



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO
COM GLUCOSAMINA

JULHYANA GUITTON MACHADO

2014

JULHYANA GUITTON MACHADO

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO
COM GLUCOSAMINA**

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

2014



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

Dissertação de Mestrado

Julhyana Guitton Machado

Título:

“FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO COM GLUCOSAMINA.”

Comissão Examinadora:

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

Profa. Dra. Giane Regina Paludo
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
UnB / FAV

Prof. Dr. Paulo César de Moraes
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB / Nano

Brasília, 02 de maio de 2014

*À minha família, meu amor por vocês é
imensurável.*

AGRADECIMENTOS

Uma dissertação de mestrado, apesar do processo solitário a que qualquer pesquisador está destinado, reúne contributos de várias pessoas. Desde o início do mestrado, tive o privilégio de contar com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem aqueles contributos, esta dissertação não teria sido possível.

À Professora Dra. Maria Aparecida Godoy Soler, a quem devo a confiança em minha capacidade como pesquisadora além da paciência e tranqüilidade para me transmitir os ensinamentos necessários para a conclusão do trabalho, deixo um agradecimento especial, pois enquanto orientadora soube mostrar-me a multiplicidade de caminhos ao longo da pesquisa, proporcionando-me a liberdade para trilhar e escolher o meu próprio trajeto.

Um agradecimento especial ao Professor Leonardo Paterno, pela dedicação e disponibilidade na colaboração sempre que por mim foi solicitada. A sua larga experiência e profunda capacidade de análise do projeto foram particularmente indispensáveis.

À Professora Dra. Emília Celma de Oliveira Lima, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, meu agradecimento por seu tempo empreendido para a realização das imagens de MET, assim como para a avaliação do meu projeto de dissertação.

À Professora 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 Professor Dr. Sebastião William da Silva, pelos ensinamentos técnico-científicos.

À Professora Sônia Baum e a aluna Nathalia Lemos pelo auxílio na realização do teste de MTT.

Às queridas Letti e Ana Paula, pelo apoio moral e acadêmico que muito me ajudou desde a minha chegada ao laboratório.

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

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

Impossível não expressar aqui a minha gratidão aos demais colegas colegas do CNANO. Desde sempre possuo com eles uma relação muito frutífera e agradável, obrigado pelo apoio incondicional.

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

A minha família e ao meu namorado, pelo amor, carinho e paciência incondicional. Por sempre estarem ao meu lado para as difíceis decisões e momentos de apreensão.

Ao meu irmão Luis Miguel, pelo apoio surreal, em quem sempre poderei contar em todos os aspectos da minha vida. Sem sua ajuda, nada seria.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

– Arthur Schopenhauer

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo a síntese de complexos magnéticos nanoestruturados coloidais formados por nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com cloridrato de glucosamina. As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por meio da técnica de coprecipitação em meio aquoso, pré-cobertas com ácido cítrico e posteriormente funcionalizadas, por meio de reação de *crosslinking*, com o cloridrato de glucosamina. A caracterização dos materiais produzidos, sólidos e em suspensões, foi realizada empregando-se as técnicas de espectroscopia Raman, espectroscopia no infravermelho, espalhamento de luz dinâmico, microscopia eletrônica de transmissão e termogravimetria. Os dados de espectroscopia Raman foram utilizados para indicar a fase do óxido de ferro produzido, sendo esta magnetita, enquanto a análise dos espectros obtidos no infravermelho forneceram informações acerca da funcionalização das nanopartículas. A presença da glucosamina na superfície da nanopartícula foi confirmada pela amida formada entre o grupo carboxilato do ácido cítrico e o grupo amina da glucosamina. Em adição, os resultados dos testes da estabilidade coloidal, assim como da citotoxicidade do material mostraram boa estabilidade e alta biocompatibilidade do complexo formado pela nanopartícula de óxido de ferro funcionalizada com glucosamina.

Palavras-chave: Liberação de fármacos, Ferritas, Funcionalização, Fluido magnético, Osteoartrite, Citotoxicidade

ABSTRACT

The objective of this study was to produce nanocomposites of iron oxide nanoparticles functionalized with glucosamine. The iron oxide nanoparticles were synthesized via the coprecipitation in aqueous media chemical method. Then, the nanoparticles were coated with citric acid and subsequently functionalized with glucosamine chloride via the crosslinking reaction of NHS/EDC. To characterize the material, various techniques were used. Raman spectroscopy was used to identify the iron oxide phase of the nanoparticles produced, confirming that the nanoparticles are constituted of magnetite. Infrared spectra provided data to study the interaction between the nanoparticles and the different coatings. The carboxylate group from the citric acid coordinated with the iron from the nanoparticle, whereas the amine from the glucosamine created an amide with another carboxylate group from the citric acid, thus, the FT-IR data confirm that the nanoparticles were functionalized with glucosamine. A colloidal stability study in biological solutions (DMEM and PBS) was also made, confirming the stability of the nanocomplexes produced. The MTT assay tested the cytotoxicity of the material produced, which resulted in biocompatibility.

Key-words: Drug Delivery, Ferrite, Functionalization, Magnetic fluid, Osteoarthritis, Cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ilustração do tecido cartilaginoso. Reproduzido de: JUNQUEIRA, 2004.....	24
Figura 2.2 – Estrutura química da glucosamina. Em destaque, a amina primária que substitui o grupo hidroxila de uma hexosamina.	27
Figura 2.3 – Ilustração dos momentos dipolo magnético nos materiais diamagnéticos sem campo magnético aplicado quando sob aplicação de campo.....	29
Figura 2.4 – Ilustração dos momentos de dipolo magnético nos materiais paramagnéticos antes e durante aplicação do campo magnético.	30
Figura 2.5 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolos magnéticos nos materiais ferromagnéticos.	30
Figura 2.6 – Ilustração da curva de histerese para materiais ferromagnéticos.....	31
Figura 2.7 – Ilustração dos momentos magnéticos de dipolos magnéticos nos materiais ferrimagnéticos.	32
Figura 2.8 – Representação da posição dos átomos nos arranjos a) octaédricos e b) tetraédricos da estrutura de espinélio cúbico. Modificado de: HAMMOND, 2009.....	35
Figura 2.9 – Ilustração de um fluido magnético (A) iônico, onde as partículas não se aglomeram devido a repulsão eletrostática; (B) surfactado, onde as partículas não se aglomeram devido a barreira física formada pelas moléculas do surfactante.....	37

Figura 2.10 – Ilustração de duas nanopartículas com momento magnético m alinhados, distância entre superfícies s e distância entre os centros r , com espessura de camada protetora δ	38
Figura 2.11 – Ilustração de a aplicações biomédicas de fluidos magnéticos biocompatíveis., tais como diagnóstico por imagem, magnetohipertermia e controle celular. Reproduzido de: YOO, 2011.	41
Figura 3.1 –Estrutura química do ácido cítrico	45
Figura 3.2 – Ilustração da reação de <i>crosslinking</i> entre EDC/NHS e o cloridrato de glucosamina.	47
Figura 3.3 – Ilustração das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho para caracterização das nanopartículas (NPs) e do fluido magnético (FM).	48
Figura 3.4 – Mecanismo de espalhamento de um fóton.	50
Figura 4.1 – Ilustração do processo de síntese e funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro.	58
Figura 5.1 – Espectroscopia Raman da amostra de glucosamina pura.....	64
Figura 5.2 – Espectro infravermelho obtido para a amostra de glucosamina.	66
Figura 5.3 – Curva de termogravimetria da amostra de cloridrato de glucosamina (GLU).	67
Figura 5.4 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra de magnetita funcionalizada com glucosamina (a) e histograma de distribuição obtido (b).	69

Figura 5.5 – Espectroscopia Raman da amostra de magnetita (SMGN).....	71
Figura 5.6 –Espectro Raman da amostra de magnetita funcionalizada com glucosamina SMGNGLU.	73
Figura 5.7 – Espectro FT-IR da amostra de magnetita funcionalizada com glucosamina (SMGNGLU).....	75
Figura 5.8 – Modelo de interação entre as nanopartículas, o ácido cítrico e a glucosamina.	77
Figura 5.9 – Curva de termogravimetria da amostra de magnetita (SMGM).	77
Figura 5.10 – Curva de termogravimetria da amostra de magnetita funcionalizada com cloridrato de glucosamina (SMGNGLU).	78
Figura 5.11 – Imagens obtidas dos fluidos magnéticos FMGN e FMGNGLU para os tempos de 24, 48 e 72 horas. Para cada amostra, o tubo à esquerda é o fluido puro, o tubo do centro é o fluido diluído em DMEM e o tubo à direita é o fluido diluído em PBS.	80
Figura 5.12 – Viabilidade celular para as amostras CTRL e GLU e FMGNGLU, tratadas com a concentração de GLU(0,125 mg/mL) para os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas.	83
Figura 5.13 – Viabilidade celular para as amostras CTRL e GLU e FMGNGLU, tratadas com a concentração de GLU(0,250 mg/mL) para os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Modos vibracionais Raman obtidos de dados experimentais para a magnetita <i>bulk</i> (SHEBANOVA, 2003).	51
Tabela 5.1 – Relação das principais bandas observadas no espectro infravermelho da amostra de cloridrato de glucosamina, apresentado na Figura 5.2.	67
Tabela 5.2 – Estágios de decomposição térmica da amostra de cloridrato de glucosamina.	68
Tabela 5.3 – Tabela com os dados de potencial ζ e raio hidrodinâmico das amostras FMGN e MGNGLU.	70
Tabela 5.4 – Relação das bandas observadas no espectro Raman da amostra SMGN, apresentado na Figura 5.4.....	72
Tabela 5.5 Modos Raman relativos à amostra SMGNGLU, cujo espectro está apresentado na Figura	74
Tabela 5.6 – Relação das bandas observadas no espectro FTIR apresentado na Figura 5.6.	76
Tabela 5.7 – Estágios de decomposição térmica das amostras de magnetita (SMGN), magnetita funcionalizada com cloridrato de glucosamina (SMGNGLU) e do cloridrato de glucosamina.	79
Tabela 5.8 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) obtidos em função do tempo após a preparação das amostras FMGN e FMGNGLU para os tempos de 24, 48 e 72 horas após a síntese	82

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EDL	Espalhamento Dinâmico de Luz
FM	Fluido Magnético
FMGN	Fluido magnético formado com a nanopartícula sem cobertura (meio ácido)
FMGNGLU	Fluido Magnético formado com a nanopartícula funcionalizada com glucosamina
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GAG	Glicosaminoglicano
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NPM	Nanopartícula magnética
NHS	N-Hydroxysuccinimide
OA	Osteoartrite
PBS	Tampão fosfato salino
RPM	Rotações por Minuto
SMGN	Nanopartícula sem cobertura no estado sólido
SMGNGLU	Nanopartícula funcionalizada com glucosamina no estado sólido
SP	Superparamagnetismo
SPIO	Óxido de ferro superparamagnético
NHS	N-Hydroxysuccinimide
TG	Termogravimetria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAIS.....	23
2.1 GLUCOSAMINA.....	23
2.1.1 Cartilagem articular.....	23
2.1.2 Características da Glucosamina.....	26
2.2 COLOIDES MAGNÉTICOS	29
2.2.1 Propriedades magnéticas	29
2.2.2 Estrutura cristalina	34
2.2.3 Estabilidade dos fluidos magnéticos.....	36
2.2.4 Interações atrativas	37
2.2.5 Interações repulsivas.....	39
2.2.6 Aplicações dos coloides magnéticos.....	40
3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COLOIDES MAGNÉTICOS	43
3.1 PREPARAÇÃO DO COLOIDE MAGNÉTICO.....	43
3.1.1 Técnica de coprecipitação.....	43
3.1.2 Funcionalização das nanopartículas	44
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCÓLÓIDES MAGNÉTICOS	48
3.2.1 Espectroscopia Raman.....	49
3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	52
3.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	53
3.2.4 Espalhamento Dinâmico de Luz.....	53
3.2.5 Termogravimetria.....	54
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	57
4.1 MATERIAIS.....	57
4.2 SÍNTESE DO COMPLEXO DE ÓXIDO DE FERRO.....	57

