopartícula^[2].

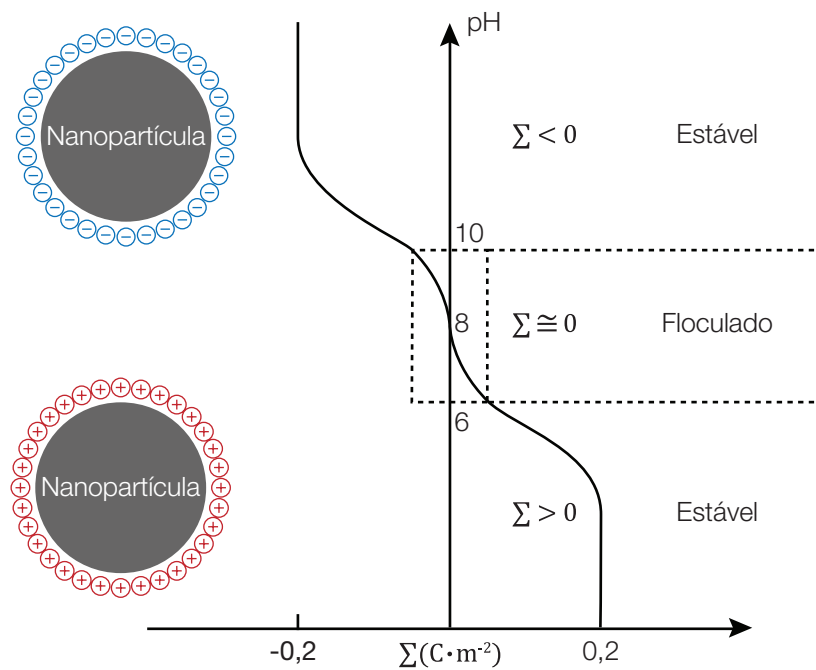


Figura 2.4.3 – Esquema de estabilidade de um FMI em função do pH. Em pH alcalino ($\text{pH} > 10$), as nanopartículas adquirem carga superficial $\Sigma < 0$, enquanto que em pH ácido ($\text{pH} < 6$) a carga superficial é $\Sigma > 0$, proporcionando forças repulsivas suficientes para o processo de peptização. Em pH em torno do ponto isoelétrico ($\text{pH} \approx 7,5$), $\Sigma \approx 0$ e as nanopartículas floculam.

Outro tipo de interação repulsiva é a estérica, na qual ocorre uma interação repulsiva com origem nas moléculas adsorvidas na superfície das nanopartículas. Essas moléculas têm uma afinidade pelo líquido carreador e impedem a aproximação das nanopartículas pelo preenchimento do espaço a redor delas, criando uma barreira estérica^[62]. As moléculas adsorvidas, também chamadas de surfactante, impedem a aproximação das nanopartículas e eventual agregação das

mesmas. Normalmente, os surfactantes são formados por grupos polares que se ligam à superfície das nanopartículas e possuem caudas com propriedades similares às do meio, produzindo uma repulsão entrópica para suprimir a atração, prevenindo assim uma agregação irreversível^[63]. Os fluídos magnéticos com estabilidade proporcionada por surfactantes são chamados de fluídos magnéticos surfactados (FMS). Como exemplo de surfactante, pode-se citar o ácido oleico^[64].

No caso de fluidos biocompatíveis, estes são estabilizados por surfactantes cujos terminais possuem cargas, proporcionando uma repulsão eletrostática^[65]. Para a obtenção de FMs estáveis, é necessário fazer um tratamento da superfície das nanopartículas, que será descrito a seguir.

2.4.3 Métodos de estabilização de FMs

A estabilidade dos FMs é obtida por meio de tratamento da superfície das nanopartículas. No caso de FMIs, o pH do meio proporciona a estabilidade eletrostática às nanopartículas. Entretanto, a floculação do FMI ocorre para a faixa $6 < \text{pH} < 10$, restringindo as aplicações desses FMIs. Considerando-se as aplicações biomédicas, os FMs devem ser estáveis em $\text{pH} \cong 7$. Através do tratamento da superfície das nanopartículas com moléculas, surfactantes, ou polímeros, é possível obter a estabilidade no pH necessário.

A preparação de um FM pode ser realizada em 3 etapas (síntese, tratamento superficial das nanopartículas e peptização em meio líquido). Entretanto, o FM pode ser preparado em uma ou duas etapas. Normalmente, nesses casos, a cobertura é adicionada durante a síntese.

Um dos métodos de tratamento da superfície de nanopartículas por interação eletrostática, é a técnica de automontagem. Inicialmente proposta para a deposição de filmes poliméricos, a técnica de automontagem consiste na deposição alternada de monocamadas de polieletrólitos, partículas ou outros entes de cargas opostas. Essa técnica vem sendo investigada para produção de nanopartículas poliméricas como veículos carreadores de drogas. Esses materiais possuem multicamadas, são preparados no formato de cápsulas ou nanocompósitos planares, podendo encapsular uma grande carga de drogas. Em adição, essas cápsulas podem ser funcionalizadas com propriedades específicas dependendo da aplicação^[23]. Permite também a obtenção de complexos com polieletrólitos e nanomateriais magnéticos com resposta ao pH, adequados ao papel de carreadores de drogas. A técnica permite também um controle a nível molecular, bem como a deposição de monocamadas, sendo de alta precisão e de preparação relativamente simples^[24].

Como exemplos do emprego da técnica de automontagem para produção de complexos com óxidos de ferro e polímeros, tem-se a síntese de nanopartículas de maghemita cobertas com poli(etilenoimna) (PEI) e polietilenoglicol-ácido poliglutâmico (PEO-PGA), para a produção de carreadores nanoparticulados^[22].

3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A produção de complexos magnéticos adequados para aplicações biomédicas deve resultar em suspensões coloidais não tóxicas e com propriedades controladas. Portanto, o processo de fabricação deve ser monitorado para obtenção das características do núcleo magnético que será utilizado como plataforma para o ancoramento de drogas. As principais características são o formato, a distribuição de tamanho, a composição, as propriedades da superfície, a carga superficial e as propriedades magnéticas. Em adição, as propriedades físico-químicas da camada molecular utilizada na funcionalização e características da dispersão coloidal resultante também devem ser determinadas. Dentre as técnicas que foram utilizadas neste trabalho, estão as espectroscopias Raman e no infravermelho, a microscopia eletrônica de transmissão (MET), o espalhamento dinâmico de luz (EDL) e a análise termogravimétrica, que serão descritas a seguir.

3.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman baseia-se no espalhamento Raman e é uma das técnicas mais empregadas no estudo dos materiais pois fornece informações como a simetria cristalina, arranjo atômico e interações entre as moléculas, permitindo assim a identificação do material investigado^[66, 67]. A técnica não é destrutiva e normalmente não requer preparo da amostra, pode ser realizada à temperatura ambiente e a análise dos resultados pode ser obtida de forma qualitativa e/ou quantitativa. Nas últimas décadas, vem sendo empregada para a investigação de nanomateriais, em particular dos óxidos de ferro, seja no estudo de suspensões coloidais^[2, 68-73], da estabilidade do núcleo^[67, 74-76], passivação da superfície^[77, 78], dos efeitos da cobertura^[64, 79, 80], de nanocompósitos^[81-83] ou da interação com o

sangue^[84, 85], entre outros. Uma das grandes vantagens da espectroscopia Raman no estudo das nanopartículas de óxido de ferro é a capacidade de distinguir as suas diferentes fases^[67, 86].

O espalhamento inelástico da luz monocromática pela matéria foi teoricamente previsto por Smekal (1923), porém somente em 1928 foi descoberto experimentalmente por Sir Chandrasekhara Raman. Raman observou que, ao incidir um feixe monocromático de luz em substâncias líquidas e sólidas, a frequência da luz espalhada era diferente daquela da radiação incidente.

O estudo da interação de luz monocromática com a matéria pode ser feito considerando-se uma onda eletromagnética, que incide na matéria, cuja intensidade do campo elétrico \vec{E} varia com o tempo, dado por^[87]:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (3.1.1)$$

onde t é o tempo, \vec{E}_0 é a amplitude da onda e ν_0 é a frequência da radiação incidente. Se a radiação incide em uma molécula diatômica com polarizabilidade α , o momento de dipolo induzido \vec{P} produzido pela interação com a nuvem eletrônica é dado por:

$$\vec{P} = \alpha\vec{E} \therefore \vec{P} = \alpha\vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.1.2)$$

A constante de proporcionalidade α é chamada de polarizabilidade. A coordenada normal de vibração devido à frequência de vibração ν_v , pode ser escrita como:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \quad (3.1.3)$$

onde q_0 é a amplitude vibracional.

Para pequenas amplitudes de vibração, α é uma função linear de q , e pode ser escrita como:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q \quad (3.1.4)$$

onde α_0 é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e a derivada, calculada na posição de equilíbrio, é a taxa de variação de α em relação à variação em q .

Considerando-se que:

$$\cos(a) \cos(b) = \left(\frac{1}{2}\right) [\cos(a + b) + \cos(a - b)] \quad (3.1.5)$$

combinando as equações 3.1.2 à 3.1.5, obtemos:

$$\begin{aligned} \vec{P} &= \alpha \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t \\ \vec{P} &= \alpha_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t \cos 2\pi\nu_v t \\ \vec{P} &= \alpha_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \} \end{aligned} \quad (3.1.6)$$

Na equação 3.1.6, o primeiro termo da igualdade descreve um dipolo oscilante que irradia luz na frequência ν_0 – espalhamento Rayleigh. O segundo termo contribuirá para o valor do momento induzido se $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right) \neq 0$, ou seja, para ocorrer o efeito Raman, é necessário que a polarizabilidade varie com o deslocamento da coordenada q em relação à posição de equilíbrio. Neste caso, a luz espalhada terá duas frequências: a $(\nu_0 + \nu_v)$, que é chamada de espalhamento Raman anti-Stokes, e a $(\nu_0 - \nu_v)$, denominada espalhamento Raman Stokes. É importante ressaltar que, se a derivada da polarizabilidade em função do deslocamento de vibração for nula, a vibração não terá modo vibracional Raman ativo.

No caso de um espalhamento elástico (Rayleigh), a luz é espalhada com a mesma frequência da incidente (ν_0). No espalhamento inelástico (Raman), a onda espalhada possui frequência $\nu_0 \pm \nu_v$. Nas bandas Stokes a molécula no estado fundamental é excitada para um estado excitado virtual e retorna para um estado excitado, absorvendo parte da energia do fóton incidente e emitindo luz de frequência $(\nu_0 - \nu_v)$. Por outro lado, nas bandas anti-Stokes a molécula, inicialmente no estado excitado, retorna para o estado fundamental, liberando energia na luz espalhada, de frequência $(\nu_0 + \nu_v)$ conforme se observa na ilustração apresentada na Figura 3.1.1. Apesar do espalhamento Raman ser extremamente fraco em comparação ao espalhamento Rayleigh (por um fator de $10^{-3} \sim 10^{-5}$), utilizando-se como fonte de excitação um laser, é possível observar o efeito^[88].

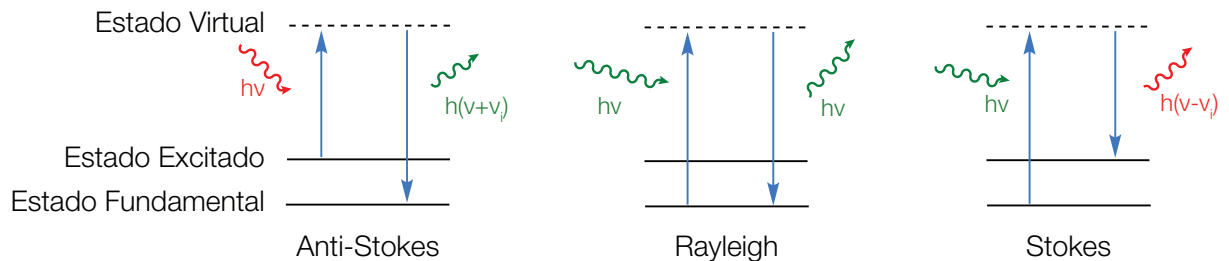


Figura 3.1.1 – Mecanismo de espalhamento de um fóton.

No espectro Raman de um dado material tem-se simetricamente, em relação à linha Rayleigh, uma banda do lado de deslocamento positivo, a Stokes, e uma do lado de deslocamento negativo, a anti-Stokes. Classicamente, as duas deveriam ter a mesma intensidade, mas observa-se que a Stokes é mais intensa que a anti-Stokes. Considerando-se a distribuição de Maxwell-Boltzmann, à temperatura ambiente, a população de moléculas no estado excitado é menor que as no estado fundamental, de forma que o espectro Raman à temperatura ambiente resulta em intensidade das bandas Stokes maior do que a das bandas anti-Stokes, conforme se

observa no exemplo do espectro Raman para o cristal de magnetita mostrado na Figura 3.1.2.

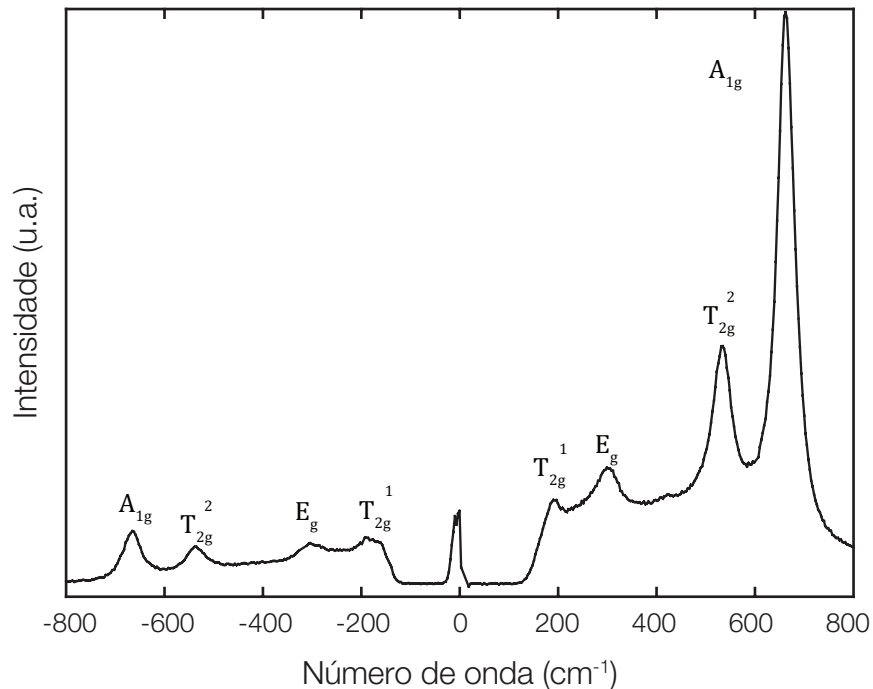


Figura 3.1.2 – Espectro Raman de magnetita. As bandas anti-Stokes ($\tilde{\nu} < 0$) e Stokes ($\tilde{\nu} > 0$) possuem arranjo simétrico com o centro em $\tilde{\nu} = 0 \text{ cm}^{-1}$. Adaptado de Shebanova e Lazor, 2003^[66].