4.2.1 Síntese das partículas de magnetita cobertas com citrato	58
4.2.2 Funcionalização das nanopartículas de magnetita pré-cobertas com citrato	59
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS.....	59
4.3.1 Caracterização do cloridrato de glucosamina.....	59
4.3.2 Caracterização das nanopartículas	60
4.3.3 Estabilidade dos fluidos magnéticos.....	61
4.3.4 Teste de Toxicidade	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO CLORIDRATO DE GLUCOSAMINA	63
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS MAGNÉTICOS	68
5.2.1 Caracterização das suspensões coloidais.....	68
5.2.2 Caracterização dos sólidos nanoestruturados.....	71
5.3 ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS EM MEIO BIOLÓGICO.	79
5.4 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE	82
6 CONCLUSÃO	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

O conceito de nanociência surgiu em 1959 em uma palestra ministrada pelo físico Richard Feynman, onde este sugeriu a manipulação de átomos e moléculas para a construção de materiais que possuiriam propriedades distintas dos mesmos quando em escala macroscópica. Assim a nanociência é o estudo dos fenômenos e da manipulação em nível atômico, molecular e macromolecular de materiais nos quais as propriedades diferem significativamente das apresentadas pelos mesmos em dimensão macroscópica. Enquanto que, a nanotecnologia, cujo termo foi pela primeira vez sugerido por Norio Taniguchi (SAHOO et al., 2007), se refere ao uso dos conceitos desenvolvidos pela nanociência para manipular a matéria átomo por átomo e criar materiais, dispositivos e sistemas com propriedades novas e únicas. Considera-se objetos em escala nanométrica aqueles que tenham pelo menos uma de suas dimensões físicas na faixa de um a cem nanômetros. Quando aplicada às ciências da vida, a nanotecnologia recebe o nome de nanobiotecnologia e tem como objetivo a criação de novas drogas e metodologias para liberá-las em alvos específicos, desenvolvimento de protocolos para fabricação de complexos a serem empregados para tratamentos e diagnósticos de diversas patologias.

Os nanomateriais podem ser classificados como nanopartículas, que possuem as suas três dimensões entre um e cem nanômetros; nanodiscos ou nanofilmes que possuem apenas uma de suas dimensões entre um e cem nanômetros; e nanofibras, que apresentam duas de suas dimensões nessa faixa nanométrica (PATERNO, L. G. et al., 2009; PATERNO, L. G. et al., 2010). As classes de nanomateriais mais comuns são os carbonáceos, semicondutores, óxidos metálicos, nanopolímeros, nanocinzas; emulsões; e metais. Esses nanomateriais podem ser preparados de forma isolada, de agregados ou de aglomerados, podendo

ter diversas configurações como coberturas, funcionalização de superfícies, etc. (GURURAJ, A., et al., 2012)

Nas últimas décadas, materiais nanoparticulados como os óxidos de ferro superparamagnéticos (*superparamagnetic iron oxide* – SPIO), têm recebido atenção crescente em diferentes áreas tais como a física, a química, a ciência dos materiais, a engenharia, a biologia e a medicina. Interesse este motivado por suas propriedades magnéticas e de superfície e aplicações potenciais (BLUMS E. , C., A. e MAIOROW, M. M., 1985).

O comportamento superparamagnético dos óxidos de ferro nanoparticulados, que são considerados monodomínios magnéticos, é similar ao dos materiais paramagnéticos, no sentido que eles perdem sua magnetização quando o campo magnético é removido, mas diferem no valor do momento magnético o qual é muito maior. Entre as aplicações desses materiais em nanomedicina como terapia pode-se citar os sistemas de liberação de fármacos, hipertermia magnética, separação de moléculas e terapia fotodinâmica, enquanto que, como diagnóstico, tem-se a melhora de contraste em imagens de ressonância magnética, biosensores, etc. (GUIMARÃES, A. P., 2009; MAZZUCHELLI, S. et al., 2010; MINELLI, C. et al., 2010; RACHAKATLA, R. S. et al., 2010; MAHMOUDI, M. et al., 2011). Em adição, as aplicações tecnológicas envolvem a aplicação dos sistemas SPIO em memórias, sensores químicos, transformadores, etc. (VIALI, W. R., 2010;; ALCANTARA, G. B. et al., 2013; PATERNO, L. G. e SOLER, M.A. 2013). Os sistemas baseados em partículas SPIO possuem tamanhos controláveis na faixa de alguns nanômetros até dezenas de nanômetros, podendo assim ser fabricados em tamanhos compatíveis aos de células, vírus e proteínas (PANKHURST, Q. A. et al., 2003; WANG, J., 2005).

A maioria das aplicações utilizam as nanopartículas magnéticas dispersas em uma fase líquida, formando dispersões coloidais estáveis. Sob a ação de um campo magnético, o sistema age macroscopicamente como uma única fase líquida, denominado de fluido magnético (FM), nanofluido, ou ferrofluido. Os FMs são suspensões coloidais os quais o disperso é constituído de nanopartículas magnéticas cobertas por uma camada molecular estabilizante e o dispersante é um solvente orgânico ou inorgânico. A estabilidade é a característica mais importante do FM. Para prevenir a aglomeração das partículas e estabilizar o coloide magnético em um dispersante, deve-se introduzir uma interação repulsiva adicional entre as partículas. No caso dos fluidos magnéticos para aplicações biomédicas, chamados fluidos magnéticos biocompatíveis (FMB), utilizam-se moléculas orgânicas que são fisiosorvidos ou quimiosorvidas na superfície das partículas e apresentam grupos ionizáveis que ficam em contato com o dispersante. A estabilidade coloidal é obtida em pH e salinidade fisiológicos.

Um dos desafios para as aplicações biomédicas é transportar as nanopartículas magnéticas, geralmente conduzidas pelo sangue, até o local desejado. Na preparação desses sistemas biocompatíveis utiliza-se normalmente nanopartículas magnéticas, com diâmetros inferiores a 15 nm, que são funcionalizadas com sistemas biocompatíveis, que desempenham dois papéis fundamentais na preparação desses fluidos: 1) conferir às partículas um mecanismo para promover a estabilidade coloidal e 2) servir como agente de acoplamento para a imobilização de biomoléculas passíveis de reconhecimento por receptores específicos, e/ou drogas. Em adição, o sistema que recobre a partícula é de fundamental importância para o reconhecimento pelo sistema de defesa do

organismo, uma vez que cada tipo de cobertura da nanopartícula magnética provoca uma resposta distinta do organismo.

As dimensões do complexo magnético, bem como sua cobertura, influenciam no tempo de permanência no organismo, na velocidade com que estes atravessam a barreira endotelial e no seu reconhecimento pelo sistema mononuclear fagocitário. O reconhecimento por esse sistema ocorre pelo mecanismo de opsonização, onde essas moléculas pertencentes ao sistema complemento se fixam às superfícies de um antígeno com o objetivo de serem reconhecidas pelo sistema imunológico, fazendo com que esse antígeno seja fagocitado pelo organismo, removendo-o da circulação (ABBAS, 2008).

Assim um dos problemas encontrados nas aplicações *in vivo* é a biodistribuição, pois sabe-se que nanopartículas hidrofóbicas são rapidamente recobertas por componentes do plasma, como opsoninas, derivadas do sistema complemento, e anticorpos. Essa ligação facilita a ativação do sistema imunológico, retirando de uma maneira mais rápida as nanopartículas da circulação sanguínea, impedindo assim a sua correta distribuição ao local de interesse (BERRY et al., 2003; GARNETT e KALLINTERI, 2006). É necessário também avaliar a citotoxicidade dos complexos magnéticos, uma vez que podem ocorrer diversos tipos de interações, como interações moleculares, que podem gerar efeitos adversos. A investigação dos riscos em potencial visa analisar, através dos testes preliminares *in vitro*, a segurança do material, identificar seus mecanismo de ação e perfil toxicológico (NEL et al., 2006). Sabe-se que devido ao tamanho, à extensa superfície de contato e à capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, podem ocorrer injúria tecidual e inflamação, tornando-se assim imprescindível a avaliação dos efeitos *in vitro* e *in vivo* do nanomaterial visando aplicações em humanos

(HOSAPPLE et al., 2005; NEL et al., 2006). Novas coberturas que tenham a função de estabilizar a partícula de óxido de ferro no meio biológico e que seja ao mesmo tempo um fármaco para realizar uma terapia, têm sido pouco pesquisadas.

Os polissacarídeos lineares, componentes da matriz extracelular dos tecidos, compreendem os glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados e não sulfatados. Os GAGs se unem a cadeias proteicas, formando macromoléculas biológicas, as proteoglicanas, constituintes das matrizes extracelulares dos tecidos conjuntivos dos seres humanos. Assim, possuem papel importante na interação celular e no auxílio da adesão celular aos seus substratos e são ainda responsáveis pelas características distintas da matriz extracelular, contribuindo para a rigidez, resiliência e retenção intersticial de água (JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J., 2008). Devido às suas propriedades, os GAGs e seus precursores, como a glucosamina e a condroitina, vêm sendo muito empregados para fins terapêuticos em aplicações biomédicas.

A glucosamina, precursora da síntese das glicoproteínas, é importante para a formação de ácido hialurônico e de sulfato de condroitina, os quais, juntamente com as fibras colágenas, são os principais componentes da matriz extracelular cartilaginosa e do líquido sinovial (DAHMER, S. e SCHILLER, R. M., 2008; HUSKISSON, E. C., 2008; KIRKHAM, S. G. e SAMARASINGHE, R. K., 2009). A glucosamina vem sendo utilizada para fins terapêuticos, uma vez que normaliza o metabolismo da cartilagem e inibe a degradação dos GAGs. Possui, ainda, um importante efeito anti-inflamatório, suprimindo células inflamatórias, citocinas e moléculas, como a p38 MAPK, envolvidas na ativação das células do líquido sinovial, resultando na produção de mediadores inflamatórios. Estudos demonstram que a terapia com glucosamina leva a um alívio clínico dos sintomas da osteoartrite,

que é uma doença multifatorial relativa à injúria da cartilagem articular. (HUSKISSON, E. C., 2008; KIRKHAM, S. G. e SAMARASINGHE, R. K., 2009).

Na pesquisa bibliográfica realizada sobre materiais nanoparticulados envolvendo a glucosamina, encontrou-se apenas um estudo com nanopartículas de prata, realizado por Veerapandian e Kyusik (2010). Neste estudo foram sintetizados nanocompósitos (15 ± 5 nm) de prata funcionalizados com a glucosamina por meio do processo de *crosslinking*. Após a síntese das nanopartículas foi realizado um procedimento para introduzir o terminal carboxílico na superfície das mesmas; em seguida esse grupo foi ligado à cadeia amino-terminal da glucosamina, por meio da reação de N-Hydroxysuccinimede (NHS) e 1-Ethyl-3-[3dimethylaminopropyl] carboxidiimide (ECD). A funcionalização da superfície ocorreu por meio de uma ligação do grupo carboxila a uma amina secundária, obtida pela conjugação do terminal NHS da nanopartícula de prata e o terminal amino da glucosamina.

Neste contexto, considerando-se a importância dos sistemas SPIO para o desenvolvimento de novas plataformas magnéticas para transporte e liberação de fármacos para serem utilizados em diagnóstico e terapia (PERÁN, M. et al., 2012), e os resultados disponíveis na literatura descrevendo a terapia com glucosamina para a osteoartrite, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo complexo magnético baseado em partículas de magnetita funcionalizadas com cloridrato de glucosamina na forma de dispersões coloidais estáveis em meio aquoso com pH e salinidade fisiológicos.

A dissertação está organizada da seguinte forma: no Capítulo 2 são discutidos os materiais utilizados nesse projeto, suas características e propriedades, assim como exemplos de suas aplicações. No Capítulo 3 serão apresentados os

métodos de preparação dos complexos magnéticos e as técnicas de caracterização empregadas. No Capítulo 4 serão descritos os procedimentos experimentais e os resultados serão discutidos no Capítulo 5. No Capítulo 6, as conclusões e perspectivas serão abordadas.

2 MATERIAIS

Neste capítulo, serão discutidas as características e propriedades dos materiais empregados bem como suas aplicações. Inicialmente, será abordada a cartilagem articular visando mostrar a importância da glucosamina nesse tecido, bem como as propriedades do cloridrato de glucosamina. Em seguida as propriedades e as aplicações dos coloides com base em óxidos de ferro serão discutidas.

2.1 GLUCOSAMINA

2.1.1 Cartilagem articular

A cartilagem articular tem como função absorção de impactos, minimizar o estresse nos ossos subcondrais e diminuir a fricção entre os mesmos. Possui como característica a resiliência, podendo sofrer deformação e retornar ao seu estado original. Apresenta uma baixa taxa de atividade metabólica e pequena quantidade de vasos sanguíneos e vasos linfáticos, em consequência, há dificuldade para absorção de medicamento.

A cartilagem articular é composta por quatro zonas principais (Figura 2.1), onde cada uma delas apresenta uma região de matriz distinta. A zona superficial é composta por uma matriz com finas fibras colágenas e poucos polissacarídeos, seguido de uma camada de condrócitos alongados organizados paralelamente à superfície articular. As células nessa camada encontram-se quiescentes. A segunda zona é de transição e inclui condrócitos ativos e fibras colágenas mais espessas dispostas de maneira aleatória em relação à superfície articular. A zona profunda, abaixo da zona de transição, contém condrócitos similares a essa, porém, organizados perpendicularmente à superfície articular. Nessa zona, estão presentes

as fibras colágenas mais espessas, e há maior concentração de proteoglicanas. À medida que a concentração das proteoglicanas aumenta, a partir da zona superficial até a região profunda, a concentração de água diminui (BUCKWALTER et al, 1988; JUNQUEIRA, 2008).

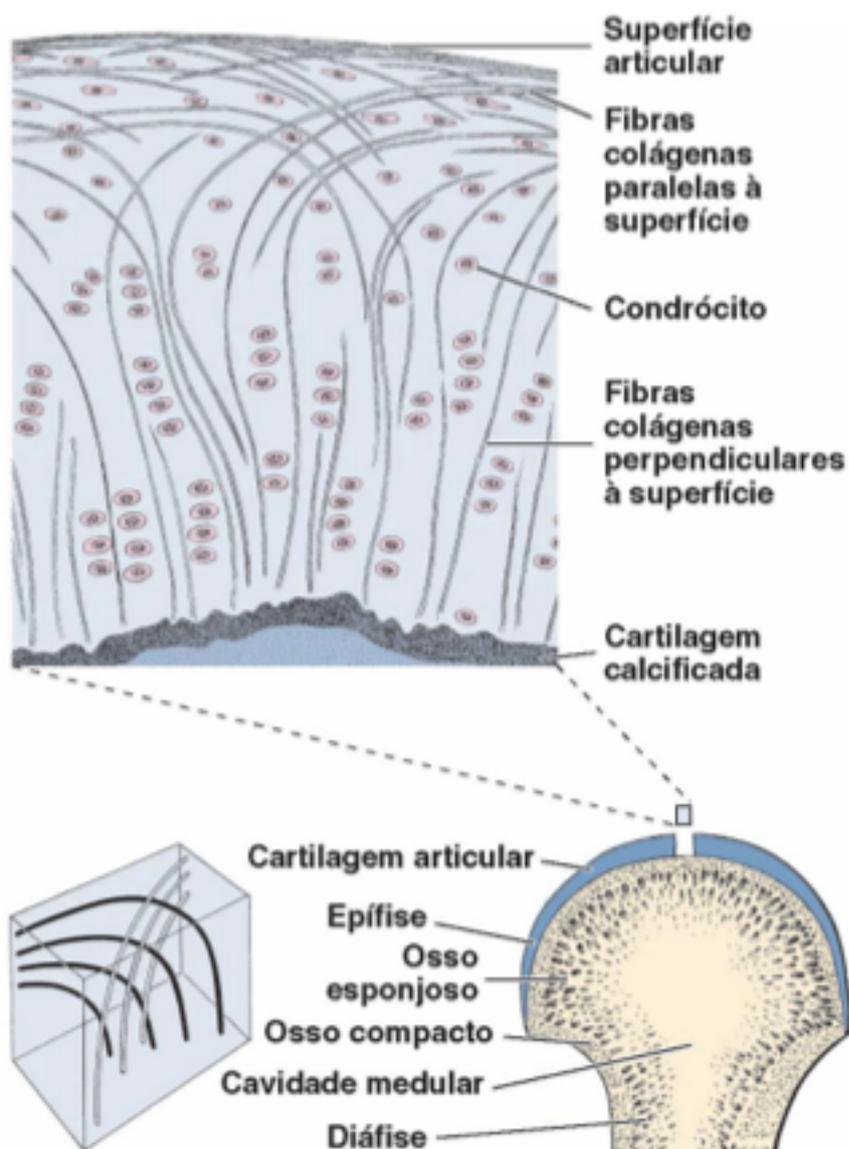


Figura 2.1 – Ilustração do tecido cartilaginoso. Reproduzido de: JUNQUEIRA, 2004

Os condrócitos representam cerca de 10% do volume total da cartilagem. Deste modo, as propriedades funcionais da cartilagem estão diretamente relacionadas aos componentes da matriz extracelular, porém, deve-se ressaltar que

os condrócitos e a matriz extracelular dependem um do outro para a existência e manutenção da cartilagem.

A composição e as propriedades físico-químicas, assim como a organização do colágeno, e a interação molecular entre o colágeno e as proteoglicanas, possuem efeitos diretos sobre as propriedades mecânicas intrínsecas da matriz extracelular. Moléculas de proteoglicanas isoladas, ou formando agregados, geram uma rede que contém um grande número de moléculas de água e funcionam como uma mola mecânica. Quando uma carga é realizada sobre a cartilagem, ocorre inicialmente uma deformação. Esta deformação ocorre principalmente devido a uma alteração nos domínios moleculares das proteoglicanas. Ao mesmo tempo, ocorre o movimento do fluido intersticial, que provoca a saída da água da cartilagem para o fluido sinovial, gerando um processo de exsudação e uma repulsão eletrostática recíproca entre os grupos carboxila e sulfato das glicosaminoglicanas, que possuem carga elétrica negativa. Devido a diminuição da concentração de água, ocorre um aumento da concentração de proteoglicanas, levando ao aumento da pressão osmótica. Quando a força aplicada nessa articulação é retirada, a água é atraída para os interstícios entre as ramificações das glicosaminoglicanas (BULKWALTER et al, 1988; JUNQUEIRA, 2004).

No processo patológico da cartilagem na OA, sinais metabólicos e de degeneração resultam na estimulação da cascata de citocinas inflamatórias (HIROSHI, 2011). Os condrócitos também influenciam e levam a um aumento dos níveis de produção de citocinas inflamatórias, como a TNF- α e a IL-1 β , resultando na diminuição da síntese de colágeno e no aumento da produção de proteases de degradação, como a metaloproteinase, e outros mediadores inflamatórios, tais como

a IL-8, IL-6 e o óxido nítrico, levando à inflamação, dano e à apoptose da cartilagem articular.

Os danos à cartilagem articular podem ocorrer de duas formas. Na primeira forma, há perda das macromoléculas da matriz, sem que haja dano mecânico aos condrócitos ou à rede de fibras colágenas. Na segunda, há ruptura mecânica dos condrócitos e da matriz extracelular, fazendo com que ocorra perda progressiva das macromoléculas da matriz e resulte na degeneração da matriz extracelular. Se o processo de degradação da articulação não for interrompido, os danos à cartilagem podem ser irreversíveis (BULKWALTER et al, 1988).

2.1.2 Características da Glucosamina

A glucosamina vem sendo utilizada para fins terapêuticos uma vez que contribui para normalizar o metabolismo da cartilagem e inibir a degradação dos GAGs. Em adição, ela possui ainda um importante efeito anti-inflamatório, conforme mencionado anteriormente. (HUSKISSON, E. C., 2008; KIRKHAM, S. G. e SAMARASINGHE, R. K., 2009).

A glucosamina, e seu derivado acetilado, N-acetil-glucosamina, são amino monossacarídeos essenciais na composição dos glicosaminoglicanos. A glucosamina e seu derivado são produzidos pelos condrócitos, células especializadas do tecido cartilaginoso, a partir de glicose e de glutamina (aminoácido essencial). Observa-se que a glucosamina está envolvida no processo de formação da cartilagem articular atuando como precursora de unidades de dissacarídeos formadores dos glicosaminoglicanos. Em adição, a glucosamina é importante para a formação de ácido hialurônico e de sulfato de condroitina (HIROSHI, 2011).

A ausência dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos podem levar à degeneração articular. Em decorrência disso, a glucosamina tem o papel de reparadora e mantenedora da matriz cartilaginosa, pois estimula as células da matriz extracelular a produzirem glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Em consequência, os GAGs e seus precursores sintéticos, como a glucosamina, vêm sendo amplamente empregados para fins terapêuticos. (DAHMER, S. e SCHILLER, R. M., 2008; HUSKISSON, E. C., 2008; KIRKHAM, S. G. e SAMARASINGHE, R. K., 2009).

A estrutura da glucosamina (2-amino-2deoxyalpha-D-glucose), conforme apresentado na Figura 2.2, observa-se que ela é uma glucose modificada que possui um grupo terminal $-NH_2$ que substitui o grupo hidroxila do carbono dois (C-2). É uma das hexosaminas (açúcares que possuem 6 carbonos com um grupo amina) mais comuns nas células humanas. A glucosamina exógena é transportada para dentro da célula por meio de transportadores de glucose, sendo em seguida fosforilada por uma das hexoquinases da família da glucosamina-6-fosfato (THAKRAL, et al., 2007).

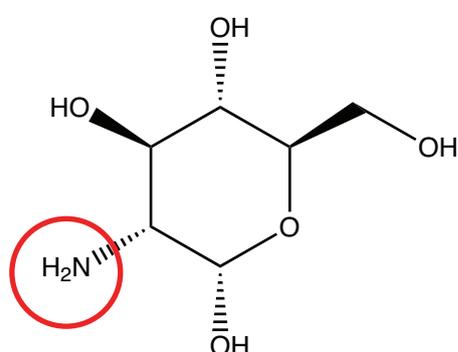


Figura 2.2 – Estrutura química da glucosamina. Em destaque, a amina primária que substitui o grupo hidroxila de uma hexosamina.

A metabolização da glucosamina é bastante conhecida. Estudos têm demonstrado que complexos contendo glucosamina administrados por meio

intravenoso tiveram 10% da glucosamina encontrada em sua forma livre no plasma, tendo essa sido rapidamente metabolizada pelo fígado e excretadas na urina. Os 90% remanescentes foram encontrados incorporados às proteínas plasmáticas que, após aproximadamente 8 horas, foram difundidas pelos rins e fígado e detectadas sequencialmente nas cartilagens e ossos (SETNIKAR, et al., 1984).

A presença de glucosamina no meio extracelular estimula a síntese dos GAGs, resultando em um efeito benéfico à cartilagem articular uma vez que possui efeito anti-catabólico devido ao seu potencial inibidor da resposta inflamatória. Ainda, a glucosamina aumenta a síntese de colágeno tipo II e a secreção de TGF- β . O TGF- β possui papel crítico entre as funções catabólicas e anabólicas dos condrócitos (JEROSCH, 2011).