Os cálculos teóricos preveem para a estrutura do tipo espinélio cúbico na forma *bulk*, 5 modos vibracionais Raman ativos^[89]. Apenas os íons de ferro e oxigênio do sítio tetraédrico contribuem para o efeito Raman^[66]. Conforme descrito na Tabela 3.1.1, o modo A_{1g} representa o estiramento simétrico dos átomos de oxigênio em relação aos átomos de ferro; o modo E_g representa a flexão simétrica dos átomos de oxigênio e os 3 modos T_{2g} representam o movimento de translação dos cinco átomos, o estiramento assimétrico dos átomos de oxigênio e a flexão assimétrica dos átomos de oxigênio^[2, 20, 66].

Tabela 3.1.1 – Modos Raman atribuídos à magnetita *bulk* [66].

Modo	Origem	Posição
A _{1g}	Estiramento simétrico Fe–O	≈ 668 cm ⁻¹
E _g	Flexão simétrica O–Fe	≈ 306 cm ⁻¹
T _{2g} ²	Estiramento assimétrico Fe–O	≈ 538 cm ⁻¹
T _{2g} ¹	Movimento translacional FeO ₄	≈ 193 cm ⁻¹
T _{2g} ³	Flexão assimétrica O–Fe	≈ 450 ~ 490 cm ⁻¹

3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho baseia-se no espectro de bandas de absorção da luz pelas moléculas. A molécula absorve a radiação infravermelha quando a vibração dos grupos funcionais na molécula produz um campo elétrico oscilante que leve à mudança do seu momento de dipolo. Dessa forma, somente há absorção do feixe incidente se a sua frequência ν for igual à frequência da vibração. Os grupos funcionais da molécula vibram de diversas formas simétrica ou assimetricamente: o estiramento produz mudanças na distância interatômica; a flexão, por sua vez, resulta na mudança do ângulo das ligações; outros tipos de vibrações são consideradas variações destas duas.

De forma geral, uma molécula com n átomos possui $3n-6$ modos vibracionais, uma vez que 3 modos são utilizados para descrever o movimento rotacional e outros 3 o movimento translacional. Moléculas lineares, por sua vez, apresentam $3n-5$ modos de vibrações normais, uma vez que as rotações são efetuadas somente em 2 eixos perpendiculares. Para moléculas poliatômicas, apesar de ser possível prever vários modos vibracionais, normalmente é observada uma menor quantidade de modos vibracionais. Isso se deve à ocorrência de vibrações que (1) não produzem uma variação no momento de dipolo, (2) são redundantes ou (3) necessitam a mesma energia (ou frequência), sendo as duas últimas observadas em um mesmo número de onda. É importante ressaltar que, apesar de o espectro infravermelho ser

característico de cada molécula, há grupos funcionais que apresentam bandas de absorção em frequências iguais ou muito próximas independente da estrutura da molécula, permitindo a identificação desses grupos em outras amostras de composição diferente.

A origem do espectro no infravermelho é resultante da absorção da luz pela molécula:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (3.2.1)$$

onde A é a absorbância, I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida. A absorbância também é relacionada com a concentração das moléculas pela Lei de Beer:

$$A = \epsilon lc \quad (3.2.2)$$

sendo ϵ a absorvidade molar, que depende do comprimento de onda do feixe incidente, l a distância que a luz atravessa na amostra e c a concentração da substância absorvente. Dessa forma, através da intensidade ou da área das bandas no espectro infravermelho, é possível calcular a concentração da amostra.

Os espectros de infravermelho também podem ser apresentados considerando-se a quantidade em percentagem da luz transmitida através da amostra (transmitância). A transmitância é normalmente usada para análises qualitativas e é calculada por:

$$T = 100 \times \left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (3.2.3)$$

A espectroscopia no infravermelho permite estudar a presença de grupos funcionais e da estrutura molecular de amostras, tendo sido empregada para a

caracterização do polímero utilizado neste trabalho e para o estudo da interação deste com a superfície das nanopartículas nos sistemas produzidos.

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Amplamente usada no ramo da nanotecnologia, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) possui resolução suficiente para observar a morfologia das nanopartículas e estimar as suas dimensões^[90]. Na MET, em um sistema à vácuo, um feixe de elétrons é emitido por um filamento, normalmente de tungstênio, e direcionado para a amostra. Para que ocorra a formação da imagem, os elétrons devem interagir com a amostra, podendo ser transmitidos ou espalhados elasticamente. Através dessa interação, uma imagem (contraste) é formada, onde átomos mais densos espalham mais elétrons.

Considerando-se as nanopartículas com formato esférico, é possível medir os diâmetros a partir das imagens obtidas e construir um histograma em função do tamanho (diâmetro) das mesmas. Para melhores resultados estatísticos, a quantidade de nanopartículas mensuradas (n) deve ser próximo de mil. Para obter o histograma da distribuição do tamanho, o número de intervalo de tamanhos (C) é dado por:

$$C \cong 1 + 3,22 \times \log(n) \quad (3.3.1)$$

Os dados apresentados no histograma podem ser ajustados por meio da função log-normal, a partir da qual se obtém o diâmetro médio e o desvio padrão:

$$P(D) = \frac{1}{D\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\ln\left(\frac{D}{D_{\text{méd}}}\right)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.3.2)$$

onde $P(D)$ é a função log-normal, σ o desvio padrão e $D_{\text{méd}}$ o diâmetro médio.

O preparo das amostras para realização da microscopia dos fluídos magnéticos consiste na deposição e secagem de algumas gotas do material em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono. Esta técnica foi utilizada para a análise da morfologia das nanopartículas e para obtenção do diâmetro médio das mesmas.

3.4 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

O espalhamento dinâmico de luz (EDL) permite obter o tamanho hidrodinâmico (D_H) dos agregados em um coloide. O D_H leva em conta a interação das nanopartículas com o meio e a cobertura presente na sua superfície. O potencial ζ , por sua vez, reflete a estabilidade de um coloide: considera-se que, para que um coloide seja potencialmente estável, o valor absoluto do potencial ζ deve ser maior ou igual à 30 mV.

No experimento de espalhamento de luz, um feixe de luz monocromático incide na amostra e é espalhado em várias direções, sendo que um detector coleta a luz espalhada em um ângulo θ com referência ao feixe incidente. O espalhamento de ondas eletromagnéticas por qualquer sistema está relacionado à heterogeneidade destas, tanto em escala molecular como na escala de agregações moleculares. Como as moléculas iluminadas possuem seus movimentos de translação, rotação e vibração, a luz espalhada no detector encontra-se em constante mudança, variando com o tempo. Dessa forma, a técnica leva em conta o movimento Browniano das partículas e o relaciona com o tamanho das mesmas.

O movimento Browniano das partículas suspensas no líquido depende da viscosidade e da temperatura além do tamanho, relacionados pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (3.4.1)$$

em que D é o coeficiente de difusão, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio e r_H o raio hidrodinâmico da partícula. A partir da equação 3.4.1 tem-se:

$$D \propto T \propto \eta^{-1} \propto r_H^{-1}$$

Observa-se que as partículas de maior tamanho possuem um coeficiente de difusão menor que partículas de menor tamanho. A técnica de EDL utiliza a relação apresentada para obter a distribuição de tamanho do material suspenso (partículas ou aglomerados) em uma amostra, conhecendo-se a viscosidade do material dispersante e a temperatura da amostra, entre outros dados.

O potencial ζ representa o potencial no plano de cisalhamento resultante da interação das cargas das nanopartículas com as do meio. A carga superficial da partícula promove uma bicamada elétrica devido à distribuição dos contra-íons ao redor da partícula. Esta bicamada é dividida em uma parte interna e uma parte externa, mais difusa. Na parte interna, os contra-íons encontram-se mais fortemente ligados às partículas, enquanto na camada externa ocorre uma difusão das cargas. Quando a partícula se encontra em movimento, os contra-íons da camada interna se deslocam juntamente com a partícula, porém, não há deslocamento das cargas da camada difusa. O potencial ζ é a medida do potencial que existe entre as duas partes da bicamada.

Para determinação do potencial ζ , entretanto, a técnica utiliza os efeitos eletrocinéticos, como a eletroforese, provocados pela interação entre a carga superficial das partículas e um campo elétrico aplicado no meio. Na eletroforese, as partículas com carga tendem a se mover em direção ao eletrodo de carga oposta, entretanto, as forças viscosas do meio se opõem a esse movimento. Quando o equilíbrio entre essas forças é atingido, a velocidade das partículas é constante. Essa velocidade é chamada de mobilidade eletroforética (U_E) e é relacionada com o potencial ζ conforme a equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\epsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (3.4.2)$$

onde ϵ é a constante dielétrica do meio, η a viscosidade do meio e $f(ka)$ a função de Henry, cujo valor depende principalmente do tamanho das partículas. Normalmente, o valor da função de Henry é aproximado dependendo da composição do meio; para meios polares, a aproximação de Smoluchowski é utilizada e a função de Henry é igual a 1,5.

3.5 ANÁLISE TÉRMICA

As técnicas de análise térmica caracterizam um sistema (elemento, composto ou mistura) através da mensuração das mudanças das propriedades físico-químicas em função da temperatura^[91]. Uma das técnicas que é bastante utilizada é a análise termogravimétrica (TG), na qual a variação da massa é medida em função do aumento da temperatura.

Basicamente, o equipamento é constituído por um forno com temperatura controlada e uma balança de alta precisão. Além disso, a atmosfera também é

controlada. Isto é obtido provendo uma atmosfera oxidante, redutora ou inerte, e evitando um aumento da pressão do sistema.

Os dados obtidos podem ser analisados apresentando a massa (m) em função da temperatura (T), dando origem à curva termogravimétrica (curva TG), ou apresentando a taxa de variação da massa – derivada da variação da massa em função do tempo ($\frac{dm}{dt}$) – também em função da temperatura (T), dando origem à curva termogravimétrica diferencial (curva DTG). Na curva TG, a massa pode ser representada como (1) a massa real, medida pela balança, (2) a percentagem da massa total ou a (3) percentagem da massa total perdida. Independente da forma de apresentação, é possível observar características, normalmente repetitivas: (1) uma porção horizontal, o que indica uma massa constante; (2) uma porção curva, cuja declividade é um indicativo da taxa de variação da massa ($\frac{dm}{dt}$) e (3) uma inflexão na curva DTG, onde $\frac{dm}{dt}$ obtém um valor mínimo mas diferente de zero, o que representa a formação de um composto intermediário.

A porção horizontal na curva DTG em que $\frac{dm}{dt} = 0$ é equivalente à porção horizontal na curva TG. Já o pico na curva DTG corresponde à porção inclinada da curva TG, onde o valor máximo de $\frac{dm}{dt}$ corresponde à maior inclinação na curva TG. A curva DTG proporciona a fácil identificação de fenômenos que na curva TG são difíceis de observar, principalmente relacionados à variação da taxa de perda da massa, o que pode indicar duas reações consecutivas ou uma adsorção forte.

A análise termogravimétrica foi utilizada para cálculo da massa de condroitina adsorvida nas nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Este capítulo descreve os processos de síntese dos complexos magnéticos e sua suspensão em meio aquoso, bem como as técnicas e condições empregadas para a caracterização dos mesmos.

4.1 MATERIAIS

Cloreto de ferro (II) tetra hidratado (cloreto ferroso), cloreto de ferro (III) hexa hidratado (cloreto férrico), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), ácido perclórico (HClO₄), e sulfato de condroitina extraído de traqueia bovina foram adquiridos da Sigma Aldrich Corporate (St. Louis, Missouri, EUA) e utilizados na forma como foram adquiridos. Membranas de celulose para diálise foram adquiridas da InLab (São Paulo, Brasil). Filtros estéreis para seringa com poro de 0,22 µm foram adquiridos da KASVI (Curitiba, Paraná, Brasil). Toda a água utilizada foi provida por um sistema Milli-Q (resistividade: 18 MΩ cm⁻¹)

Para a liofilização das amostras, foi utilizado o equipamento Liofilizador L101 (Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil) do Laboratório de Toxinologia (Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília). Os espectros Raman foram adquiridos na configuração micro-Raman (lente objetiva com magnificação de 50x) utilizando-se o espectrômetro triplo T64000 (Horiba Scientific, Quioto, Japão), equipado com uma CCD. A excitação das amostras foi realizada com um laser de íon argônio com $\lambda = 514,5$ nm (Innova 90C, Coherent, Inc., Santa Clara, Califórnia, EUA) com intensidade de 0,25 mW. As análises FT-IR foram adquiridas empregando-se o espectrômetro Vertex 70 da Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, EUA), enquanto a espectrometria UV-

Vis foi realizada no equipamento UV-2600 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). As análises de EDL foram obtidas no equipamento Zetasizer Nano Z90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido), com excitação em 632,8 nm, do Laboratório de Genética e Morfologia (Instituto de Biologia, Universidade de Brasília). As imagens de MET foram adquiridas com o microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (JEOL, Tóquio, Japão) com filamento de tungstênio em 80 kV, do Instituto de Biologia, Universidade de Brasília. A análise termogravimétrica foi realizada no analisador térmico DTG-60H (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) da Central Analítica, Instituto de Química, Universidade de Brasília.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SULFATO DE CONDROITINA

A caracterização do sulfato de condroitina foi realizada empregando-se as técnicas de FT-IR, EDL e TG. O espectro FT-IR foi obtido em pastilhas com KBr, medindo-se a transmitância na faixa de 350 a 4000 cm^{-1} com 64 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . O valor da carga superficial foi obtido em amostras com diluição de 1:1000 em água deionizada de uma solução 1 mg/mL de sulfato de condroitina (pH = 6,8). A análise termogravimétrica foi obtida em suportes de alumina em atmosfera inerte (N_2) de 25 °C à 500 °C com variação de temperatura de 10 °C/min e fluxo de N_2 de 30 ml/min.

4.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS MAGNÉTICOS

Os complexos magnéticos foram produzidos seguindo-se dois procedimentos: no primeiro, as nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por coprecipitação dos íons de ferro em meio aquoso. Em seguida as partículas foram funcionalizadas com o sulfato de condroitina por meio da técnica de automontagem

e posteriormente dispersas em meio aquoso com pH neutro. Na segunda abordagem, os óxidos de ferro nanoparticulados foram sintetizados na presença do sulfato de condroitina, sendo dispersos em seguida para formar o coloide magnético, também em pH neutro.