A glucosamina pode ser encontrada comercialmente como suplemento nutricional de três formas: cloridrato de glucosamina (glucosamina HCl), sulfato de glucosamina e N-acetil-glucosamina. Todas as formas são solúveis em água. Em pH neutro e fisiológico, o grupo amino presente na estrutura da glucosamina é protonado, resultando em carga superficial positiva. No caso da glucosamina HCl, o ânion presente é um cloreto, enquanto para o sulfato de glucosamina o ânion é um sulfato. A N-acetil-glucosamina possui o grupo amina acetilado, neutralizando a sua carga. Os estudos clínicos referentes ao uso de glucosamina como fármaco para o tratamento da OA, em sua maioria, utilizam o sulfato de glucosamina ou a glucosamina HCl. Neste projeto, será empregado o cloridrato de glucosamina. A glucosamina utilizada em estudos clínicos, assim como na forma de suplemento nutricional, são derivadas de exoesqueletos de animais marinhos, porém, glucosamina sintética também é utilizada.

2.2 COLOIDES MAGNÉTICOS

2.2.1 Propriedades magnéticas

Os materiais sólidos respondem a um campo magnético aplicado, sendo que esta resposta depende de fatores como a estrutura atômica, condições de pressão e de temperatura, entre outros. Os materiais podem ser classificados de acordo com sua resposta a um campo magnético aplicado como: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos e antiferromagnéticos. O comportamento magnético é proveniente dos momentos magnéticos dos elétrons, momentos esses que podem ter origem no momento angular e no momento de spin. (YOUNG, 2008).

Nos materiais diamagnéticos, a formação de momento dipolo ocorre quando são submetidos a um campo externo, que ocasiona uma variação temporária do movimento orbital. Em termos de susceptibilidade, os materiais diamagnéticos apresentam susceptibilidade negativa. Além disso, o momento magnético induzido pelo campo externo nesses materiais é extremamente pequeno e em direção oposta àquela do campo aplicado (Figura 2.3).

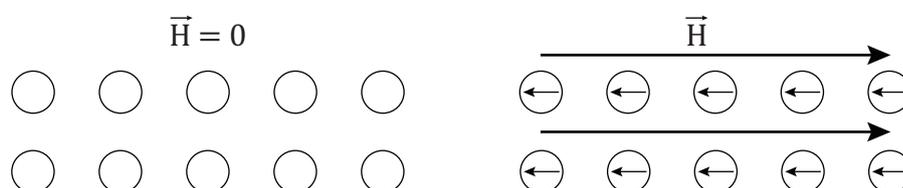


Figura 2.3 – Ilustração dos momentos dipolo magnético nos materiais diamagnéticos sem campo magnético aplicado quando sob aplicação de campo.

Quando o material paramagnético é colocado sob a ação de um campo magnético externo, ocorre o alinhamento dos momentos magnéticos na direção do campo, conforme ilustração da Figura 2.4.

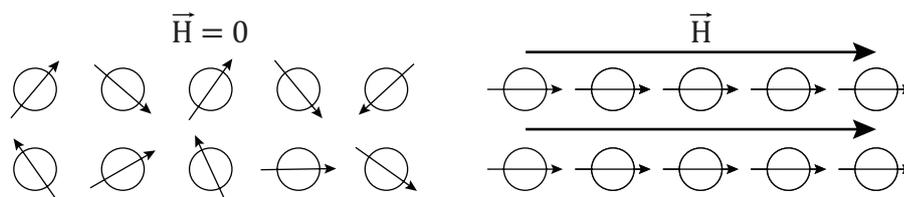


Figura 2.4 – Ilustração dos momentos de dipolo magnético nos materiais paramagnéticos antes e durante aplicação do campo magnético.

A maior parte dos materiais considerados magnéticos, tais como os elementos Fe, Ni e Co, e suas ligas, apresentam comportamento ferromagnético. A magnetização presente nesses materiais ocorre devido à combinação das propriedades de cada átomo e à estrutura cristalina que o sólido apresenta. As interações entre os momentos magnéticos atômicos geram um alinhamento interno em certas regiões, chamadas de domínios magnéticos, que ocorrem mesmo na ausência de um campo magnético externo. No interior de um domínio magnético, todos os momentos magnéticos atômicos são paralelos. Quando um material ferromagnético é submetido a um campo magnético externo, os momentos se alinham na direção do campo aplicado (Figura 2.5). À medida que a intensidade do campo magnético aumenta, atinge-se uma condição na qual praticamente todos os momentos magnéticos do material estão alinhados na direção do campo magnético externo, a partir do qual ocorre a saturação da magnetização, que é chamada de magnetização de saturação (ver ilustração apresentada na Figura 2.6).

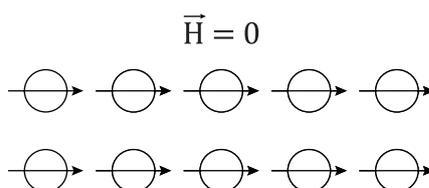


Figura 2.5 – Ilustração do arranjo dos momentos de dipolos magnéticos nos materiais ferromagnéticos.

Observa-se na ilustração da Figura 2.6. que, no caso dos materiais ferromagnéticos, quando o campo magnético externo é removido, o valor da magnetização é diferente de zero, e é denominado de magnetização de remanência (M_R). Para que essa magnetização seja reduzida a zero, torna-se necessário a aplicação de um campo magnético em sentido contrário, que é chamado de campo coercivo (H_C). Esse tipo de comportamento é chamado curva de histerese.

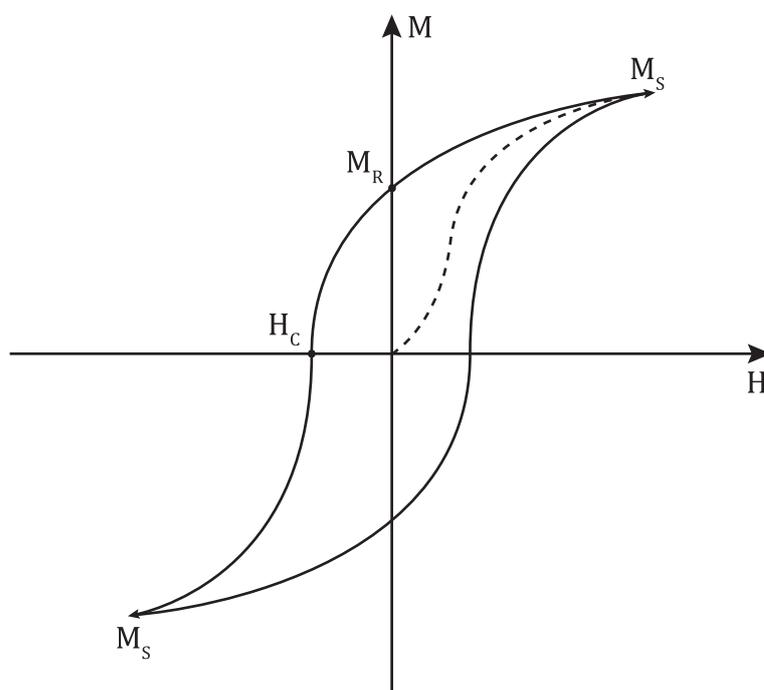


Figura 2.6 – Ilustração da curva de histerese para materiais ferromagnéticos.

Os materiais ferrimagnéticos apresentam estrutura cristalina diferente daquela apresentada pelos ferromagnéticos, são ordenados em dipolos atômicos com orientação antiparalela, apresentando valores de magnetização menores (Figura 2.7). Possuem módulos de momentos de dipolos diferentes, quando na ausência de um campo externo, e apresentam comportamento magnético similar aos

ferromagnéticos, tais com a curva de histerese. Tem-se como exemplo desse tipo de material os óxidos metálicos em geral, como os óxidos de ferro espinélio cúbico.

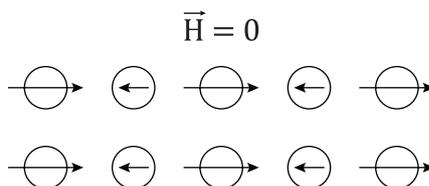


Figura 2.7 – Ilustração dos momentos magnéticos de dipolos magnéticos nos materiais ferrimagnéticos.

Os materiais antiferromagnéticos possuem seus dipolos adjacentes antiparalelos quando na ausência de um campo externo esses dipolos possuem a mesma magnitude e assim se cancelam, tendo sua magnetização resultante igual a zero (YOUNG, 2008).

2.2.1.1. Superparamagnetismo

O fenômeno do superparamagnetismo é característico dos materiais em escala nanométrica. Conforme foi mencionado, os materiais ferromagnéticos são formados por multidomínios, constituídos por regiões que possuem magnetização uniforme separadas por paredes de domínios. A formação dessas paredes ocorre devido ao balanço energético entre a energia magnetostática e a energia da parede de domínio. À medida que o tamanho do material se reduz, ao alcançar um tamanho crítico, em que requer mais energia para a criação dos domínios do que para reduzir a energia magnetostática, esse material não formará multidomínios e se apresentará na forma de monodomínios. Como o comportamento magnético de um monodomínio é similar ao do material paramagnético, no sentido que, após a remoção do campo magnético aplicado, o material não apresenta remanência, o comportamento magnético do monodomínio foi chamado de superparamagnetismo, uma vez que apresenta alta magnetização de saturação (10^2 - $10^4 \mu_B$) (YOUNG, 2008).

À temperatura ambiente, os materiais superparamagnéticos não apresentam histerese. A energia térmica é suficiente para induzir flutuações nos momentos magnéticos com um determinado tempo de relaxação, chamado de tempo de relaxação de Néel.

A baixa temperatura, um material formado por monodomínio apresenta-se uniformemente magnetizado, com os spins alinhados na mesma direção do campo aplicado. Para que a magnetização seja revertida a energia térmica deve exceder a energia da barreira efetiva.

A temperatura de bloqueio (T_B) é definida como a temperatura a partir da qual ocorre a reversão da magnetização de um conjunto de partículas de monodomínios idênticas, mudando do estado bloqueado para desbloqueado (não apresentará curva de histerese) e manifestará o comportamento superparamagnético. A função de Langvin de primeira ordem é geralmente empregada para modelar o comportamento de sistemas superparamagnéticos (YOUNG, 2008).

Quando presentes em um fluido magnético, as partículas podem apresentar dois mecanismos distintos de relaxamento do momento magnético associado às nanopartículas: o mecanismo de Néel, já mencionado, e o mecanismo browniano. Na relaxação promovida pelo mecanismo browniano, as nanopartículas possuem a orientação do momento magnético intrínseco alterada por rotações aleatórias das próprias nanopartículas no líquido carreador, isto ocorre devido à agitação térmica. Quando os dois mecanismos de relaxamento estão presentes, o mecanismo que levar à relaxação em um tempo menor dominará o comportamento do sistema (YOUNG, 2008).

2.2.2 Estrutura cristalina

Um sólido é caracterizado pelo arranjo ordenado tridimensional de seus átomos, o retículo cristalino. Este pode ser descrito como um arranjo geometricamente regular de pontos no espaço, nos quais se situam átomos, íons, moléculas ou grupo destes.

Os óxidos de ferro ferrimagnéticos apresentam a estrutura espinélio cúbica e podem ser representados pela fórmula MFe_2O_4 , onde M representa os cátions metálicos bivalentes. No caso de M ser o ferro, obtém-se um óxido de ferro puro. Quando M é outro cátion metálico bivalente, como manganês, cobalto, níquel, etc., obtém-se um óxido de ferro misto. Os íons são arrançados em sítios octaédricos e tetraédricos, conforme a ilustração da Figura 2.8. De acordo com a disposição dos íons de Fe^{3+} e M^{2+} , é possível a formação de duas configurações distintas. A primeira, denominada espinélio normal ou direta, ocorre quando os íons M^{2+} ocupam os sítios tetraédricos e os íons Fe^{3+} ocupam os sítios octaédricos, tendo-se como exemplo a ferritas de zinco ($ZnFe_2O_3$) e a de manganês. A segunda estrutura é chamada de espinélio inversa, onde os sítios tetraédricos estão totalmente ocupados por íons Fe^{3+} enquanto os sítios octaédricos são ocupados metade pelos íons M^{2+} e metade pelos íons Fe^{3+} , como é o caso da magnetita (Fe_3O_4). No caso dos nanomateriais, a distribuição de cátions depende da técnica de preparação, podendo apresentar uma estrutura mista (RUSSELL, 1929; RUSSEL, 1981).

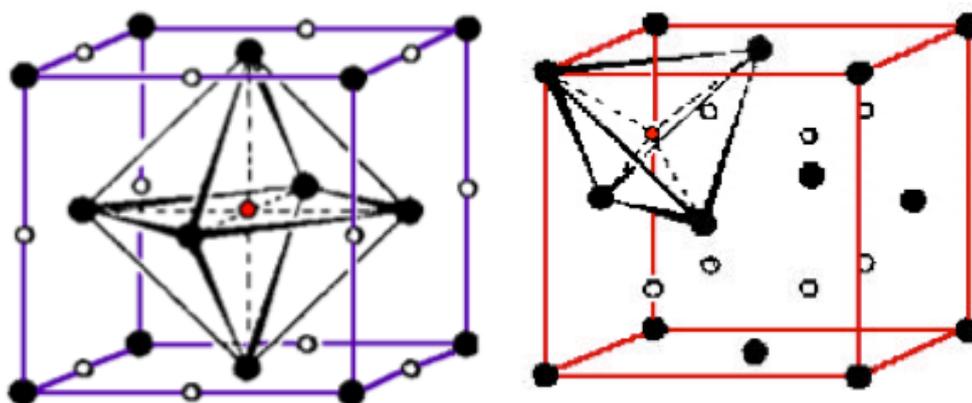


Figura 2.8 – Representação da posição dos átomos nos arranjos a) octaédricos e b) tetraédricos da estrutura de espinélio cúbico. Modificado de: HAMMOND, 2009

A magnetita é um mineral ferrimagnético que possui ferro nos estados de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} . Quando oxidada, origina a maguemita, que, por sua vez, quando oxidada, origina a hematita. Este processo recebe o nome de martirização (ROMDOHR, 1969). A magnetita apresenta uma estrutura inversa, onde seus íons O^{2-} são coordenados à íons Fe^{2+} e Fe^{3+} nos interstícios octaédricos, e à Fe^{3+} nos tetraédricos. Assim, como os íons Fe^{3+} são divididos igualmente entre as posições tetraédricas e octaédricas, não existe um momento magnético resultante de presença destes íons. Porém, os íons Fe^{2+} , localizados no sítios octaédricos, são responsáveis pelo comportamento magnético deste material. O comportamento magnético da magnetita depende de vários fatores como raio iônico, valência e temperatura, assim como das suas propriedades químicas, morfológicas, estequiométricas e dimensionais.

A estrutura da maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) é similar à da magnetita. A sua principal diferença é a presença de Fe^{3+} como cátion único da estrutura. Cada célula unitária, cúbica, da sua estrutura contém cerca de 32 íons O^{2-} , 21,33 íons de Fe^{3+} e 2,66 vacâncias (presentes nos sítios octaédricos). Os cátions são distribuídos em 8 sítios

tetraédricos e 16 octaédricos, e as vacâncias estão localizadas nos sítios octaédricos.

A hematita possui como fórmula $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e consiste em octaedros compartilhando arestas com dois terços dos sítios ocupados por Fe^{3+} , enquanto o restante é arranjado regularmente gerando anéis hexagonais de octaedros. A hematita é extremamente estável e é a última etapa do processo de oxidação, pois a magnetita se oxida para maguemita, que por sua vez se oxida dando origem à hematita.

2.2.3 Estabilidade dos fluidos magnéticos

A maioria das aplicações exige que as nanopartículas de óxidos de ferro sejam dispersas em fluidos magnéticos. O fluido magnético é um coloide constituído por partículas magnéticas que apresentam dimensões de ordem nanométrica suspensas em uma matriz líquida não magnética. A estabilidade do coloide depende das características das partículas, como o diâmetro, a energia de repulsão entre as mesmas, a temperatura e as interações entre as partículas e o líquido carreador. Caso essas propriedades não sejam apropriadas ocorre uma separação de fase no sistema (RUSSEL, 1991). As partículas devem ser quimicamente estáveis e fisicamente pequenas para que não ocorra a precipitação durante a agitação térmica do fluido.

A estabilidade coloidal depende do tratamento dado à superfície das partículas, tratamento este que irá determinar as características dos fluidos magnéticos, que podem ser classificados em: iônico, surfactado ou surfactado-iônico. A superfície das nanopartículas nos fluidos magnéticos iônicos é carregada eletricamente gerando uma camada superficial de cargas, evitando a aproximação

das partículas entre si por meio de repulsão eletrostática (Figura 2.9a). Nos fluidos surfactados, a superfície das nanopartículas encontra-se coberta por uma camada molecular que irá gerar uma repulsão estérica entre as partículas (Figura 2.9b). Nos fluidos surfactados-iônicos, também chamados de fluidos magnéticos biocompatíveis, a cobertura molecular se liga à superfície da partícula ao mesmo tempo que apresenta grupos funcionais com afinidade ao meio aquoso, tornando-os adequados para as aplicações biomédicas.

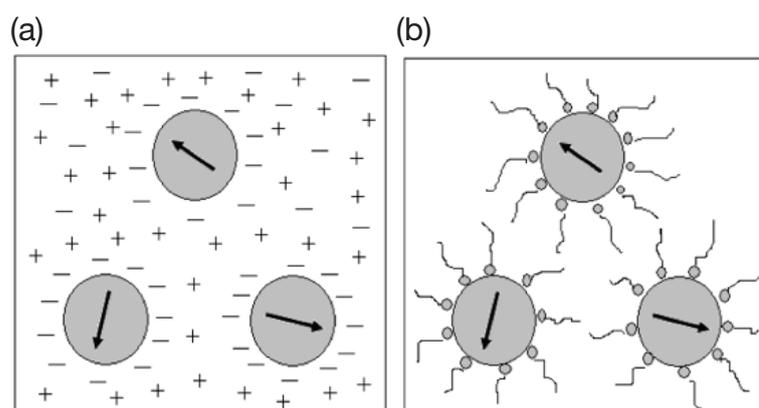


Figura 2.9 – Ilustração de um fluido magnético (A) iônico, onde as partículas não se aglomeram devido a repulsão eletrostática; (B) surfactado, onde as partículas não se aglomeram devido a barreira física formada pelas moléculas do surfactante.

2.2.4 Interações atrativas

Fluidos magnéticos típicos contêm aproximadamente 10^{16} partículas/cm³, assim, a probabilidade de ocorrer uma aglomeração devido à atração dipolar magnética é bastante elevada. Considerando-se duas cargas de mesma intensidade e sinais iguais, separadas por uma distância $s + d$, onde s representa a distância de uma superfície à outra, e d o diâmetro das partículas (Figura 2.10), a energia de interação dipolo-dipolo (E_{dd}) entre as duas partículas quando seus momentos magnéticos m estiverem alinhados, é dado por:

$$E_{dd} = \frac{m^2}{2\pi\mu_0 r^3} \quad (2.2.1)$$

Para $r = s+d$ e $m = \frac{\mu_0 M^2 \pi d^3}{6}$, onde M é a magnetização, μ_0 é a permeabilidade no vácuo e d é o diâmetro das partículas, tem-se:

$$E_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 \pi d^3}{9(l+2)^3} \quad (2.2.2)$$

Onde $l = \frac{2s}{d}$. Se as partículas estiverem em contato, $l = 0$, tem-se:

$$E_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 V}{12} \quad (2.2.3)$$

Onde V é o volume das nanopartículas E_{dd} , a energia de contato entre as mesmas.

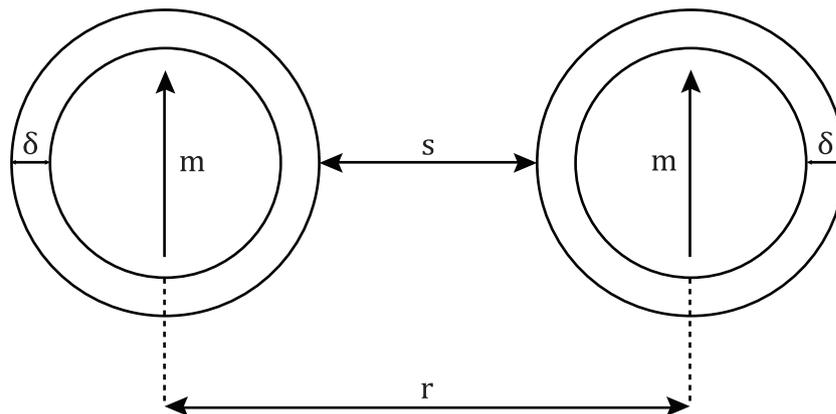


Figura 2.10 – Ilustração de duas nanopartículas com momento magnético \vec{m} alinhados, distância entre superfícies s e distância entre os centros r , com espessura de camada protetora δ .

As interações de Van der Waals também são interações atrativas. Ocorrem devido às flutuações de energia associadas aos dipolos elétricos. A energia de interação de Van der Waals entre duas partículas esféricas idênticas (E_{vw}), pode ser dada por (ROSENWEIG, 1997):

$$E_{vw} = -\frac{A}{6} \left[\frac{2}{l^2 + 4l} + \frac{2}{(l+2)^2} + \frac{\ln(l^2 + 4l)}{(l+2)^2} \right] \quad (2.2.4)$$

Onde A é a constante de Hamaker, que depende das propriedades dielétricas das nanopartículas e do meio e $l = \frac{2s}{d}$. Quando as partículas se aproximam, l tende a zero, portanto, a energia necessária para separar um par de partículas que se agregaram tende ao infinito.

2.2.5 Interações repulsivas

São introduzidas com o objetivo de evitar a aglomeração entre as nanopartículas. Uma das abordagens induz a repulsão por meio de cadeias moleculares adsorvidas na superfície da partícula, realizando uma repulsão estérica, cuja energia E_{es} é dada por (ROSENWEIG, 1997):

$$E_{es} = \frac{\pi d^2 \xi kT}{2} \left[2 - \frac{1+2}{t} \ln \left(\frac{1+t}{1+\frac{1}{2}} \right) - \frac{1}{t} \right] \quad (2.2.5)$$

Onde $l = \frac{2s}{d}$, $t = \frac{2\delta}{d}$, d é o diâmetro da partícula, s é a distância de superfície a superfície, K é a constante de Boltzmann, T é a temperatura do sistema, δ é o comprimento da molécula adsorvida e ξ é a concentração superficial das moléculas adsorvidas, chamado de coeficiente de grafting.

Outro tipo de interação repulsiva é a interação eletrostática, usada para se obter a estabilidade de fluidos magnéticos iônicos. Neste caso, forma-se uma camada elétrica dupla em torno da superfície das nanopartículas. Na parte interna, tem-se os íons adsorvidos, enquanto na parte externa, que é uma região difusa, encontram-se os contra-íons em excesso e os co-íons. Quando duas partículas

possuem cargas e potenciais de superfície de mesmo sinal, elas tendem a se repelir, criando assim uma barreira de potencial impedindo a agregação (BOCKRIS, 1993).

As partículas sintetizadas por meio da técnica de coprecipitação são também chamadas de macroânions. A reação de equilíbrio ácido-base dá origem a uma carga superficial ζ , por meio da adsorção dos grupos hidroxila anfotéricos, gerando uma carga negativa quando em meio alcalino e carga positiva quando em meio ácido. Em torno do ponto isoelétrico ($\text{pH}=7,5$), a carga superficial ζ não é suficiente para se sobrepor às forças atrativas, portanto as nanopartículas do meio aglomeram e floculam.