4.3.1 Síntese A: Obtenção do FM através da técnica de automontagem

Nesta síntese, a produção dos complexos magnéticos foi realizada em três etapas:

- i) síntese do sólido nanoparticulado de óxido de ferro pela técnica de coprecipitação em meio aquoso;
- ii) funcionalização dos nanocristais produzidos por meio da técnica de automontagem;
- iii) peptização dos complexos nanoestruturados em meio aquoso com pH neutro.

As nanopartículas de óxido de magnetita foram sintetizadas por meio do método de coprecipitação em meio aquoso alcalino, utilizando-se o seguinte procedimento: inicialmente, foi preparada uma solução 400 mM de NaOH, à qual adicionou-se, sob agitação e à temperatura ambiente, uma solução contendo 15 mM de cloreto férrico e ferroso com os íons de ferro em proporções estequiométricas igual à 2,0. Observou-se a formação de um precipitado preto, indicando a síntese de NPs de magnetita. A mistura obtida foi deixada sob agitação durante 30 minutos. Após esse período, o sólido foi separado por decantação e em seguida lavado com água deionizada e separado por decantação. Finalmente, as NPMs foram peptizadas em pH 3 com uma solução 0,25 M de ácido perclórico (HClO_4), formando um FM iônico (FMI). A suspensão obtida foi centrifugada para eliminação dos

agregados (4.000 RPM durante 5 minutos). A suspensão de nanopartículas de magnetita sem cobertura, dispersas em meio ácido, foi chamada de fluido magnético iônico (FMI).

A funcionalização das partículas sintetizadas com SC foi realizada por meio da técnica de automontagem, seguindo-se o seguinte procedimento: uma solução de SC 1 mg/mL foi adicionada à suspensão FMI sob agitação. Em seguida, as NPMs foram separadas do sobrenadante por centrifugação (4.000 RPM durante 5 minutos) e em seguida suspensas em meio aquoso com pH neutro. O excesso de íons e SC não ligados às partículas foi removido por meio da diálise da suspensão durante 24 horas. A suspensão coloidal estável resultante, de pH neutro, foi chamada de FMA. A suspensão coloidal foi armazenada à 4 °C até a sua utilização e caracterização. Uma alíquota do coloide FMA foi submetida ao processo de liofilização, para obtenção de amostras sólidas, conforme o item 4.4. O material resultante foi denominado de sólido nanoparticulado A (SNA).

4.3.2 Síntese B: Obtenção de FM através de síntese direta

Neste processo a produção dos complexos magnéticos foi realizada apenas em duas etapas:

- i) coprecipitação dos sais de ferro em uma solução contendo sulfato de condroitina;
- ii) peptização em meio aquoso com pH neutro.

O procedimento empregado pode ser descrito como: uma solução 1 mg/mL de SC foi adicionada à uma solução 14 mM de cloreto ferroso e férrico com estequiometria dos íons de ferro igual à 2,0. A mistura foi adicionada à uma solução

2 M de NaOH sob agitação e à temperatura ambiente. Após a adição, a mistura final foi deixada sob agitação constante durante 30 minutos. O sólido foi separado do sobrenadante por decantação. Em seguida, foram feitas lavagens com água deionizada até obtenção de pH do sobrenadante igual a 7. A suspensão obtida foi centrifugada para eliminação dos agregados (4.000 RPM durante 5 minutos). Em seguida, as NPMs foram suspensas em água deionizada e o pH ajustado para 7,2, considerando o pH fisiológico. A suspensão coloidal resultante foi rotulada FMB. Uma alíquota do coloide FMB foi submetida ao processo de liofilização descrito no item 4.4, e o sólido resultante foi denominado sólido nanoparticulado B (SNB). O FMB foi armazenado a 4 °C até a sua utilização e caracterização.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS PRODUZIDOS

As suspensões coloidais preparadas (FMA e FMB) foram utilizadas para as análises por meio das técnicas de MET, EDL e UV-Vis. A investigação da morfologia e o diâmetro dos óxidos de ferro foi realizada por meio da técnica de MET e o diâmetro hidrodinâmico do sólido disperso e o potencial ζ também foram medidos. As amostras utilizadas nas duas primeiras técnicas foram preparadas a partir de uma diluição 1:1000 do fluido magnético em água deionizada, enquanto que para a técnica de UV-Vis a diluição foi de 1:100. Para a análise MET, foram gotejados 20 microlitros de FM diluído em telas cobertas com uma película de carbono. Em adição, a análise por espectroscopia UV-Vis foi realizada colocando-se as suspensões coloidais em cubetas de quartzo, utilizando-se água deionizada como referência.

Os sólidos SNA e SNB foram obtidos a partir dos seus respectivos FMs por meio do processo de liofilização. Para isso, as amostras foram congeladas à -20 °C

e colocadas à vácuo sob refrigeração durante 3 dias. Os sólidos foram caracterizados por meio das técnicas de espectroscopia Raman realizada à temperatura ambiente; espectroscopia no infravermelho, utilizando-se as amostras dispersas em KBr, e análise termogravimétrica realizada em suportes de alumina em atmosfera inerte (N₂), com rampa de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de 25 °C à 500 °C e fluxo de N₂ de 30 mL/min.

4.5 ESTABILIDADE DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS

Visando aplicações biológicas, a estabilidade das dispersões coloidais sintetizadas foi monitorada em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas após a síntese, por meio de medidas do diâmetro hidrodinâmico e imagens digitais. Essa monitoração foi realizada nas dispersões finais, assim como em diluições com tampão fosfato e meio de cultura DMEM, em proporção de 1:3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, que tem como objetivo sintetizar e caracterizar complexos magnéticos biocompatíveis funcionalizados com sulfato de condroitina. Inicialmente, será apresentada a caracterização do sulfato de condroitina, em seguida os da caracterização dos nanomateriais produzidos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SULFATO DE CONDRITINA

O monômero do sulfato de condroitina é composto por uma molécula de N-ácido glucurônico e uma molécula de N-acetilgalactosamina. A N-acetilgalactosamina pode ser sulfatada no carbono 4 ou carbono 6, dando origem à 4-sulfato de condroitina ou 6-sulfato de condroitina, respectivamente. Quando o grupo sulfato (SO_3H) encontra-se no carbono 4, essa posição é axial, enquanto que no carbono 6, é equatorial (Figura 5.1.1).

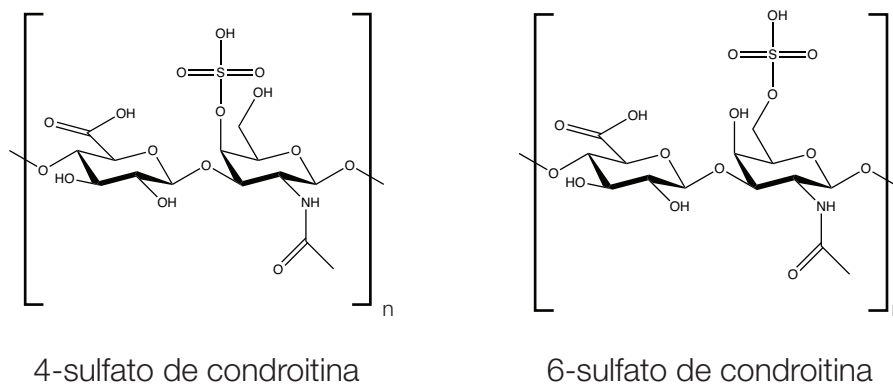
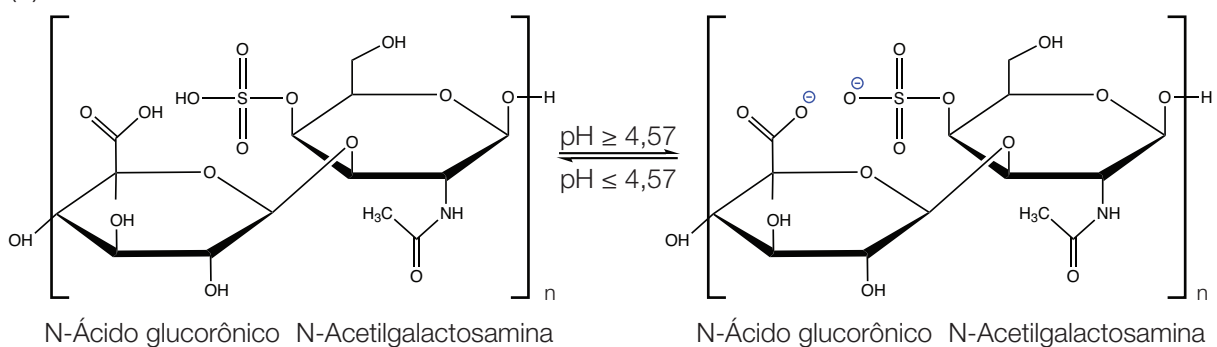


Figura 5.1.1 – Estrutura molecular do 4-sulfato de condroitina e do 6-sulfato de condroitina.

Independente da posição do grupo SO_3H , quando o pH da solução é maior do que o seu pK_a (2,60), o grupo encontra-se desprotonado, na forma do grupo sulfônico (SO_3^-) e apresentando carga aniônica^[92] (Figura 5.1.2). Outro grupo

presente no polímero que contribui para a sua carga é o grupo carboxila (COOH), que, quando em soluções com pH maior ou igual ao seu pKa (4,57), ocorre a desprotonação (COO⁻), exibindo também uma carga negativa^[92] (Figura 5.1.2). Essas cargas negativas são de grande importância para a interação do polímero com nanopartículas, adequadas não somente para contribuir com a estabilidade coloidal das suspensões, mas também com o encapsulamento das mesmas.

(a) 4-sulfato de condroitina



(b) 6-sulfato de condroitina

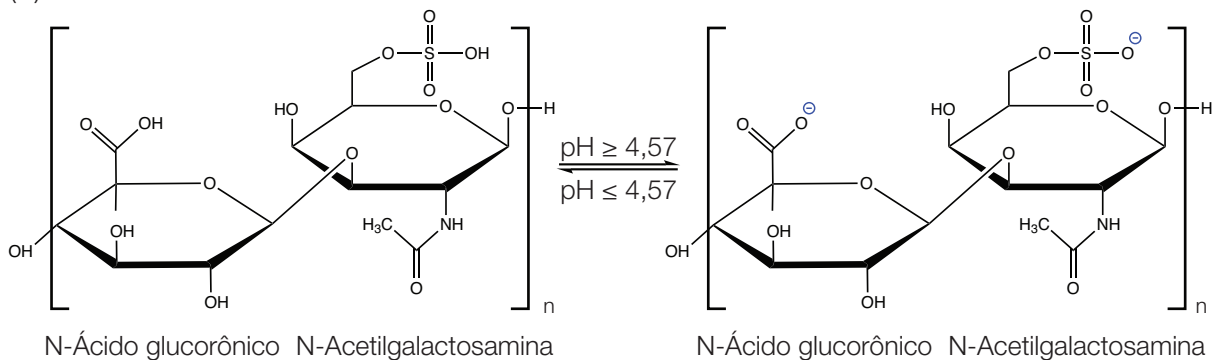


Figura 5.1.2 – Protonação e desprotonação do (a) 4-sulfato de condroitina e (b) 6-sulfato de condroitina.

A Figura 5.1.3 mostra o espectro FT-IR obtido do sulfato de condroitina utilizado nos experimentos, cujas bandas observadas foram identificadas com base em estudos da literatura^[37, 93-97]. Observa-se que o espectro apresenta várias bandas características dos grupos carboxila e sulfato, assim como os estiramentos relativos às ligações S=O e C-O. É importante ressaltar que o espectro permite identificar a

posição do grupo SO_3^- , permitindo identificar o tipo de sulfato de condroitina. Quando o grupo SO_3^- encontra-se na posição equatorial da N-acetilgalactosamina, bandas nas posições 822 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} [96, 97] são observadas; nesses casos, conforme foi discutido anteriormente, o sulfato de condroitina é tido como 6-sulfato de condroitina. Por outro lado, quando o grupo encontra-se na posição axial, as bandas possuem um deslocamento e são observadas nas posições 730 cm^{-1} e 853 cm^{-1} , caracterizando o sulfato de condroitina como 4-sulfato de condroitina^[93-95].

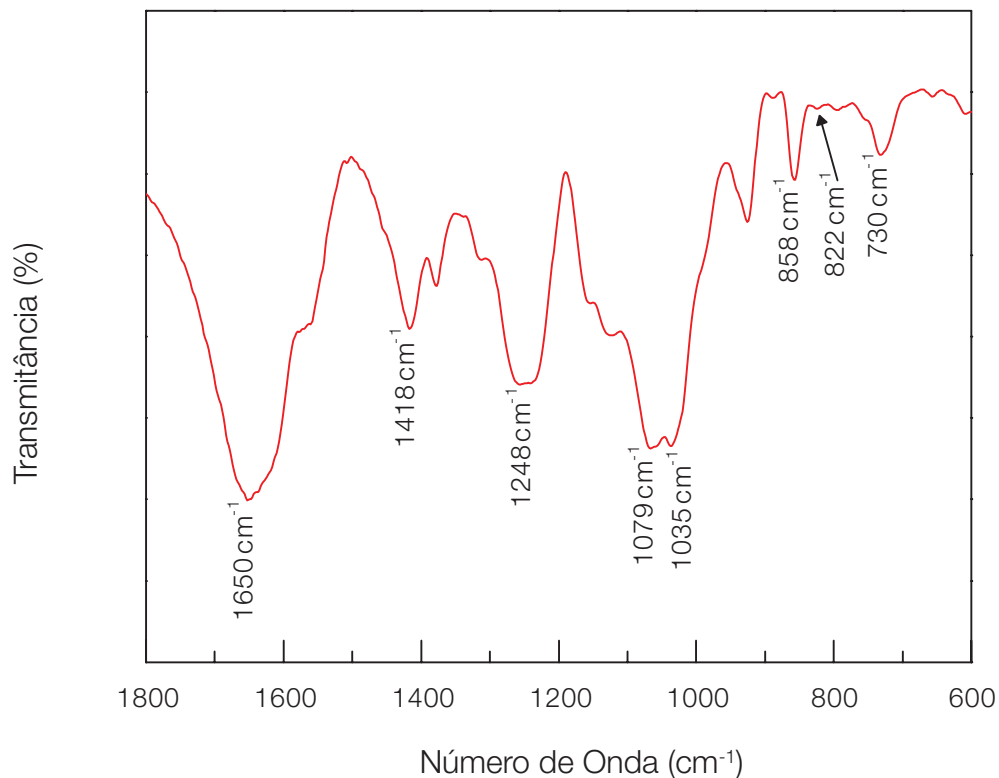


Figura 5.1.3 – Espectro FT-IR do sulfato de condroitina.