Os fluidos magnéticos para aplicações biomédicas devem ser estáveis em pH em torno de 7 e, para obtê-los, é necessário fazer um tratamento superficial das nanopartículas por meio de agentes surfactantes. Os surfactantes utilizados, nos fluidos magnéticos biocompatíveis, possuem cargas em seus terminais, introduzindo uma repulsão eletrostática. Os surfactantes devem ainda ser biocompatíveis e apresentar sítios disponíveis para ancoragem ou acoplamento de medicamentos, marcadores, biomoléculas, etc.

Para a obtenção de fluido magnético estável, é necessário o tratamento superficial das nanopartículas. A produção do fluido pode ser realizada em 3 etapas: síntese, tratamento superficial das nanopartículas e peptização em meio aquoso. Porém, nos casos em que o surfactante é adicionado durante a síntese, é possível obter o fluido magnético em duas etapas.

2.2.6 Aplicações dos coloides magnéticos

Devido ao desenvolvimento de novas técnicas de síntese e de caracterização muito precisas, é possível obter biocoloides adequados para aplicações biomédicas

(Figura 2.11). As nanopartículas podem ser entregues em um alvo específico guiadas por gradientes de campos magnéticos externos ou por anticorpos. As aplicações *in vivo* podem ser nas áreas de diagnóstico e terapia. O diagnóstico pode ter sua resolução melhorada devido ao aumento de contraste em imagens de ressonância magnética, ou através de marcadores fluorescentes (BULTE e KRAITCHMAN, 2004). Como terapia, pode-se citar a magnetohipertermia e a entrega localizada de quimioterápicos, além da terapia fotodinâmica, entre outras (SINCAI, et al., 2007; MYKHAYLYK, et al., 2007; DAVID, et al., 2007). Dentre as aplicações *in vitro*, destaca-se a magnética de alta resolução (LIN, et al., 2007).

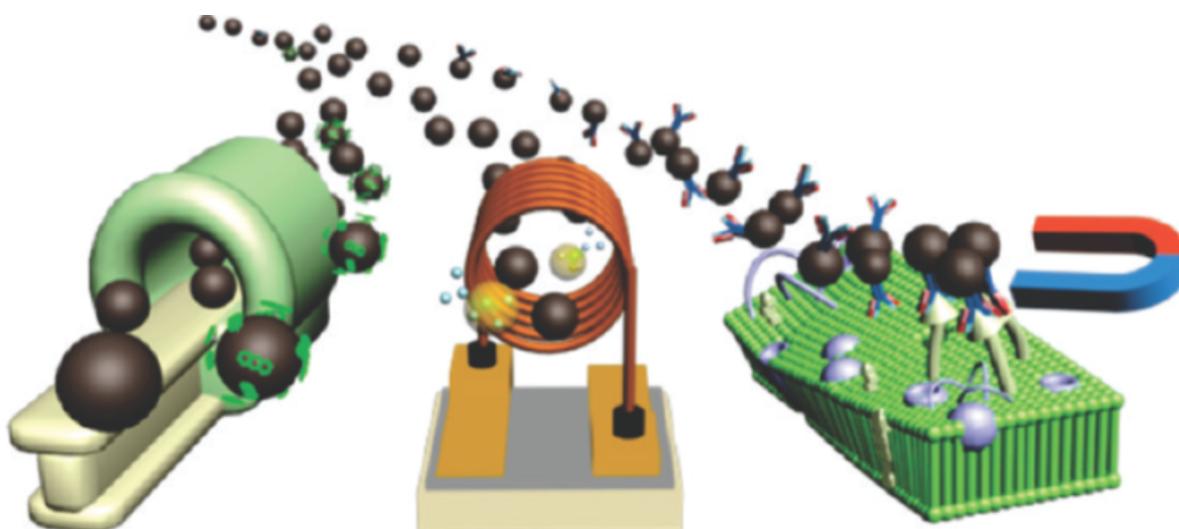


Figura 2.11 – Ilustração de aplicações biomédicas de fluidos magnéticos biocompatíveis., tais como diagnóstico por imagem, magnetohipertermia e controle celular. Reproduzido de: YOO, 2011.

A separação de moléculas ou células de alta resolução é uma técnica na qual as nanopartículas se ligam às biomoléculas contidas em um soluto com o objetivo de isolar um determinado composto específico ou tipo celular, sendo necessário que as nanopartículas apresentem afinidades específicas. Ao se aplicar um campo magnético externo, ocorre retenção das nanopartículas juntamente com as moléculas conjugadas a elas (LIN, et al., 2007).

Os gradientes de campos magnéticos externos podem ser empregados para direcionamento das nanopartículas devidamente funcionalizadas com o ente biológico ao local de interesse, com o intuito de potencializar o tratamento e minimizar os efeitos sistêmicos. Pode-se associar à magnetohipertermia o tratamento antitumoral uma vez que, sob aplicação do campo magnético, ocorre um aumento da temperatura no local provocando a lise celular (KETTERING, 2007).

Na área de diagnóstico, as nanopartículas podem ser empregadas para aumentar o contraste de imagens de ressonância magnética, possibilitando a localização de tumores em estágios iniciais. Esta técnica é geralmente utilizada no contraste de imagens de órgãos cuja capacidade de retenção de nanopartículas já é bem conhecida, como fígado, baço e linfonodos (SINCAI, et al., 2007; MYKHAYLYK, et al., 2007; RUSSEL e ANZAI, 2007).

No ramo industrial, o avanço tecnológico está intimamente ligado ao processo de síntese dos fluidos magnéticos, onde sua maioria baseia-se em dispersantes apolares. Dentre as aplicações tecnológicas, pode-se citar dispositivos acústicos como alto falantes, onde o fluido magnético é utilizado para dissipar o calor emitido por bobinas magnéticas, melhorando a qualidade do som. Como separador magnético de materiais na área ambiental e tintas magnéticas.

3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COLOIDES MAGNÉTICOS

3.1 PREPARAÇÃO DO COLOIDE MAGNÉTICO

Nas últimas décadas, as técnicas de obtenção de fluidos magnéticos vêm sendo aprimoradas levando ao grande avanço na área. Em geral, a preparação de um coloide magnético com base em óxido de ferro pode ser realizada em três etapas: síntese das nanopartículas de óxido de ferro, tratamento da sua superfície, e dispersão em meio aquoso ou apolar. As nanopartículas podem ser preparadas por métodos físicos ou químicos, ou uma composição de ambos. As técnicas físicas incluem a deposição de vapor, redução de tamanho por meio de moagem de partículas micrométricas, entre outras. Entre os métodos químicos podem-se citar a coprecipitação em meio aquoso e a decomposição térmica de compostos organometálicos (SOLER *et al.* 2011a, SOLER *et al.* 2011b).

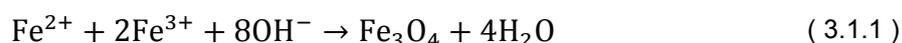
Neste trabalho os complexos de óxido de ferro foram sintetizados utilizando-se o método de coprecipitação química em meio aquoso, e em seguida foram pré-cobertas com citrato e funcionalizadas via reação *crosslinking* com cloridrato de glucosamina. Resumidamente, a produção das nanopartículas foi realizada em três etapas: 1) síntese das nanopartículas de óxido de ferro; 2) funcionalização das mesmas com citrato e 3) acoplamento da glucosamina nas SPIO pela reação EDC/NHS. O grupo carboxílico presente na cobertura de citrato foi usado para ligar-se com o grupo terminal amino da superfície da glucosamina, via reação de acoplamento EDC/NHS.

3.1.1 Técnica de coprecipitação

O método químico de coprecipitação consiste na precipitação alcalina de quantidades estequiométricas de íons de ferro. O método de coprecipitação foi

escolhido para a síntese de nanopartículas de magnetita devido às suas vantagens proporcionadas, como a fácil manipulação, custo relativamente baixo e possibilidade de síntese de nanopartículas em grande quantidade e razoável controle das propriedades das mesmas.

A coprecipitação de nanopartículas de magnetita é realizada por meio da adição de soluções aquosas de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} à uma solução alcalina e é representada por:



As propriedades das nanopartículas sintetizadas tais como tamanho, qualidade cristalina, formato, etc, dependem das condições de síntese, como concentração dos reagentes, velocidade de agitação, velocidade de adição da base e temperatura (MORALES, 1999; PIERRE, 2002).

3.1.2 Funcionalização das nanopartículas

Conforme foi mencionado no capítulo anterior, para prevenir a aglomeração das partículas e estabilizar o colóide magnético em um dado dispersante deve-se introduzir uma interação repulsiva entre as partículas. No caso dos fluidos magnéticos para aplicações biomédicas, chamados fluidos magnéticos biocompatíveis, utilizam-se moléculas orgânicas que são fisioadsorvidas ou quimioadsorvidas na superfície da partícula, e apresentam grupos ionizáveis que ficam em contato com o dispersante. A estabilidade coloidal é obtida em pH e salinidade fisiológicos. Na preparação desses sistemas biocompatíveis, utiliza-se normalmente nanopartículas magnéticas, com diâmetros inferiores a 15nm, que são funcionalizadas com moléculas biocompatíveis, as quais desempenham papéis fundamentais na estabilidade e aplicação desses fluidos: i) conferir às partículas um

mecanismo para promover a estabilidade coloidal; ii) servir como agente de acoplamento para a imobilização de biomoléculas passíveis de reconhecimento por receptores específicos; iii) prolongar o tempo de permanência na corrente sanguínea, no caso de aplicações *in vivo*.

A cobertura das nanopartículas magnéticas pode ser obtida empregando-se diversas moléculas biocompatíveis ou polímeros, entre elas o dextran, ácido cítrico, ácido dimercaptosuccínico, aminoácidos, peptídios, etc. Após a funcionalização, as partículas devem ser dispersas em meio aquoso em pH em torno de 7,0. O ácido cítrico, cuja estrutura é apresentada na Figura 3.1, tem sido bastante utilizada para a obtenção de fluidos estáveis. Neste projeto, o ácido cítrico foi empregado como pré-cobertura. A adsorção das moléculas de citrato é realizada por meio de ligação covalente com os íons de ferro da superfície da partícula por meio do seu grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$).

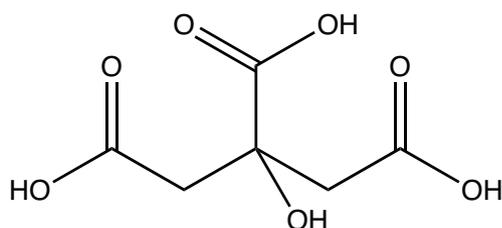


Figura 3.1 –Estrutura química do ácido cítrico

A estratégia utilizada neste trabalho, para obter o complexo magnético biocompatível, contempla a coprecipitação de magnetita em meio aquoso e sua posterior funcionalização por meio da reação de *crosslinking* (VEERAPADIAN,2010). Inicialmente, a magnetita recém sintetizada foi coberta com ácido cítrico, seguindo-se a funcionalização com o complexo EDC/NHS. O EDC é conhecido por imobilizar biomoléculas por meio de ligações covalentes e funcionar também como um *crosslinker* na reação EDC/NHS. O EDC promove a formação de ligações do tipo

amina e reage com grupos carboxilatos, formando um complexo estável com grupos amino disponíveis. A adição de NHS às reações de EDC visa aumentar o número de ligações de moléculas carboxiladas com o grupamento amino da biomolécula desejada, como a glucosamina (VEERAPADIAN, 2010). Assim, o grupo $N=C=N$ do EDC liga-se com o $COOH$ do ácido cítrico formando o composto instável *o-acylisourea*. A adição da molécula de NHS ao meio faz com que a molécula de EDC seja removida, permitindo que ocorra a ligação da amina terciária do NHS ao $COOH$ do ácido cítrico. A adição de uma amina primária, como a presente na glucosamina, gera a saída do NHS, permitindo a ligação entre o grupo NH_2 da molécula de glucosamina com o $COOH$ do ácido cítrico, gerando um composto estável formado por nanopartículas de óxido de ferro-ácido cítrico-glucosamina. Este processo é ilustrado na Figura 3.2.