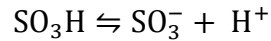
A banda observada no espectro infravermelho (Figura 5.1.3) em 1035 cm^{-1} é associada à vibração do estiramento das ligações C-O presentes no ácido glucoronico e na acetilgalactosamina da estrutura do sulfato de condroitina. As bandas em 1079 cm^{-1} e o complexo de absorção centrado em 1248 cm^{-1} são referentes ao estiramento simétrico e antissimétrico da ligação S=O do grupo sulfônico presente na acetilgalactosamina. As vibrações do grupo COOH do ácido

glucoronico são observadas em 1418 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , sendo a primeira assinalada ao estiramento simétrico, enquanto a outra ao estiramento antissimétrico. A posição do grupo SO_3^- pode ser observada pelas bandas em 858 cm^{-1} , 822 cm^{-1} e 730 cm^{-1} . Conforme foi discutido anteriormente, as bandas em 858 cm^{-1} e 730 cm^{-1} são associadas à posição axial do grupo SO_3^- . Dessa forma, esses resultados mostram que o sulfato de condroitina utilizado neste trabalho é realmente o 4-sulfato de condroitina, conforme especificação do fabricante. Além da posição axial do grupo SO_3^- , é possível observar também a posição equatorial, através da banda em 822 cm^{-1} . Isto indica um resíduo de 6-sulfato de condroitina presente na amostra, que é proveniente do processo de extração e purificação do material. As posições das bandas observadas no sulfato de condroitina e as suas respectivas origens estão descritas na Tabela 5.1.1.

Tabela 5.1.1 – Bandas vibracionais e respectivas origens observadas no sulfato de condroitina.

$\tilde{\nu}$ (cm^{-1})	Origem
730	Posição axial do grupo SO_3^-
822	Posição equatorial do grupo SO_3^-
858	Posição axial do grupo SO_3^-
1035	Estiramento das ligações C–O
1079	Estiramento simétrico das ligações S=O
1248	Estiramento assimétrico das ligações S=O
1418	Estiramento simétrico do grupo COOH
1650	Estiramento antissimétrico do grupo COOH

O potencial ζ do SC medido é igual à $-56,8\text{ mV}$. Conforme foi discutido anteriormente, essa carga negativa é atribuída aos grupos SO_3^- e COO^- , que, em pH igual à 6,8 (pH da solução), encontram-se desprotonados, exibindo assim uma carga negativa, conforme as equações químicas:



A Figura 5.1.4 apresenta as curvas de TG e DTG obtidas da amostra de sulfato de condroitina. A análise da curva TG mostra uma perda total de 61,92% de massa à temperatura de 500 °C por meio de três estágios de decomposição, cujos dados encontram-se listados na Tabela 5.1.2.

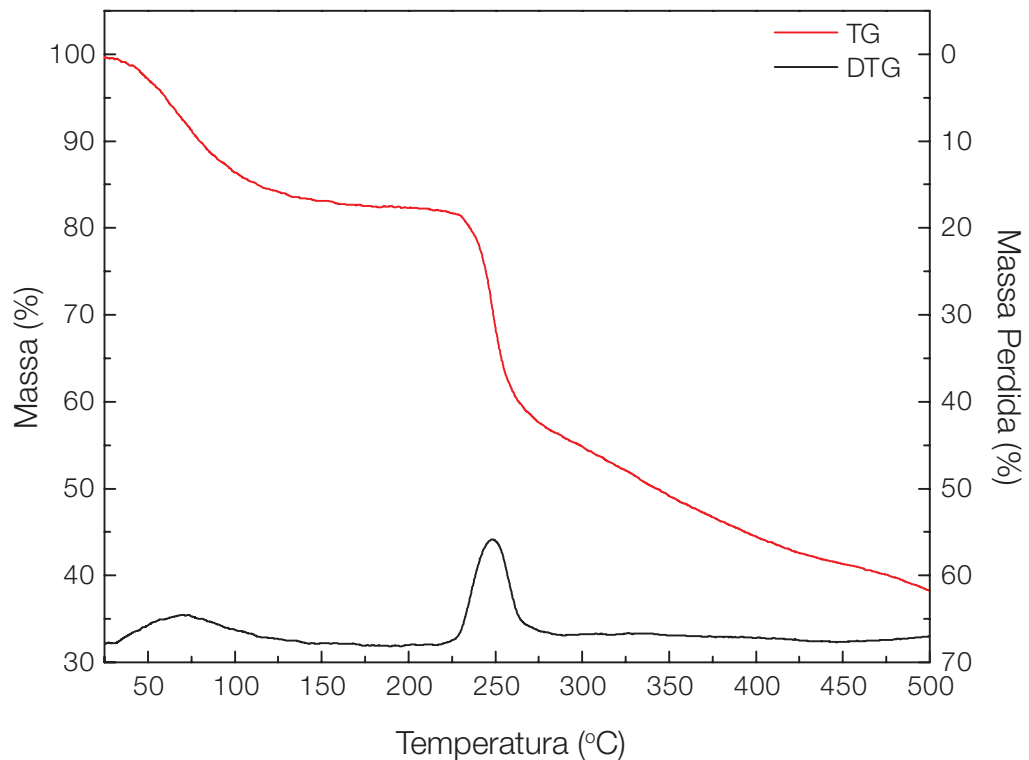


Figura 5.1.4 – Análise termogravimétrica do sulfato de condroitina.

Tabela 5.1.2 – Estágios de decomposição térmica dos sulfato de condroitina.

Estágio	Perda (%)	Posição (°C)	T _{máx} (°C)
I	17,00	25 ~ 186	69,50
II	27,00	186 ~ 287	248,32
III	17,92	287 ~ 500	326,20

*T_{máx}: Temperatura correspondente à maior taxa de decomposição.

De forma geral, a degradação térmica de polímeros pode ser subdividida em três tipos: (1) degradação completa com a ruptura da cadeia principal, (2) ruptura dos fragmentos laterais com a formação de produtos voláteis e resíduos

carbonizados e (3) carbonização extensa com pouca produção de produtos voláteis^[98]. No caso da amostra estudada, observa-se no espectro de TG (Figura 5.1.4) que o primeiro estágio de decomposição inicia-se em 25 °C e estende-se até 186 °C e pode ser atribuído à perda de água remanescente no material. O segundo estágio possui maior a taxa de decomposição e perda de massa, além de ser o de menor extensão. O terceiro estágio, entretanto, possui a maior extensão. Esses dois estágios são associados à decomposição do polímero com carbonização parcial e formação de produtos voláteis.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS

A concentração de ferro presente nas suspensões coloidais produzidas (FMI, contendo nanopartículas de óxido de ferro sem cobertura, FMA e FMB, contendo partículas cobertas com SC através de rotas químicas diferentes) foi obtida a partir de espectros de UV-Vis, que foram analisados com o uso de uma curva padrão de concentração de ferro em função da intensidade da banda de absorção em 460 nm construída a partir de dados obtidos por meio da técnica de absorção atômica.

As concentrações de ferro presentes nas amostras FMI, FMA e FMB são 10,49; 1,05; e 2,44 mg/mL, respectivamente, e estão listadas na Tabela 5.2.1. É possível observar uma diminuição significativa da concentração de ferro nas amostras contendo as nanopartículas cobertas com 4-SC (FMA e FMB) em relação à suspensão cujas nanopartículas não têm cobertura (FMI). Isto pode ser atribuído ao encapsulamento de mais de uma nanopartícula pelo polímero originando aglomerados que foram eliminados com a centrifugação do fluído durante a síntese.

Tabela 5.2.1 – Concentrações de ferro obtidas para as amostras sintetizadas.

Amostra	[Fe] (mg/mL)
FMI	10,49
FMA	1,05
FMB	2,44

O tamanho hidrodinâmico e o potencial ζ das dispersões sintetizadas estão apresentados na Tabela 5.2.2. Os dados mostram que o valor do potencial ζ varia de + 19,70 mV para a suspensão composta por partículas sem cobertura dispersas em meio ácido (FMI) para – 43,30 quando a partícula é funcionalizada com 4-sulfato de condroitina (FMA), indicando a presença da cobertura. O potencial ζ do fluido FMA é proveniente da adsorção dos grupos hidroxilas anfotéricos, conforme foi discutido no item 2.4.2. A carga superficial negativa, presente apenas nos fluidos com sulfato de condroitina, é proveniente dos grupos COO^- e SO_3^- , conforme discutido no item 5.1. No caso da suspensão FMB, onde a partícula foi coprecipitada na presença do polímero, o valor do potencial ζ obtido é igual a – 50,50 mV, confirmando a presença do 4-sulfato de condroitina na superfície das nanopartículas. É importante notar que, conforme foi discutido anteriormente, suspensões estáveis devem apresentar valores absolutos de potencial ζ maiores ou iguais a 30 mV. Em pH ácido, as nanopartículas apresentam-se protonadas, apresentando uma carga positiva (confirmada pelo valor do potencial ζ medido) responsável pela repulsão eletrostática e estabilidade do coloide. Observa-se nos valores tabelados, que, após o encapsulamento das nanopartículas pela técnica de automontagem, houve uma inversão da carga, indicando a presença do 4-SC.

Os valores obtidos para o diâmetro hidrodinâmico do sólido presente nas suspensões foi de 50,75 nm; 105,7 nm e 105,7 nm, para as amostras FMI, FMA e

FMB, respectivamente, conforme os dados listados na Tabela 5.2.2. É possível observar um aumento para as partículas cobertas com 4-SC. Considerando-se a distribuição de tamanho, o diâmetro hidrodinâmico é um valor médio e pode-se inferir que as cadeias poliméricas englobam mais de uma partícula, ou que há interação entre as cadeias de diferentes partículas com formação de *clusters* na suspensão. No entanto os valores obtidos são baixos, quando comparados com a literatura^[45, 46, 99].

Tabela 5.2.2 – Diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ das amostra sintetizadas.

Amostra	FMI	FMA	FMB
D_H	50,75 nm	105,7 nm	105,7 nm
Potencial ζ	+19,70 mV	-43,30 mV	-50,50 mV

A morfologia das partículas sintetizadas e dispersas em meio ácido (FMI) pode ser observada na imagem de MET apresentada na Figura 5.2.1 (a). A imagem mostra que as partículas apresentam, em geral, forma esférica.

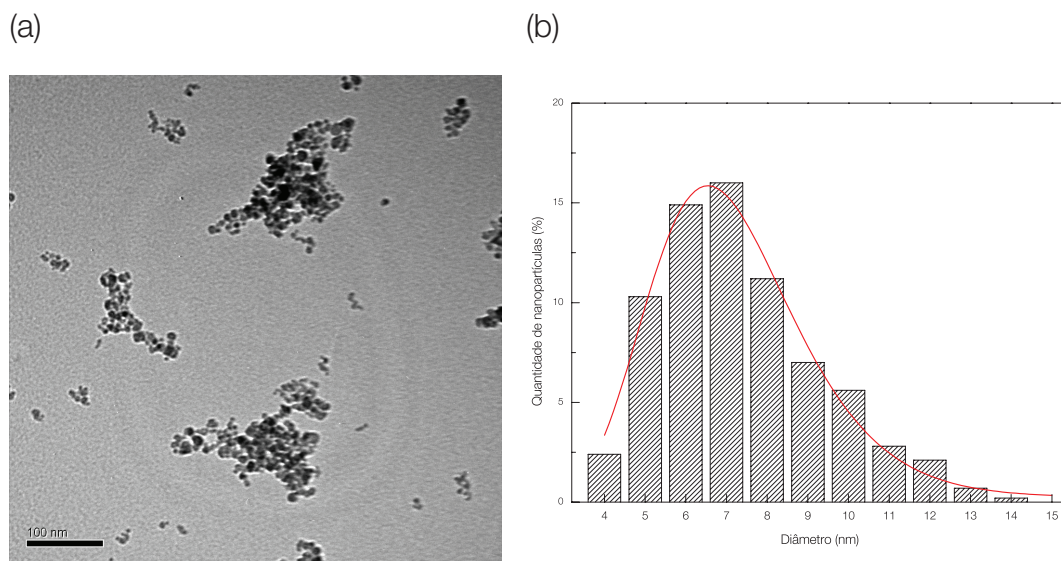


Figura 5.2.1 – (a) Imagem de MET obtida da amostra FMI. (b) Histograma de distribuição do diâmetro de nanopartículas da amostra FMB.

Os dados para construir o histograma apresentado na Figura 5.2.1 (b) foram obtidos a partir de várias micrografias. O ajuste dos dados do histograma foi feito considerando-se a função log-normal, conforme a expressão 3.2.2, e obtendo-se o diâmetro médio $D_{MET} = 7,4 \pm 0,1$ nm, e dispersão de tamanho $\sigma = 0,25 \pm 0,01$ nm, mostrado na Tabela 5.2.3.

Tabela 5.2.3 – Diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas obtido por MET.

Amostra	D_{MET}	σ
FMI	$7,4 \pm 0,1$ nm	$0,25 \pm 0,01$ nm
FMB	$8,3 \pm 0,1$ nm	$0,09 \pm 0,01$ nm

A morfologia das partículas sintetizadas *in situ* na presença de sulfato de condroitina (FMB) pode ser observada na imagem de MET apresentada na Figura 5.2.2 (a). A micrografia mostra que as partículas apresentam forma esférica. Com o ajuste dos dados do histograma (Figura 5.2.2 (b)) por meio da função log-normal (Equação 3.2.2), obteve-se o $D_{MET} = 8,3 \pm 0,1$ nm, e dispersão de tamanho $\sigma = 0,09 \pm 0,01$ nm (Tabela 5.2.3).

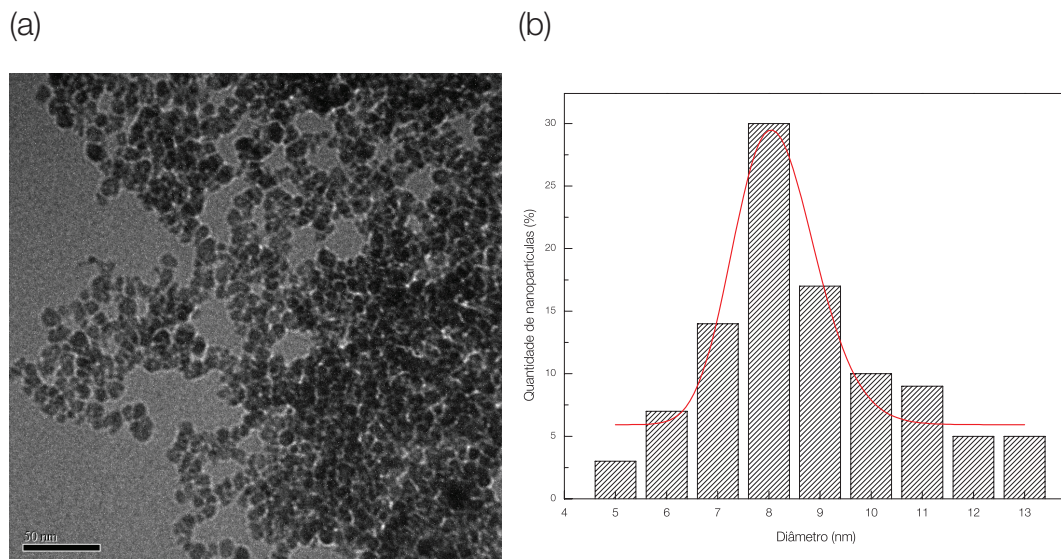


Figura 5.2.2 – (a) Imagem de MET obtida da amostra FMB. (b) Histograma de distribuição do diâmetro de nanopartículas da amostra FMB.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SÓLIDOS NANOPARTICULADOS

Visando a identificação da fase de óxido de ferro dos óxidos de ferro produzidos na forma sólida (amostras SNI, SNA e SNB) foram obtidos espectros Raman das amostras. A Figura 5.3.1 apresenta o espectro Raman, na faixa de 150 a 800 cm^{-1} , das nanopartículas sintetizadas sem cobertura (SNI) e após a funcionalização com 4-SC por meio da técnica de automontagem (SNA). A intensidade do laser incidente foi a mais baixa possível, igual a 0,25 mW, para evitar a degradação da amostra^[74]. Por meio do ajuste com funções lorentzianas do espectro Raman da amostra SNI, observa-se a presença de estruturas em 194, 340, 385, 514, 678 e 719 cm^{-1} . Comparando-se os valores obtidos do ajuste e aqueles previstos pela teoria para o material *bulk* cristalino e também com o de materiais nanoparticulados disponíveis na literatura^[66, 73, 86, 100-107], pode-se associar as estruturas observados no espectro da Figura 5.3.1 aos seguintes modos vibracionais dos óxidos de ferro: 194 (T_{2g}^1), 340 (E_g), 385 ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$), 514 (T_{2g}^2), 678 (A_{1g}) e 719 cm^{-1} ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$). A banda em 719 cm^{-1} é devida à oxidação de íons de Fe (II) presentes no sítio octaédrico. Os modos vibracionais observados nos espectros da Figura 5.3.1, e listados na Tabela 5.3.1, T_{2g}^1 , E_g , T_{2g}^2 e A_{1g} são característicos da magnetita, indicando que as nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas possuem majoritariamente a fase magnetita. Não obstante, é possível observar também os modos atribuídos à fase maghemita^[64, 73, 101, 102], que pode ter sido induzida pelo aumento de temperatura devido à incidência do laser. É importante notar que, no caso dos materiais nanoparticulados, o processo de oxidação de magnetita para maghemita ocorre de forma mais acentuada em comparação à forma *bulk*, ocorrendo mesmo sem ter sido induzido. Isto ocorre devido à alta reatividade da superfície das nanopartículas, conferida pela alta razão superfície-volume. O

espectro Raman da amostra SNA, referente ao material nanoparticulado coberto com 4-SC pela técnica de automontagem, é similar ao da amostra antes da funcionalização (SNI) e é mostrado também na Figura 5.3.1.

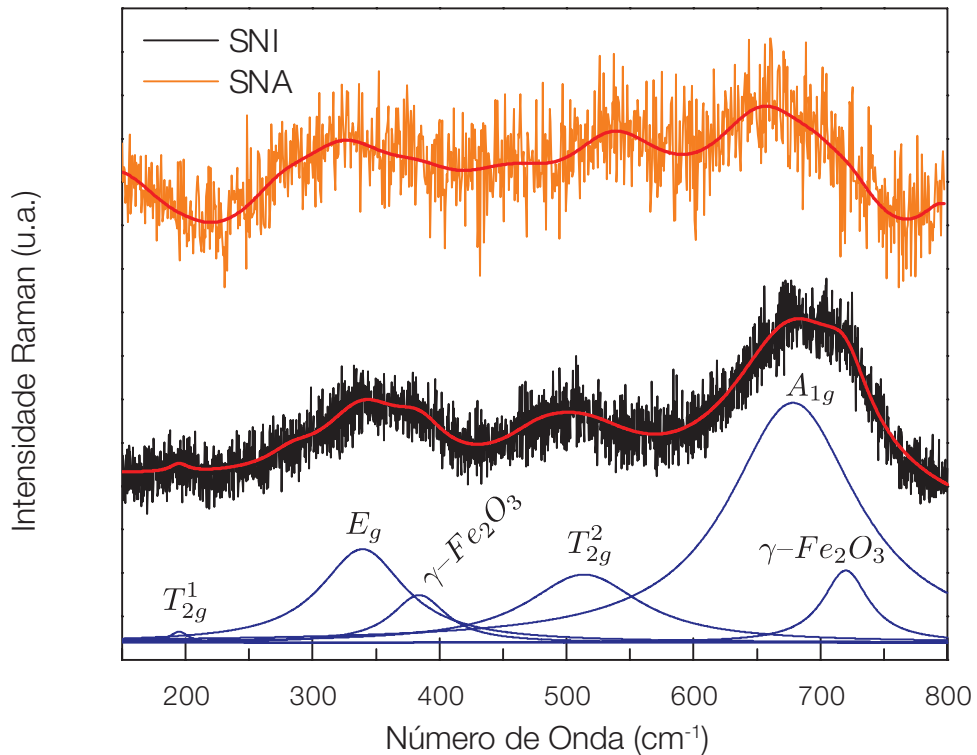


Figura 5.3.1 – Espectro Raman obtido das amostras SNI (preto) e SNA (laranja). Na parte inferior da figura, o ajuste obtido do espectro da amostra SNI utilizando funções lorentzianas.

A Figura 5.3.2 apresenta o espectro Raman obtido da amostra SNB, relativo às nanopartículas sintetizadas na presença de 4-SC. O ajuste empregando funções lorentzianas, mostra a presença de estruturas em 184, 324, 374, 520, 669 e 712 cm⁻¹, atribuídas aos modos vibracionais listados na Tabela 5.3.1.

Apesar de detectadas, as bandas atribuídas à maghemita apresentam baixa intensidade, representando uma oxidação parcial da amostra, o que pode ser atribuído não somente à oxidação natural pelo ambiente, mas também pela degradação causada pelo laser incidente e pelo processo de diálise que os fluidos foram submetidos.

A espectroscopia Raman foi utilizada para o estudo do núcleo magnético, porém, não foi possível observar a presença do 4-SC na superfície das nanopartículas. Para complementar a análise espectroscópica, foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho que serão apresentadas a seguir.

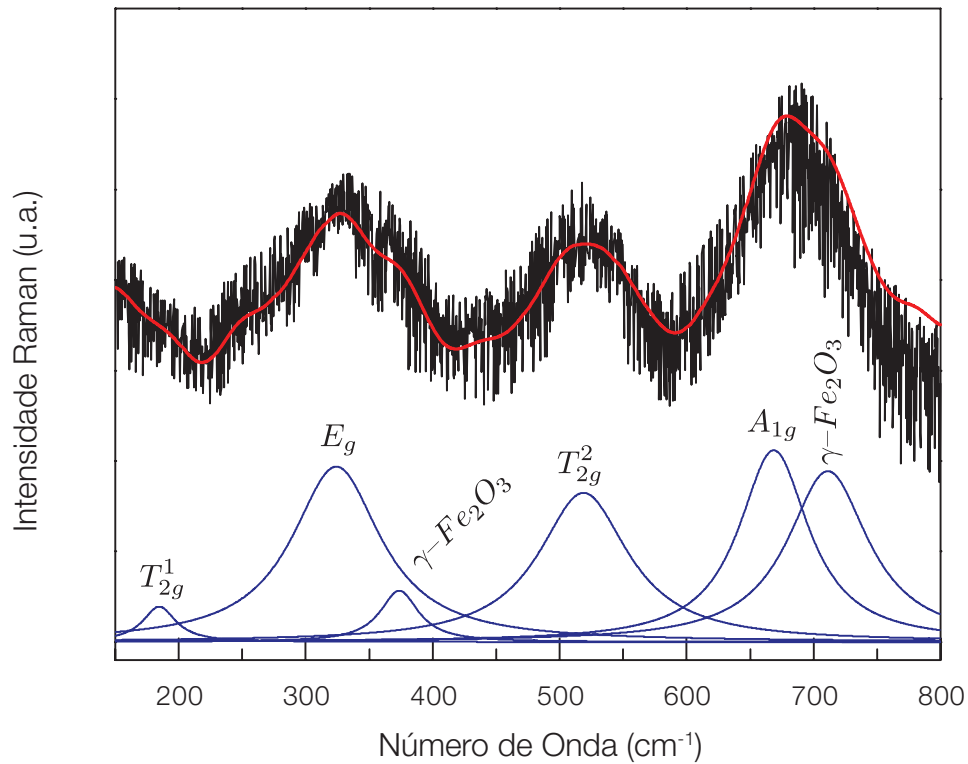


Figura 5.3.2 – Espectro Raman obtido da amostra SNB, produto da síntese realizada na presença de 4-SC, e o respectivo ajuste com as funções lorentzianas.

Tabela 5.3.1 – Modos vibracionais observados nas nanopartículas sintetizadas.

Posição		Modo Vibracional
SNI	SNB	
194 cm ⁻¹	184 cm ⁻¹	T _{2g} ¹
340 cm ⁻¹	324 cm ⁻¹	E _g
385 cm ⁻¹	374 cm ⁻¹	γ - Fe ₂ O ₃
514 cm ⁻¹	520 cm ⁻¹	T _{2g} ²
678 cm ⁻¹	669 cm ⁻¹	A _{1g}
719 cm ⁻¹	712 cm ⁻¹	γ - Fe ₂ O ₃

A Figura 5.3.3 apresenta os espectros infravermelho para as amostras SNA e SNB na região de 500 a 1800 cm⁻¹. O comportamento dos espectros foi analisado comparando-os com o espectro do sulfato de condroitina, apresentado na Figura

5.1.3. Conforme foi discutido anteriormente, as bandas na região entre 1700 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} se referem ao estiramento simétrico e antissimétrico do grupo COOH , neste caso, oriundo do sulfato de condroitina. Além disso, a banda em 1030 cm^{-1} é associada ao estiramento da ligação C-O do ácido glucoronico e da acetilgalactosamina presentes no sulfato de condroitina. Finalmente, as outras bandas observadas são associadas à posição do grupo SO_3^- do sulfato de condroitina e ao estiramento simétrico e antissimétrico das suas ligações S=O . Dessa forma, a espectroscopia confirma a presença do 4-SC associada às nanopartículas por meio da presença das bandas associadas à 4-SC.

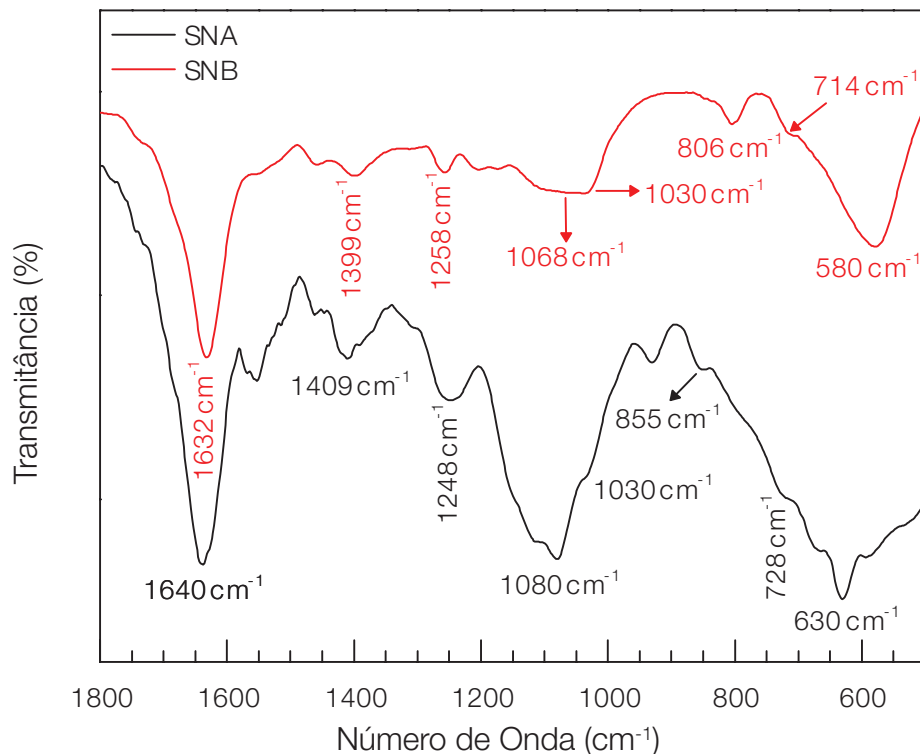


Figura 5.3.3 – Espectros infravermelho obtido para as amostras SNA e SNB, conforme indicação.

Pode-se observar nos espectros da Figura 5.3.3 características que indicam diferenças no modo de interação entre o 4-SC e as nanopartículas nos dois métodos de síntese. Comparando-se as posições das bandas das nanopartículas cobertas com as do sulfato de condroitina puro (usado como controle) é possível observar um

deslocamento $\Delta\tilde{\nu}$ significativo nas bandas referentes ao grupo COOH e ao grupo SO_3^- , assim como à suas ligações S=O (ver Tabela 5.3.2).

Independentemente do método utilizado para o encapsulamento das nanopartículas com o 4-SC, comparando-se a posição da banda em 1035 cm^{-1} do sulfato de condroitina com a banda correspondente nas amostras SNA e SNB, observa-se um deslocamento para a banda situada em 1030 cm^{-1} . Conforme foi mencionado anteriormente, esta banda é associada ao estiramento das ligações C-O da estrutura do SC. Este deslocamento de $\Delta\tilde{\nu} = -5\text{ cm}^{-1}$ (para as amostras SNA e SNB) pode indicar uma interação muito baixa ou nula entre os carbonos e oxigênios da estrutura cíclica do 4-SC com as nanopartículas. Na amostra encapsulada pela técnica por automontagem (SNA), o pequeno deslocamento $\Delta\tilde{\nu} = 1\text{ cm}^{-1}$ para o estiramento simétrico da ligação S=O e a ausência de deslocamento para o estiramento antissimétrico para a mesma ligação, juntamente com o deslocamento médio $\Delta\tilde{\nu} = -2,5\text{ cm}^{-1}$ da posição do grupo SO_3^- , sugere uma interação muito baixa ou nula do grupo SO_3^- com as nanopartículas. Por outro lado, o deslocamento $\Delta\tilde{\nu} = -9\text{ cm}^{-1}$ e $\Delta\tilde{\nu} = -10\text{ cm}^{-1}$ para o estiramento simétrico e antissimétrico, respectivamente, do grupo COOH sugere uma maior interação, em comparação ao grupo SO_3^- , com a superfície das nanopartículas.

Tabela 5.3.2 – Posição das bandas dos espectros infravermelho apresentados nas Figuras 5.1.3 e 5.3.3 das amostras sintetizadas e do sulfato de condroitina. $\Delta\tilde{\nu}$ é o deslocamento da banda em relação à posição no espectro da 4-SC. Dados extraídos dos espectros obtidos.