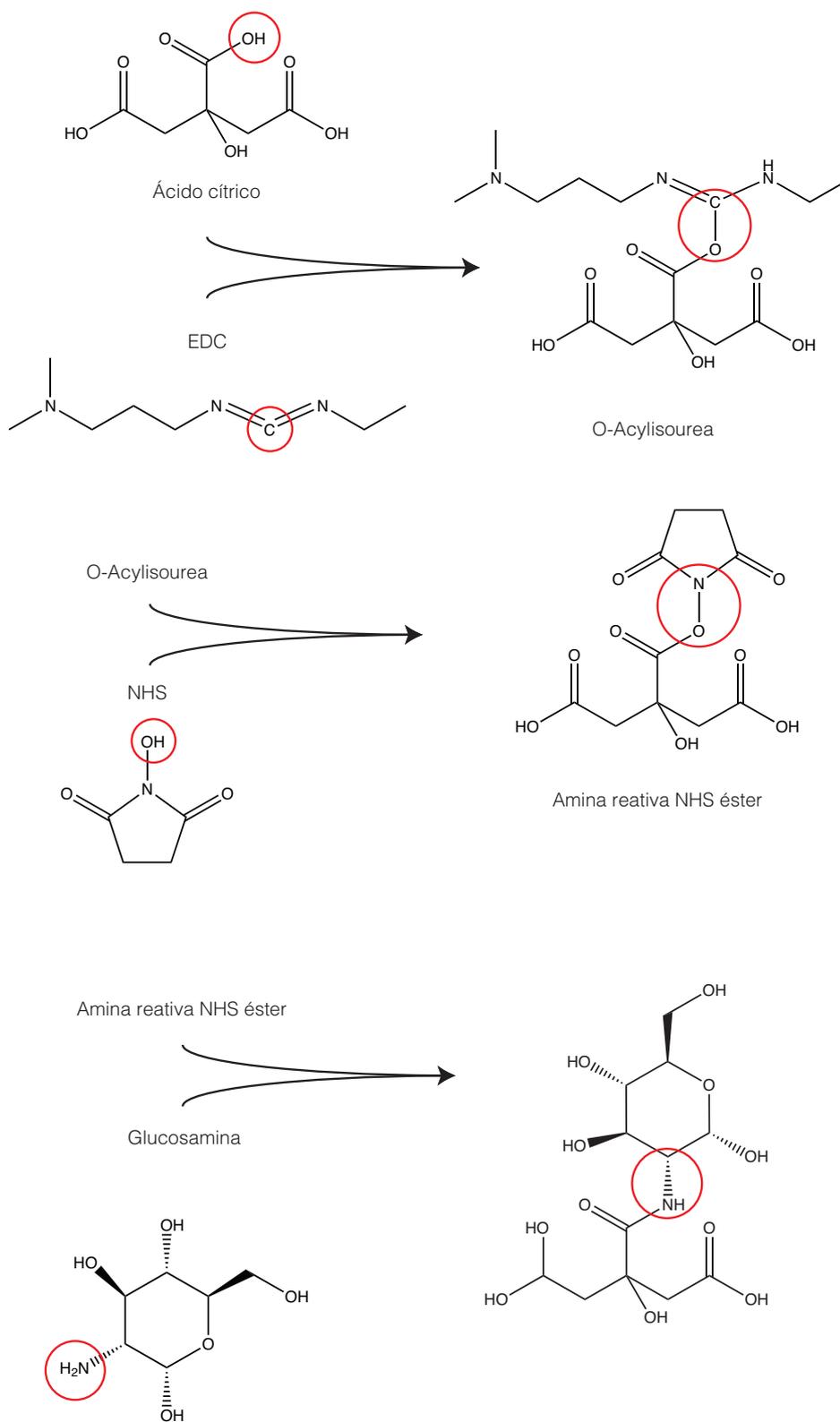


Figura 3.2 – Ilustração da reação de *crosslinking* entre EDC/NHS e o cloridrato de glucosamina.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOLÓIDES MAGNÉTICOS

As técnicas apresentadas neste capítulo foram empregadas para a caracterização dos nanomateriais sintetizados, tanto na forma de pó (Nanopartículas - NPs) quanto na forma de fluidos magnéticos (FM), conforme se observa na ilustração da Figura 3.3. As nanopartículas na forma de sólidos foram caracterizadas empregando-se as técnicas de espectroscopia Raman, espectroscopia FT-IR e termogravimetria, enquanto que os biocoloides foram caracterizados por meio das técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL), conforme ilustração apresentada na Figura 3.3. Por meio destas técnicas de caracterização, obtém-se as propriedades das nanopartículas suspensas tais como o diâmetro médio, aspectos morfológicos, distribuição de tamanho, estado de agregação, carga superficial e composição química.

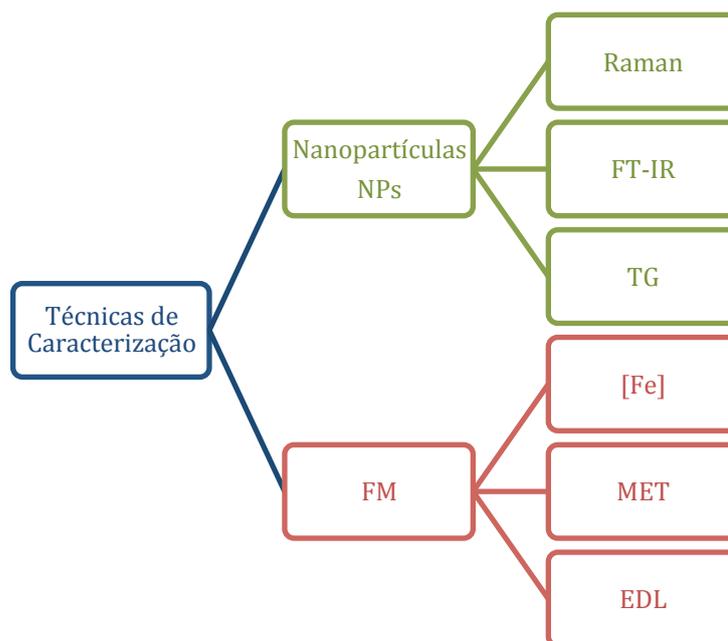


Figura 3.3 – Ilustração das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho para caracterização das nanopartículas (Nanopartículas - NPs) e do fluido magnético (FM).

3.2.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman baseia-se no efeito Raman. O efeito Raman foi descoberto por Sir Chandrasekhra Venkata Raman, em 1928, ao observar que o comprimento de onda, de uma fração da radiação espalhada por determinadas moléculas, difere daquele do feixe incidente e que o deslocamento do comprimento de onda depende da estrutura química das moléculas responsáveis por esse espalhamento. Diversas modificações foram realizadas com o passar do tempo na técnica de espectroscopia Raman, levando ao desenvolvimento de estratégias com o intuito de aumentar a sensibilidade, tais como o efeito Raman ressonante e o efeito de ampliação de superfície. Sabe-se que cada substância possui um espectro Raman característico, obtendo-se a sua identificação quando esta técnica é empregada.

O efeito Raman ocorre quando uma radiação monocromática é espalhada inelásticamente por moléculas, fazendo com que uma pequena fração da radiação espalhada seja detectada em uma frequência diferente daquela da radiação incidente. O mecanismo de espalhamento acontece quando uma amostra possui átomos ou moléculas que sofrem uma variação na polaridade quando vibram. Quando um fóton incide sobre um material, as moléculas deste material poderão absorvê-los, sendo excitadas para um estado de maior energia (nível virtual). Para que voltem a seu estado de equilíbrio, estado vibracional, as moléculas terão que liberar energia na forma de fótons. Tratando assim de um espalhamento, esse pode ocorrer de maneira elástica ou inelástica. Quando o espalhamento é elástico, é denominado espalhamento Rayleigh, enquanto o espalhamento inelástico (Raman) pode ocorrer de duas maneiras distintas, o espalhamento Stokes e o anti-Stokes (Figura 3.4) (SALA, 1995; FERRANO, 2002).

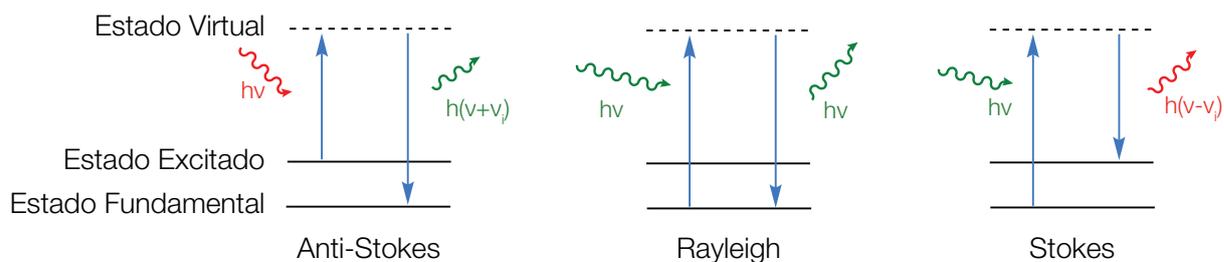


Figura 3.4 – Mecanismo de espalhamento de um fóton.

A espectroscopia Raman é uma técnica importante para a caracterização de nanomateriais, tais como os óxidos de ferro (SOLER, M. A. G. et al., 2007). Em particular, permite a identificação inequívoca das fases do material, seja na forma de pó ou de filmes (SOLER, M. A. G. et al., 2012; PATERNO, L.G. et al., 2012), bem como informações sobre a cobertura (MORAIS, P. C. et al., 2000). Em adição também pode ser empregada na análise de glicosaminoglicanos, dando informações sobre as estruturas moleculares desses compostos (BANSIL, R. et al., 1978).

Os óxidos de ferro do tipo cúbico espinel, como a magnetita e maguemita, pertencem ao grupo espacial O_h^7 ($Fd3m$), e, de acordo com a teoria de grupos, apresentam cinco modos Raman ativos, quando em temperatura ambiente, sendo um A_{1g} , um E_g e três T_{2g} .

Existe na literatura uma divergência sobre a correta identificação dos modos vibracionais ativos em Raman. Diversos fatores podem ser considerados como geradores dessas divergências, entre a simetria do arranjo cristalino, como a presença de vacâncias, cátion em interstícios, a composição química não estequiométrica, distorções nas dimensões das partículas, parâmetros estes que podem variar segundo a rota de síntese no caso dos nanomateriais. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de oxidação via laser, que pode provocar a oxidação da magnetita.

Em relação à magnetita, considera-se que somente os sítios de simetria tetraédrica contribuem para o espectro Raman (WHITE e DEANGELIS, 1967; VERBLE, 1967; SHEBANOVA e LAZOR, 2003). Os modos vibracionais previstos para a magnetita e os modos vibracionais correspondentes, estão listados na Tabela 3.1. A identificação das bandas vibracionais obtidas nos espectros Raman deste projeto foi realizada considerando-se as referências SOLER, 2010 e SHEBANOVA, 2003. A maguemita apresenta modos vibracionais Raman mais frequentes em torno de 700, 500 e 350 cm^{-1} , enquanto a hematita em 229, 249, 295, 302, 414, 500 e 615 cm^{-1} .

Tabela 3.1 – Modos vibracionais Raman obtidos de dados experimentais para a magnetita *bulk* (SHEBANOVA, 2003).

Modo	Origem	Posição
A_{1g}	Estiramento simétrico Fe-O	$\cong 668 \text{ cm}^{-1}$
E_g	Flexão simétrica O-Fe	$\cong 306 \text{ cm}^{-1}$
T_{2g}^2	Estiramento assimétrico Fe-O	$\cong 538 \text{ cm}^{-1}$
T_{2g}^1	Movimento translacional FeO_4	$\cong 193 \text{ cm}^{-1}$
T_{2g}^3	Flexão assimétrica O-Fe	$\cong 450 \sim 490 \text{ cm}^{-1}$

Neste trabalho, os espectros Raman foram adquiridos utilizando-se o espectro triplo T64000 (Horiba Scientific, Quioto, Japão) equipado com uma CCD, onde a excitação das amostras foi obtida com um laser de íon-argônio com comprimento de onda em 514,5 nm e intensidade de 0,25 mW.