Amostra	4-SC	SNA		SNB	
	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\Delta\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\Delta\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)
Posição axial SO ₃ ⁻	730	728	-2	714	-16
	858	855	-3	806	-52
Est. C-O	1035	1030	-5	1030	-5
Est. simétrico S=O	1079	1080	1	1068	-11
Est. assimétrico S=O	1248	1248	0	1258	+10
Est. simétrico COOH	1418	1409	-9	1399	-19
Est. antissimétrico COOH	1650	1640	-10	1632	-18

Considerando-se que a posição das bandas oriundas do estiramento simétrico e antissimétrico do grupo COOH na amostra 4-SC se referem à forma iônica livre desse grupo, o pequeno deslocamento listado na Tabela 5.3.2 sugere uma interação eletrostática e não por coordenação entre o grupo e os íons metálicos das nanopartículas, conforme o modelo sugerido na ilustração da Figura 5.3.4, onde as cargas negativas se referem aos terminais SO₃⁻ e COO⁻ do sulfato de condroitina.

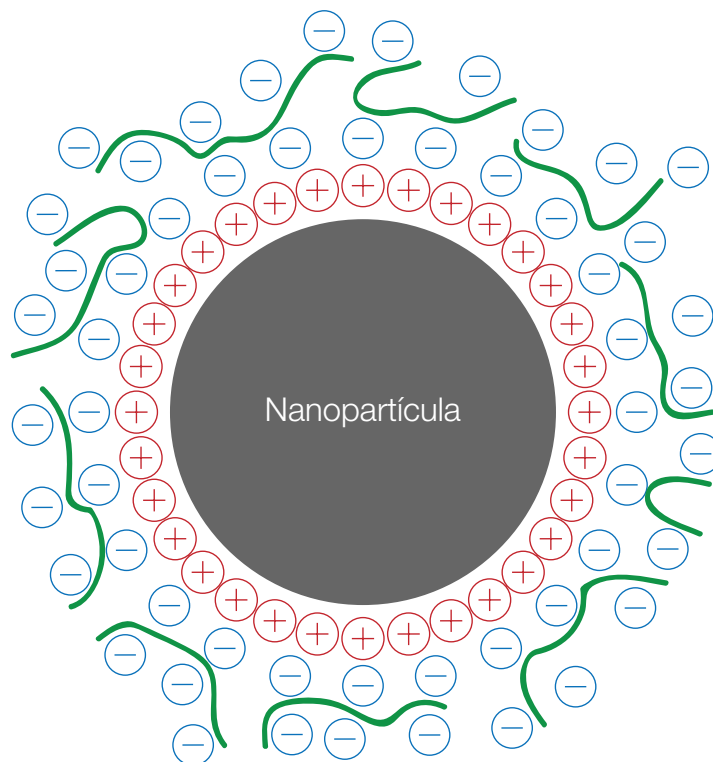


Figura 5.3.4 – Ilustração do modelo proposto para a configuração da superfície das nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas com 4-SC por meio da técnica de automontagem (amostra FMA).

Por outro lado, no caso das nanopartículas sintetizadas na presença do sulfato de condroitina (SNB), o deslocamento das bandas é mais acentuado: ambos grupos (COO^- e SO_3^-) possuem deslocamentos significativos ($\Delta\tilde{\nu} \geq 10 \text{ cm}^{-1}$), sugerindo uma coordenação entre o ferro presente na superfície das nanopartículas e os grupos do 4-SC. Entretanto, o grupo SO_3^- , por possuir um deslocamento maior, predominaria na interação com as nanopartículas.

A coordenação entre o grupo carboxílico e metais pode ocorrer de diferentes formas, conforme a ilustração apresentada na Figura 5.3.5. Por meio da análise de espectros obtidos no infravermelho, é possível obter a informação sobre a ocorrência destes tipos de interação^[108].

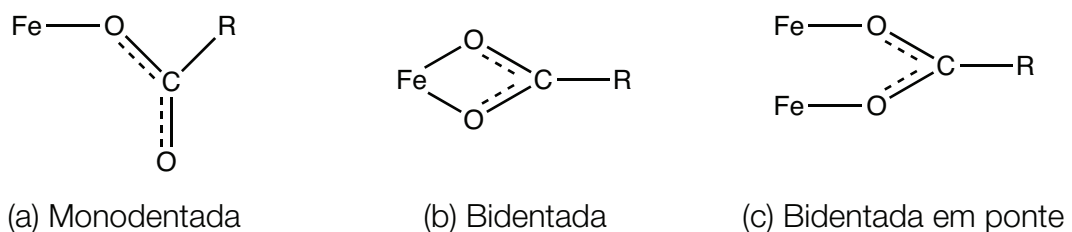


Figura 5.3.5 – Ilustração dos tipos de coordenação do grupo carboxílico com íons metálicos. No exemplo, o íon metálico é representado pelo ferro.

Considerando-se a diferença ($\Delta\tilde{\nu}$) entre a posição da vibração antissimétrica ($\tilde{\nu}_{as}$) e da vibração simétrica ($\tilde{\nu}_s$) dos carboxilatos, pode-se obter um indicativo do tipo de coordenação. Para as nanopartículas sintetizadas na presença de sulfato de condroitina (SNB), obteve-se um deslocamento $\Delta\tilde{\nu} = 233 \text{ cm}^{-1}$ que sugere uma coordenação entre o carboxilato e os íons metálicos das nanopartículas do tipo monodentada. Baseando-se na análise apresentada, e no meio que a partícula está suspensa, o modelo de interação da cobertura com a partícula sugerido é ilustrado na Figura 5.3.6.

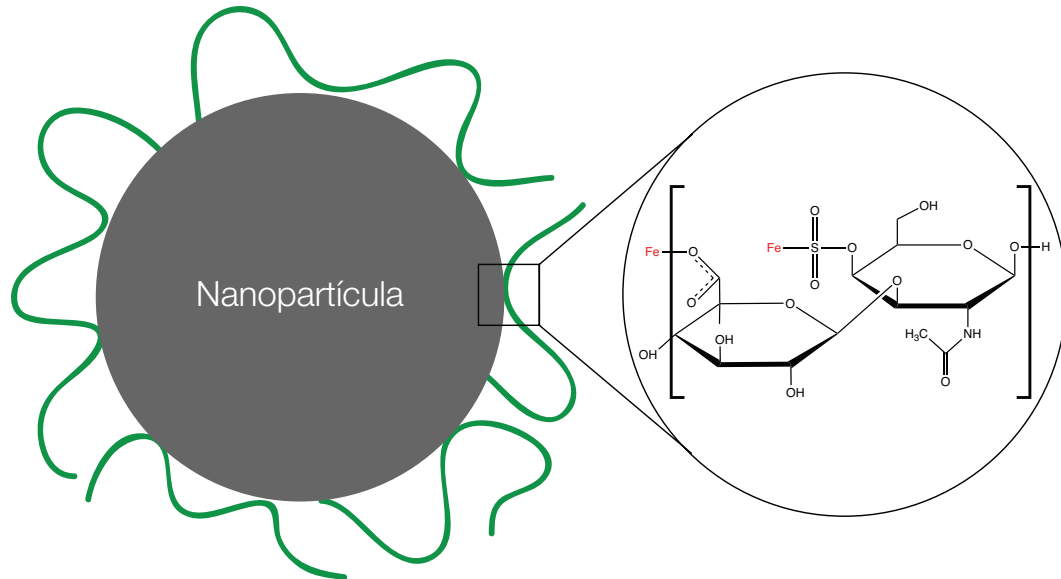


Figura 5.3.6 – Ilustração do modelo proposto para a coordenação entre o 4-SC e as nanopartículas sintetizadas com 4-SC *in situ* (amostra SNB).

Por meio da análise termogravimétrica obtida das amostras SNI e SNB (Figura 5.3.7), é possível observar 2 estágios de decomposição térmica na amostra SNI e 3 estágios na amostra SNB, cujos dados são apresentados na Tabela 5.3.3. A perda total de massa da amostra SNI foi de 3,60%, tendo perdido 2,97% no primeiro estágio, que se estende de 25 a 170 °C, e 0,75% no segundo estágio, na faixa de temperatura de 170 a 360 °C. A variação da massa no primeiro estágio é atribuída à perda de água remanescente no material, enquanto que no segundo se refere à água adsorvida na superfície das nanopartículas^[109]. Por outro lado, a perda total de massa da amostra SNB foi de 8,93%, oriundo de 3 estágios, distribuídos entre 25 a 163 °C, 163 a 195 °C e 195 a 440 °C, sendo o primeiro referente à perda de água remanescente na amostra, o segundo referente à água adsorvida nas nanopartículas, e o último, mais importante, à decomposição térmica do sulfato de condroitina.

O primeiro estágio em ambas amostras, atribuído à perda de água remanescente após a liofilização, inicia-se na mesma temperatura (25 °C) e a sua

extensão é bastante próxima ($\Delta T = - 7 \text{ }^\circ\text{C}$). A perda da massa também possui grande proximidade ($\Delta P = 0,48\%$). No segundo estágio, que é atribuído à perda de água adsorvida nas nanopartículas, é possível observar uma maior perda de água adsorvida nas nanopartículas sem cobertura (0,75%), o que pode ser associado à área superficial exposta das nanopartículas, permitindo maior adsorção de água. No caso das nanopartículas associadas com 4-SC, a sua superfície encontra-se coberta pelo polímero, impedindo uma maior adsorção de água. Finalmente, o último estágio de decomposição térmica, presente apenas nas amostras cobertas com 4-SC, é associado à decomposição térmica do polímero.

Tabela 5.3.3 – Estágios de decomposição térmica das amostras sintetizada.

Amostra	SNI			SNB		
	Perda (%)	Posição ($^\circ\text{C}$)	Atribuição	Perda (%)	Posição ($^\circ\text{C}$)	Atribuição
I	2,97	25 ~ 170	Água remanescente	2,49	25 ~ 163	Água remanescente
II	0,75	170 ~ 360	Água adsorvida	0,33	163 ~ 195	Água adsorvida
III	–	–	–	6,23	195 ~ 440	4-SC adsorvida

Por meio das curvas de TG, é possível calcular a quantidade de 4-SC associada às nanopartículas, assim como calcular a concentração das mesma no fluido, considerando-se que o último estágio se refere à perda de 4-SC. Dessa forma, as nanopartículas sintetizadas com 4-SC *in situ* (FMB), quando dispersas em meio aquoso neutro, apresentaram uma concentração de 4-SC igual à 6,23% (p/p).

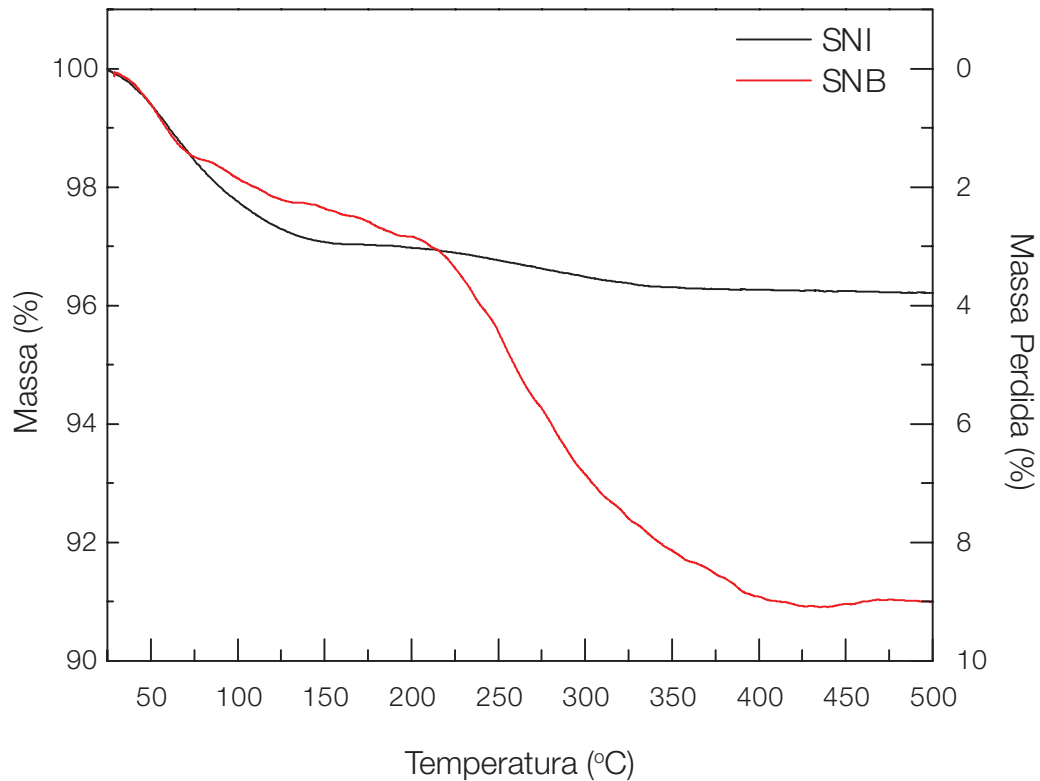


Figura 5.3.7 – Curvas termogravimétricas obtidas das nanopartículas sintetizadas com sulfato de condroitina *in situ* (SNB) e sem cobertura (SNI).

5.4 ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS EM MEIO BIOLÓGICO

Considerando-se o objetivo de desenvolver complexos magnéticos, cujo núcleo magnético é utilizado como plataforma para transporte e liberação de drogas, foi desenvolvido um estudo sobre a estabilidade das suspensões preparadas em meio biológico, por exemplo, em meio de cultura DMEM e solução tampão fosfato (PBS). O meio de cultura DMEM foi utilizado devido ao seu uso padrão no cultivo de células de fibroblastos, que são células da linhagem paralela dos condrócitos e condroblatos, presentes nos tecidos cartilagosos^[36]. O tampão PBS foi utilizado porque é um componente dos meios de cultura, incluindo o DMEM.

O monitoramento da estabilidade das suspensões nos dois meios foi realizado em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas após a síntese, por meio de medidas do diâmetro hidrodinâmico e inspeção visual. A Figura 5.4.1 mostra as

imagens obtidas das suspensões (FMI, FMA e FMB), bem como das mesmas dispersões diluídas com meio de cultura DMEM ou com solução tampão fosfato.

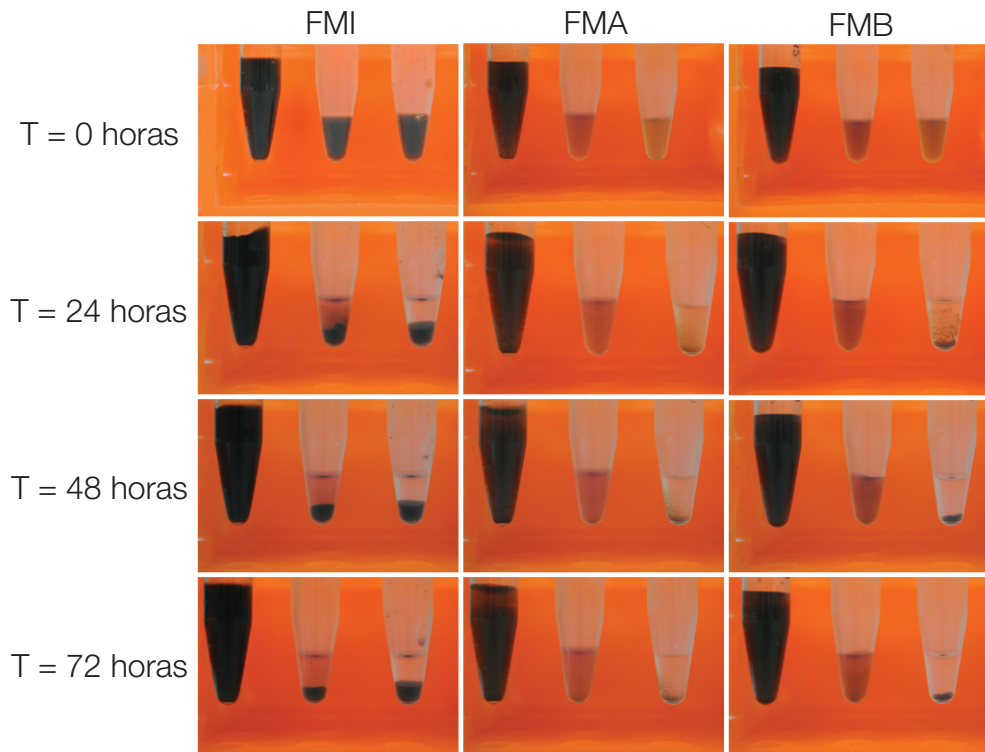


Figura 5.4.1 – Imagens obtidas no monitoramento da estabilidade coloidal dos FMs produzidos. Para cada coluna relativa ao tipo de FM, o primeiro tubo à esquerda é o FM puro, o segundo é o FM diluído em meio de cultura DMEM e o terceiro tubo é o FM diluído em tampão fosfato.

Observa-se nas imagens que os fluídos magnéticos apresentaram estabilidade diferenciada. Os dados do monitoramento da estabilidade das suspensões preparadas, e das mesmas misturadas com solução tampão ou meio de cultura DMEM, por meio das imagens apresentadas na Figura 5.4.1, estão listados na Tabela 5.4.1, enquanto as medidas do diâmetro hidrodinâmico na Tabela 5.4.2.

Tabela 5.4.1 – Análise da sedimentação e separação de fases dos coloides produzidos a partir das imagens apresentadas na Figura 5.4.1.

Amostra	FMI			FMA			FMB		
	Puro	DMEM	PBS	Puro	DMEM	PBS	Puro	DMEM	PBS
0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	++	T	+	++++	++++	–	+	++++
48	–	T	T	++	T	T	–	+	T
72	–	T	T	++	T	T	–	++	T

T: Precipitação total da amostra com separação de fases. De + a ++++: desenvolvimento da separação de fases, sendo ++++ separação de fases evidente juntamente com a presença de precipitados, porém, com material ainda suspenso. A avaliação da quantidade de precipitados está relacionado unicamente com a mesma amostra (diluída ou não) nos diferentes tempos analisados e portanto não é comparável com a de outras amostras.

A análise das imagens (Figura 5.4.1) e dos dados da Tabela 5.4.1 mostra que as amostra das suspensões FMI e FMB, ou seja referentes ao FM composto por partículas sem cobertura e sintetizados com 4-SC *in situ*, respectivamente, apresentaram estabilidade coloidal durante o tempo todo do período investigado (72 horas), não sendo possível observar sedimentos. Por outro lado, a amostra da suspensão FMA, preparada com as nanopartículas encapsuladas com 4-SC por meio da técnica de automontagem, apresentou o início do processo de separação de fases em torno de 24 horas após o monitoramento. Quanto à estabilidade em tampão fosfato, todos os fluídos apresentaram precipitados em T = 24 horas. Para a amostra FMI, sem cobertura, este fenômeno pode ser explicado pela alteração do pH do meio, pois a amostra foi preparada em pH 3, obtendo-se a estabilidade eletrostática, conforme foi discutido anteriormente. Ao adicionar o tampão fosfato ou o meio de cultura DMEM, o pH é alterado para pH 7,2 e, em consequência, as nanopartículas deixam de apresentar carga superficial suficiente para repulsão, formando assim aglomerados que levam à precipitação. Para a suspensão FMA, com as nanopartículas encapsuladas com 4-SC por meio da técnica de automontagem, apesar de que o coloide foi preparado no mesmo pH do tampão, o fenômeno pode ser explicado considerando-se uma competição entre os íons (Na⁺,

K^+ e H^+) e contra-íons (Cl^- e PO_4^-) presentes no tampão com as cargas negativas do 4-SC, que interagem com as cargas positivas da superfície das partículas. Observa-se como resultado uma preferência pela interação dos íons da solução tampão com a superfície das partículas que desloca o equilíbrio, levando à uma remoção do 4-SC da superfície das partículas. Em consequência, da mesma forma que ocorre nas suspensões dispersas em meio neutro, as nanopartículas se aglomeram e precipitam. Um comportamento similar foi observado quando as suspensões coloidais foram expostas ao meio de cultura DMEM, pelos mesmos motivos já discutidos.

O coloide preparado na presença de 4-SC, amostra (FMB) apresentou comportamento diferenciado dos demais. Observa-se na Tabela 5.4.1, bem como nas imagens da Figura 5.4.1, que a amostra FMB apresentou maior estabilidade no meio de cultura DMEM, entretanto, foi possível observar o início da separação de fase em $T = 24$ horas, comportamento este que se acentuou em função do tempo estudado, porém, sem ocorrência da precipitação total da amostra. Observa-se na Tabela 5.4.2 que o diâmetro hidrodinâmico aumenta com a adição do tampão fosfato e do meio de cultura DMEM independente do tipo de coloide.

Tabela 5.4.2 – Diâmetro hidrodinâmico das amostras obtidas na análise de estabilidade.

Amostra	FMI			FMA			FMB		
	Puro	DMEM	PBS	Puro	DMEM	PBS	Puro	DMEM	PBS
0	50,7 nm	105,7 nm	295,3 nm	105,7 nm	342,0 nm	396,1 nm	105,7 nm	396,1 nm	220,2 nm
24	50,7 nm	–	–	–	–	–	342,0 nm	–	–
48	28,2 nm	–	–	–	–	–	122,4 nm	–	–
72	50,7 nm	–	–	–	–	–	220,2 nm	–	–

– : Dado não obtido devido à limitação da técnica e do equipamento proveniente da presença de precipitados.

Quanto às medidas do diâmetro hidrodinâmico, é possível observar um aumento desse nos fluídos que encontram-se diluídos. Este fenômeno é atribuído à aglomeração das nanopartículas pelos motivos explicados anteriormente. Devido à presença desses aglomerados e, conseqüentemente, precipitados, não foi possível

obter os diâmetros hidrodinâmicos dos fluídos após 24 horas pela técnica de EDL. Mesmo com um diâmetro hidrodinâmico relativamente grande, ao ser comparado com outros estudos, é possível observar que este possui tamanho inferior, o que proporciona uma maior facilidade na adsorção pelas células, fator importante para aplicações em nanomedicina, em especial nos sistemas de entrega de drogas^[23, 24].

6 CONCLUSÃO

Neste projeto foram produzidos complexos magnéticos formados por nanopartículas de óxido de ferro com o glicosaminoglicano natural sulfato de condroitina. Os complexos foram dispersos em meio aquoso com pH neutro visando aplicações biomédicas. Foram empregados dois métodos para sintetizar as nanopartículas de magnetita cobertas com 4-sulfato de condroitina. As características dos nanomateriais produzidos foram obtidas por meio de técnicas de espectroscopia Raman e no infravermelho, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamento dinâmico de luz (EDL). No primeiro método de síntese, as nanopartículas de óxido de ferro foram obtidas por meio da técnica de coprecipitação em meio aquoso por hidrólise alcalina. Em seguida, o FMI foi funcionalizado com 4-SC empregando-se a técnica de automontagem. Na outra abordagem, as nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas na presença do sulfato de condroitina e dispersas em meio aquoso com pH neutro.

Os resultados da caracterização dos fluidos magnéticos sintetizados mostraram que a interação entre a cobertura e a superfície da partícula ocorre devido à interação eletrostática entre as cargas positivas das nanopartículas e as cargas negativas do sulfato de condroitina no primeiro método de síntese. No segundo método, ocorre uma coordenação entre o ferro das nanopartículas e os grupos sulfônico e carboxílico do sulfato de condroitina.

Visando a confecção de coloides estáveis para aplicações biológicas, a estabilidade dos fluídos produzidos foi monitorada em função do tempo de armazenamento. Os fluídos produzidos, assim como diluições desses em meio de cultura DMEM e tampão fosfato salino, foram monitorados visualmente e por meio

da técnica de EDL 24, 48 e 72 horas após o preparo das amostras. O meio de cultura DMEM foi utilizado como diluente devido ao seu uso como meio de cultura padrão em cultivos celulares de células de fibroblastos. Os fibroblastos são células que possuem origem nas células-tronco mesenquimais, que também dão origem aos condrócitos e condroblastos, células essas que são responsáveis pela produção e manutenção do tecido cartilaginoso. O tampão fosfato salino foi utilizado pois ele é o principal solvente utilizado no meio de cultura DMEM. De forma geral, constatou-se que o fluído funcionalizado por meio da técnica de automontagem possui estabilidade coloidal inferior à do fluído produzido com sulfato de condroitina *in situ*.

Neste trabalho, foram desenvolvidos diferentes protocolos para a obtenção de complexos nanoestruturados na forma de coloides de nanopartículas de óxido de ferro estabilizados através da adsorção do biopolímero 4-sulfato de condroitina. Observou-se que a metodologia empregada na síntese interfere não somente no tipo de interação entre o surfactante e as nanopartículas, mas também na estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos em meio biológico, tais como solução tampão fosfato e meio de cultura DMEM. Os resultados mostraram que os complexos, cuja nanopartícula de óxido de ferro foi sintetizada em presença de 4-SC, apresentaram maior estabilidade em meio biológico.

Este novo biocomplexo nanoestruturado, formado por um veículo carreador (nanopartículas de óxido de ferro) e pelo fármaco (4-sulfato de condroitina), mostra-se promissor para aplicações em nanomedicina, especialmente no tratamento da osteoartrite, considerando-se que o uso do sulfato de condroitina tem sido indicado para o tratamento, regeneração e produção de tecidos. As perspectivas futuras referentes aos complexos produzidos neste trabalho incluem o estudo da citotoxicidade dos coloides produzidos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e o estudo da

eficiência terapêutica do complexo nanoestruturado produzido para o tratamento da osteoartrite.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALIVISATOS, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 933-937, 1996.
- [2] SOLER, M. A. G., et al. **Superparamagnetic Iron Oxides**. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. H.S.NALWA: American Scientific Publishers, v. 23: p 513-532. 2011.
- [3] ZHU, Y., et al. A novel open-tubular capillary electrochromatography with magnetic nanoparticle coating as stationary phase. **Electrophoresis**, v. 33, n. 2, p. 340-347, 2012.
- [4] PANKHURST, Q. A., et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R167, 2003.
- [5] GRZELCZAK, M., et al. Directed self-assembly of nanoparticles. **ACS Nano**, v. 4, n. 7, p. 3591-605, 2010.
- [6] PERÁN, M., et al. Functionalized Nanostructures with Application in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3847-3886, 2012.
- [7] GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.
- [8] MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.
- [9] ISLAM, T.; JOSEPHSON, L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Cancer Biomark**, v. 5, n. 2, p. 99-107, 2009.
- [10] MAZZUCHELLI, S., et al. Single-Domain Protein A-Engineered Magnetic Nanoparticles: Toward a Universal Strategy to Site-Specific Labeling of Antibodies for Targeted Detection of Tumor Cells. **ACS Nano**, v. 4, n. 10, p. 5693-5702, 2010.
- [11] RACHAKATLA, R. S., et al. Attenuation of Mouse Melanoma by A/C Magnetic Field after Delivery of Bi-Magnetic Nanoparticles by Neural Progenitor Cells. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7093-7104, 2010.
- [12] CASULA, M. F., et al. Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Based on Iron Oxide Superparamagnetic Ferrofluids. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 5, p. 1739-1748, 2010.
- [13] MINELLI, C.; LOWE, S. B.; STEVENS, M. M. Engineering nanocomposite materials for cancer therapy. **Small**, v. 6, n. 21, p. 2336-57, 2010.

- [14] MAHMOUDI, M., et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Promises for Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 118-140, 2011.
- [15] CHEN, Z., et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicology Letters**, v. 163, n. 2, p. 109-20, 2006.
- [16] ALCANTARA, G. B., et al. Dielectric properties of cobalt ferrite nanoparticles in ultrathin nanocomposite films. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 45, p. 19853-19861, 2013.
- [17] ALCANTARA, G. B., et al. Layer-by-Layer Assembled Cobalt Ferrite Nanoparticles for Chemical Sensing. **Journal of Nanofluids**, v. 2, n. 3, p. 175-183, 2013.
- [18] VIALI, W. R., et al. Investigation of the Molecular Surface Coating on the Stability of Insulating Magnetic Oils. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 1, p. 179-188, 2009.
- [19] BLUMS, E. S.; CEBERS, A. O.; MAIOROV, M. M. **Magnetic Fluids**. De Gruyter, 2010. 430
- [20] SRIVASTAVA, M., et al. Synthesis of superparamagnetic bare Fe₃O₄ nanostructures and core/shell (Fe₃O₄/alginate) nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3, p. 821-829, 2012.
- [21] PATERNO, L. G., et al. Fabrication and characterization of nanostructured conducting polymer films containing magnetic nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 517, n. 5, p. 1753-1758, 2009.
- [22] THÜNEMANN, A. F., et al. Maghemite Nanoparticles Protectively Coated with Poly(ethylene imine) and Poly(ethylene oxide)-block-poly(glutamic acid). **Langmuir**, v. 22, n. 5, p. 2351-2357, 2006.
- [23] BECKER, A. L.; JOHNSTON, A. P. R.; CARUSO, F. Layer-By-Layer-Assembled Capsules and Films for Therapeutic Delivery. **Small**, v. 6, n. 17, 2010.
- [24] MU, B., et al. Encapsulation of drug microparticles with self-assembled Fe₃O₄/alginate hybrid multilayers for targeted controlled release. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100B, n. 3, p. 825-831, 2012.
- [25] LIM, J. J.; TEMENOFF, J. S. The effect of desulfation of chondroitin sulfate on interactions with positively charged growth factors and upregulation of cartilaginous markers in encapsulated MSCs. **Biomaterials**, 2013.
- [26] ZINELLU, E., et al. Association between Human Plasma Chondroitin Sulfate Isomers and Carotid Atherosclerotic Plaques. **Biochemistry Research International**, v. 2012, p. 281284, 2012.

- [27] ZAMFIR, A. D., et al. Brain chondroitin/dermatan sulfate, from cerebral tissue to fine structure: extraction, preparation, and fully automated chip-electrospray mass spectrometric analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 836, p. 145-59, 2012.
- [28] YUE, J., et al. Chondroitin sulfate and/or glucosamine hydrochloride for Kashin-Beck disease: a cluster-randomized, placebo-controlled study. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 20, n. 7, p. 622-9, 2012.
- [29] YU, P., et al. Myosin II activity regulates neurite outgrowth and guidance in response to chondroitin sulfate proteoglycans. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 6, p. 1117-28, 2012.
- [30] TANIGUCHI, S., et al. Long-term oral administration of glucosamine or chondroitin sulfate reduces destruction of cartilage and up-regulation of MMP-3 mRNA in a model of spontaneous osteoarthritis in Hartley guinea pigs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 5, p. 673-8, 2012.
- [31] TANAKA, K., et al. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e27922, 2012.
- [32] STEINMETZ, N. J.; BRYANT, S. J. Chondroitin sulfate and dynamic loading alter chondrogenesis of human MSCs in PEG hydrogels. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012.
- [33] SHIMAZAKI, A., et al. Gangliosides and chondroitin sulfate desensitize and internalize B2 bradykinin receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, n. 1, p. 193-8, 2012.
- [34] MILLER, K. L.; CLEGG, D. O. Glucosamine and Chondroitin Sulfate. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 103-118, 2011.
- [35] DECHANT, J. E., et al. Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explant metabolism. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 227-31, 2005.
- [36] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 11^a edição. Editora Guanabara Koogan, 2008.
- [37] MAINRECK, N., et al. Rapid characterization of glycosaminoglycans using a combined approach by infrared and Raman microspectroscopies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 441-450, 2011.
- [38] GROGAN, K. A.; CHANG, T. J.; SALK, R. S. Update on viscosupplementation in the treatment of osteoarthritis of the foot and ankle. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 26, n. 2, p. 199-204, 2009.
- [39] MATSUMOTO, Y., et al. Development of a wound dressing composed of a hyaluronic acid sponge containing arginine. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 20, n. 7-8, p. 993-1004, 2009.

- [40] KREMER, M.; LANG, E.; BERGER, A. Evaluation of dermal—epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra™ Artificial Skin). **British Journal of Plastic Surgery**, v. 53, n. 6, p. 459-465, 2000.
- [41] HARLAN, R. S.; HAUT, R. C.; ORTH, M. W. The Effect of Glucosamine and Chondroitin on Stressed Equine Cartilage Explants. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 1, p. 12-14, 2012.
- [42] FRISBIE, D. D., et al. Assessment of Intravenous or intra-articular hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and N-acetyl-D-glucosamine (Polyglycan) in treatment of osteoarthritis using an equine experimental model. **American Association of Equine Practitioners Annual Convention**, p. 61, 2009.
- [43] KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W. Comparison of Synovial Fluid in Middle Carpal Joints Undergoing Needle Aspiration, Infusion with Saline, and Infusion with a Combination of N-Acetyl-d-Glucosamine, Hyaluronic Acid, and Sodium Chondroitin Sulfate. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 4, p. 155-159, 2011.
- [44] AOYAGI, M., et al. Redox reactions of nitrite ions on the surface of colloidal magnetite particles coated with chondroitin sulfate. **Colloid & Polymer Science**, v. 279, n. 1, p. 46-52, 2001.
- [45] WILSON, C. G., et al. Glycosaminoglycan-functionalized gold nanorods: interactions with cardiac cells and type I collagen. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6332-6340, 2009.
- [46] GUILHERME, M. R., et al. Smart hollow microspheres of chondroitin sulfate conjugates and magnetite nanoparticles for magnetic vector. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 352, n. 1, p. 107-113, 2010.
- [47] JILES, D. **Introduction to the Electronic Properties of Materials**. 2nd ed. Reino Unido: Nelson Thornes, 2001.
- [48] CHARAP, S. H. Magnetic Moments in Solids. In: BERKOWITZ, A. E. e KNELLER, E. (Ed.). **Magnetism and Metallurgy**. New York: Academic Press, INC, v.1, 1969. cap. 1,
- [49] GUIMARÃES, A. P. **Principles of Nanomagnetism**. New York: Springer, 2009. 221
- [50] ELMORE, W. C. The Magnetization of Ferromagnetic Colloids. **Physical Review**, v. 54, n. 12, p. 1092-1095, 1938.
- [51] BEAN, C. P.; LIVINGSTON, J. D. Superparamagnetism. **Journal of Applied Physics**, v. 30, n. 4, p. S120-S129, 1959.
- [52] CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials** New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 544
- [53] KITTEL, C. Theory of the Structure of Ferromagnetic Domains in Films and Small Particles. **Physical Review**, v. 70, n. 11-1, p. 965-971, 1946.

- [54] NÉEL, L. Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec application aux terres cuites. **Annales de Géophysique**, v. 5, p. 99-136, 1949.
- [55] JENG, H. T.; GUO, G. Y. First-principles investigations of the electronic structure and magnetocrystalline anisotropy in strained magnetite Fe₃O₄. **Physical Review B**, v. 65, n. 9, 2002.
- [56] WILLARD, M. A., et al. Chemically prepared magnetic nanoparticles. **International Materials Reviews**, v. 49, n. 3-4, p. 125-170, 2004.
- [57] KHALAFALLA, S. E.; TEIMERS, G. W. **Magnetofluids and their Manufacture**. PATENT, U. S. United States of America, 1973.
- [58] MASSART, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981.
- [59] RUSSEL, W. B.; SCHOWALTER, W. R.; SAVILLE, D. A. **Colloidal dispersions**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [60] ROSENSWEIG, R. E. **Ferrohydrodynamics**. New York: Dover Publications, 1985.
- [61] BACRI, J.-C., et al. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 85, n. 1-3, p. 27-32, 1990.
- [62] ALCÂNTARA, G. B. **Nanopartículas de Maguemita Complexadas com Ácido Oleico**. 2007. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília. 2007.
- [63] SHAFI, K. V. P. M., et al. Sonochemical synthesis of functionalized amorphous iron oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 17, n. 16, p. 5093-5097, 2001.
- [64] SOLER, M. A. G., et al. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. **Surface Science**, v. 601, n. 18, p. 3921-3925, 2007.
- [65] LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C. Técnicas de preparação de nanopartículas magnéticas e fluidos magnéticos. In: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C., et al. (Ed.). **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações**. São Paulo: Artliber, 2006. p.83-99.
- [66] SHEBANOVA, O. N.; LAZOR, P. Raman spectroscopic study of magnetite (Fe₃O₄): a new assignment for the vibrational spectrum. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 174, n. 2, p. 424-430, 2003.
- [67] SOLER, M. A. G.; FANYAO, Q. Raman Spectroscopy of Iron Oxide Nanoparticles. In: KUMAR, C. S. S. R. (Ed.). **Raman Spectroscopy of Nanomaterials Characterization**. Berlin: Springer, 2012. p.379-416.
- [68] SOLER, M. A. G., et al. Raman spectroscopy of magnetoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 1-3, p. 415-417, 2002.

- [69] MORAIS, P. C., et al. Raman study of ionic water-based copper and zinc ferrite magnetic fluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, p. 105-109, 1999.
- [70] MORAIS, P. C., et al. Raman spectroscopy in magnetic fluids. **Biomolecular Engineering**, v. 17, n. 2, p. 41-49, 2001.
- [71] MORAIS, P. C., et al. Raman investigation of uncoated and coated magnetic fluids. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 104, n. 13, p. 2894-2896, 2000.
- [72] MORAIS, P. C., et al. Raman spectroscopy in oleoylsarcosine-coated magnetic fluids: A surface grafting investigation. **Ieee Transactions on Magnetics**, v. 36, n. 5, p. 3712-3714, 2000.
- [73] JACINTHO, G. V. M., et al. Structural Investigation of MFe_2O_4 (M = Fe, Co) Magnetic Fluids. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 18, p. 7684-7691, 2009.
- [74] SOLER, M. A. G., et al. Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272, p. 2357-2358, 2004.
- [75] SARTORATTO, P. P. C., et al. Size-modulation of thermally-annealed nanosized cobalt ferrite particles. In: YAMAGUCHI, H. (Ed.). **12th International Conference on Magnetic Fluids Icmf12**, v.9, 2010. p.10-14. (Physics Procedia). ISBN 1875-3892.
- [76] DA SILVA, S. W., et al. Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: A Raman spectroscopy investigation. **Ieee Transactions on Magnetics**, v. 39, n. 5, p. 2645-2647, 2003.
- [77] SOLER, M. A. G., et al. Surface passivation and characterization of cobalt-ferrite nanoparticles. **Surface Science**, v. 575, n. 1-2, p. 12-16, 2005.
- [78] MELO, T. F. O., et al. Investigation of surface passivation process on magnetic nanoparticles by Raman spectroscopy. **Surface Science**, v. 600, n. 18, p. 3642-3645, 2006.
- [79] VIALI, W. R., et al. Investigation of the Molecular Surface Coating on the Stability of Insulating Magnetic Oils. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 1, p. 179-188, 2010.
- [80] SOLER, M. A. G., et al. Spectroscopic Study of Maghemite Nanoparticles Surface-Grafted with DMSA. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 6, p. 1003-1008, 2011.
- [81] PEDROZA, R. C., et al. Raman study of nanoparticle-template interaction in a $CoFe_2O_4/SiO_2$ -based nanocomposite prepared by sol-gel method. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 139-141, 2005.

- [82] PATERNO, L. G., et al. Tuning of Magnetic Dipolar Interactions of Maghemite Nanoparticles Embedded in Polyelectrolyte Layer-by-Layer Films. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 8, p. 6672-6678, 2012.
- [83] DA SILVA, S. W., et al. Raman spectroscopy of cobalt ferrite nanocomposite in silica matrix prepared by sol-gel method. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, n. 9-20, p. 1602-1606, 2006.
- [84] SOLER, M. A. G., et al. Interaction of erythrocytes with magnetic nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 1069-1071, 2007.
- [85] SANTANA, J. F. B., et al. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyl dextran and blood cells using Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 452-454, 2005.
- [86] DE FARIA, D. L. A.; VENÂNCIO SILVA, S.; DE OLIVEIRA, M. T. Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, n. 11, p. 873-878, 1997.
- [87] NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Theory and Applications in Inorganic Chemistry**. John Wiley & Sons, INC., 2009.
- [88] FERRARO, J.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002.
- [89] WHITE, W. B.; DEANGELIS, B. A. Interpretation of the vibrational spectra of spinels. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 23, n. 4, p. 985-995, 1967.
- [90] NGO, A. T.; PILENI, M. P. Nanoparticles of Cobalt Ferrite: Influence of the Applied Field on the Organization of the Nanocrystals on a Substrate and on Their Magnetic Properties. **Advanced Materials**, v. 12, n. 4, p. 276-279, 2000.
- [91] COATS, A. W.; REDFERN, J. P. Thermogravimetric analysis. A review. **Analyst**, v. 88, n. 1053, p. 906-924, 1963.
- [92] LARSSON, B.; NILSSON, M.; TJALVE, H. The binding of inorganic and organic cations and H⁺ to cartilage in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, n. 21, p. 2963-70, 1981.
- [93] BANSIL, R.; YANNAS, I. V.; STANLEY, H. E. Raman Spectroscopy: A structural probe of glycosaminoglycans. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 541, n. 4, p. 535-542, 1978.
- [94] ORR, S. F. Infra-red spectroscopic studies of some polysaccharides. **Biochim Biophys Acta**, v. 14, n. 2, p. 173-81, 1954.
- [95] MATHEWS, M. B. Isomeric chondroitin sulphates. **Nature**, v. 181, n. 4606, p. 421-2, 1958.

- [96] DANISHEFSKY, I.; BELLA, A., JR. The sulfated mucopolysaccharides from human umbilical cord. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 1, p. 143-6, 1966.
- [97] TERHO, T.; HARTIALA, K.; HAKKINEN, I. Infrared spectroscopic investigations of a new acid mucopolysaccharide isolated from human gastric juice. **Nature**, v. 211, n. 5045, p. 198-9, 1966.
- [98] FILIP, D.; MACOCINSCHI, D.; VLAD, S. Thermogravimetric study for polyurethane materials for biomedical applications. **Composites Part B-Engineering**, v. 42, n. 6, p. 1474-1479, 2011.
- [99] LEE, C. T.; HUANG, C. P.; LEE, Y. D. Synthesis and characterizations of amphiphilic poly(L-lactide)-grafted chondroitin sulfate copolymer and its application as drug carrier. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 1, p. 131-9, 2007.
- [100] VERBLE, J. L. TEMPERATURE-DEPENDENT LIGHT-SCATTERING STUDIES OF VERWEY TRANSITION AND ELECTRONIC DISORDER IN MAGNETITE. **Physical Review B**, v. 9, n. 12, p. 5236-5248, 1974.
- [101] LEGODI, M. A.; DE WAAL, D. The preparation of magnetite, goethite, hematite and maghemite of pigment quality from mill scale iron waste. **Dyes and Pigments**, v. 74, n. 1, p. 161-168, 2007.
- [102] CHOURPA, I., et al. Molecular composition of iron oxide nanoparticles, precursors for magnetic drug targeting, as characterized by confocal Raman microspectroscopy. **Analyst**, v. 130, n. 10, p. 1395-1403, 2005.
- [103] GUPTA, R., et al. Raman study of stoichiometric and Zn-doped Fe₃O₄. **Physical Review B**, v. 65, n. 10, 2002.
- [104] SOUSA, M. H.; TOURINHO, F. A.; RUBIM, J. C. Use of Raman microspectroscopy in the characterization of MIIFe₂O₄ (M = Fe, Zn) electric double layer ferrofluids. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 31, n. 3, p. 185-191, 2000.
- [105] GASPAROV, L. V., et al. Infrared and Raman studies of the Verwey transition in magnetite. **Physical Review B**, v. 62, n. 12, p. 7939-7944, 2000.
- [106] GRAVES, P. R.; JOHNSTON, C.; CAMPANIELLO, J. J. Raman scattering in spinel structure ferrites. **Materials Research Bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1651-1660, 1988.
- [107] DEGIORGI, L.; BLATTERMORKE, I.; WACHTER, P. MAGNETITE - PHONON MODES AND THE VERWEY TRANSITION. **Physical Review B**, v. 35, n. 11, p. 5421-5424, 1987.
- [108] DEACON, G. B.; PHILLIPS, R. J. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 33, n. 3, p. 227-250, 1980.

[109] UNSOY, G., et al. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 11, p. 1-13, 2012.