Os glicosaminoglicanos são estruturas compostas em sua grande parte por carboidratos, que possuem seu esqueleto molecular composto por sucessivas combinações entre ligações C-C e C-O. Em particular, a glucosamina apresenta três regiões características no espectro Raman de sua molécula, com sinal proeminente na região entre 950-1200 cm^{-1} que ocorre devido principalmente à presença de CH_2

e COH. Também apresenta uma banda na região 1000-1200 cm^{-1} devido à presença do grupo amino em sua estrutura (BANSIL, R. et al., 1978).

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) baseia-se na visualização de uma amostra com uma grande ampliação da imagem, permitindo assim a visualização de nanopartículas. Essa ampliação ocorre porque o MET possui um sistema de feixes de elétrons de alta energia cinética que, ao incidir sobre a amostra fornecerá imagens planas, imensamente ampliadas, possuindo a capacidade de aumento útil de até um milhão de vezes.

A análise morfológica e a determinação do tamanho das nanopartículas foram obtidas por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (RUBY, C. et al., 2003; MEI, F. et al., 2012). A preparação da amostra consistiu em gotejar amostras do fluido magnético em um suporte de amostra coberto com uma membrana de carbono para microscopia de transmissão. Com o auxílio de um software de captura de imagens, obtém-se a medida dos diâmetros de um determinado número de partículas e se constrói um histograma de distribuição dos diâmetros. A análise dos dados é feita fazendo-se um ajuste dos dados por uma distribuição normal ou log-normal, onde se obtém o diâmetro médio (D_{MED}) das nanopartículas e o desvio padrão (σ). Quanto menor for o σ , menor será a polidispersão da amostra. As imagens de MET foram adquiridas no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (JEOL, Tóquio, Japão) com filamento de tungstênio em 80 kV do Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

3.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A radiação no infravermelho compreende a região com número de onda entre 12800 a 10 cm^{-1} , porém, a região de maior interesse para as análises de grupos funcionais de estruturas cristalinas encontra-se na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Esta técnica fornece evidências da presença de grupos funcionais na estrutura cristalina devido à interação das moléculas e átomos com a radiação eletromagnética, por meio das vibrações moleculares. As vibrações moleculares podem ocorrer devido a deformidades axiais ou angulares. Quando a deformação acontece na direção do eixo da molécula, ocorrem um aumento na distância interatômica e uma diminuição alternadamente e o modo de vibração é denominado estiramento ou deformidade axial. As deformações angulares correspondem ao movimento de um grupo de átomos em relação ao restante da molécula, sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem.

Neste projeto, as análises de FT-IR foram adquiridas empregando-se o espectrômetro Vertex 70 da Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, EUA).

3.2.4 Espalhamento Dinâmico de Luz

Esta técnica baseia-se no espalhamento dinâmico da luz em uma amostra em suspensão e fornece informações sobre o tamanho hidrodinâmico e sobre o índice de agregação das partículas.

O raio hidrodinâmico pode ser definido como o raio efetivo, considerando-se a cobertura e interação com as moléculas do meio vizinho em virtude da forte atração eletrostática que a carga superficial produz nas moléculas do meio aquoso. Diversos fatores influenciam no movimento browniano das partículas em suspensão, movimento esse que é responsável por gerar uma flutuação na intensidade de luz

espalhada em uma escala de microssegundos. Quando o raio luminoso atravessa a dispersão coloidal e atinge as nanopartículas em movimento browniano, ocorre o espalhamento da luz. O aparelho relaciona o tamanho das partículas com a intensidade de luz espalhada, sendo possível assim determinar o diâmetro médio e a porcentagem de distribuição de tamanho. 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).

A medida da carga elétrica superficial obtida por meio do potencial ζ foi realizada do mesmo equipamento e fornece informações sobre a carga superficial, indicando a presença da cobertura na superfície da nanopartícula. O potencial ζ refere-se à carga elétrica presente na superfície das nanopartículas em contato com o líquido. As cargas presentes na superfície da partícula interferem na distribuição de íons ao seu redor e aumentam a concentração de contra íons próximos à superfície, levando à formação de uma dupla camada elétrica na interface da partícula e o meio aquoso. O potencial ζ é definido como o potencial referente ao plano de cisalhamento entre uma partícula e os íons mais fortemente ligados a ela. Esse potencial permite a reflexão da carga efetiva superficial das partículas, podendo assim associar a repulsão eletrostática entre elas e a estabilidade da suspensão.

3.2.5 Termogravimetria

A análise térmica é uma análise da mudança das propriedades de uma amostra em função de uma alteração controlada da temperatura. A termogravimetria permite medir a variação de massa de um material em função da temperatura em

uma atmosfera controlada, sendo adequada para a caracterização de polímeros, fármacos, compostos orgânicos e inorgânicos.

Uma exposição à temperaturas elevadas pode alterar a estrutura química, assim como as propriedades físicas do material. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições isotérmicas, mostra o perfil de resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura. As curvas termogravimétricas apresentam informações sobre a estabilidade térmica e a composição original da amostra, assim como permitem a detecção de compostos intermediários que podem ter sido formados e ainda de resíduos, se houver. A estabilidade térmica é a capacidade da substância em manter suas propriedades durante um processo térmico. A variação de massa é registrada com precisão de 0,1 microgramas e ocorre devido a fenômenos físico e químicos como a decomposição térmica, a retenção de gás e a liberação de espécies previamente absorvidas ou adsorvidas.

As análises termogravimétricas podem ser de três tipos: a TG isotérmica, a TG quasi-isotérmica e a TG dinâmica. Na primeira, a variação de massa em função do temperatura é constante. Na segunda, a amostra é aquecida à uma temperatura até que ocorra uma variação em sua massa, quando então essa temperatura é mantida até que haja uma estabilização da massa. Quando isso ocorre, a temperatura volta a aumentar até que ocorra a próxima mudança de massa. A terceira, por sua vez, consiste em uma variação de temperatura pré-programada de maneira linear. (SOLER, M. A. G. et al., 2007; KOTSMAR, C. et al., 2010).

As análises termogravimétricas foram realizadas empregando-se o equipamento DTG-60H (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) da Central Analítica, Instituto de Química, Universidade de Brasília.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo serão abordados os procedimentos de síntese dos complexos magnéticos e sua suspensão em meio aquoso, assim como as condições empregadas na caracterização dos mesmos.

4.1 MATERIAIS

O cloreto de ferro (II) tetrahidratado (cloreto ferroso), cloreto de ferro (III) hexahidratado (cloreto férrico), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), ácido perclórico (HClO₄), NHS, EDC, ácido cítrico e o cloridrato de glucosamina foram adquiridos pela Sigma Aldrich Corporate (St. Louis, Missouri, EUA) e utilizados conforme foram adquiridos, em forma de pó. As membranas de celulose, empregadas na etapa de diálise, foram adquiridas da InLab (São Paulo, Brasil). Enquanto os filtros estéreis para seringa (0,22) foram adquiridos da KASVI (Curitiba, Paraná, Brasil). Toda água utilizada foi provida pelo sistema Milli-Q, resistividade: 18 MΩ cm⁻¹.

4.2 SÍNTESE DO COMPLEXO DE ÓXIDO DE FERRO

Os complexos magnéticos de óxido de ferro foram produzidos partindo-se da síntese do caroço magnético por meio do método de coprecipitação química em meio aquoso, os quais foram pré-cobertos com citrato. Em seguida, foram submetidos ao processo de acoplamento via EDC/NHS, por meio de reação *crosslinking* da ligação do grupo carboxílico presente na cobertura de citrato com o grupo amino da superfície da glucosamina (WANG, H. et al., 2004). A produção do complexo de óxido de ferro foi realizada em três etapas, conforme ilustração apresentada na Figura 4.1. Primeiramente, foi realizada a síntese das

nanopartículas SPIO, seguido da funcionalização das mesmas com citrato e finalmente o acoplamento da glucosamina pela reação EDC/NHS.

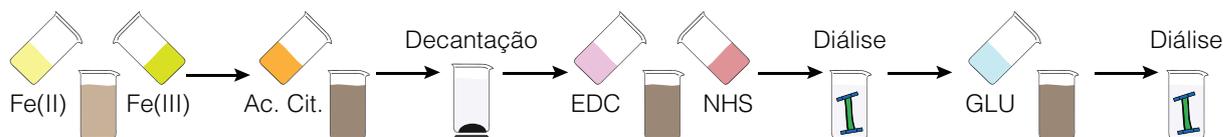


Figura 4.1 – Ilustração do processo de síntese e funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro.

4.2.1 Síntese das partículas de magnetita cobertas com citrato

As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas por meio da coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , numa proporção estequiométrica 2:1 em meio aquoso básico. Após a síntese, uma solução estoque de ácido cítrico foi adicionada ao fluido magnético para a obtenção das nanopartículas cobertas com citrato (PATERNO, L. G. et al., 2009).

As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas partindo-se de uma solução contendo 15 mmols de íons de ferro em proporção de $1\text{Fe}^{2+}:2\text{Fe}^{3+}$ em água deionizada. Essa solução foi adicionada à uma solução 300 mM de NaOH, sob agitação mecânica, à temperatura ambiente (pH em torno de 12). A solução resultante permaneceu sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o sólido formado por nanopartículas de magnetita foi submetido ao processo de lavagem. As nanopartículas foram dispersas em meio ácido, obtendo-se um coloide estável formado por partículas com cargas superficiais positivas, que foi chamado de FMGN, enquanto o sólido obtido secando-se este fluido empregando-se o processo de liofilização foi denominado de SMGN.

A pré-cobertura das NPs de magnetita com citrato foi obtida a partir da adição de uma solução de ácido cítrico 0,05 M (pH 5,5) à suspensão formada por partículas de magnetita (FMGN) e mantida sob agitação.

4.2.2 Funcionalização das nanopartículas de magnetita pré-cobertas com citrato

A segunda etapa do processo de obtenção dos complexos de óxidos de ferro consistiu no acoplamento da glucosamina seguindo-se o protocolo proposto por Veerapadian (2010) com modificações. Adicionou-se a suspensão formada por nanopartículas de magnetita cobertas com citrato (FMGNcit) uma solução contendo 50 mM de NHS e 200 mM de EDC em PBS/Tween 20. Após a adição, a solução foi mantida sob agitação por 1 hora. Em seguida, a suspensão, denominada FMGN-CIT-EDC/NHS, foi submetida ao processo de diálise por um período de 24 horas para eliminar os reagentes EDC/NHS livres da suspensão.

A última etapa da síntese consistiu na introdução do cloridrato de glucosamina. Foi adicionado uma solução 10 mM de glucosamina em PBS/Tween20 à suspensão FMGN-EDC/NHS, sob agitação. Em seguida, a suspensão resultante, denominada FMGN-GLU foi submetida ao processo de diálise por um período de 24 horas para eliminar a glucosamina livre da dispersão. O sólido obtido por meio do processo de liofilização deste fluido foi denominado de SMGN-GLU.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS

4.3.1 Caracterização do cloridrato de glucosamina

A caracterização do cloridrato de glucosamina, na forma de pó, foi realizada empregando-se as técnicas de FT-IR, EDL e TG. O espectro de FT-IR foi obtido em pastilhas de KBr, medindo a absorvância na faixa de 350 a 4000 cm^{-1} com 64 scans e resolução de 4 cm^{-1} . A análise termogravimétrica foi obtida em suportes de

alumina em atmosfera inerte (N_2) de 25°C a 500°C, com a variação de temperatura de 10°C/min e fluxo de N_2 de 30 ml/min. Enquanto o valor da carga superficial foi obtido por meio de medidas de potencial ζ , em amostras diluídas de 1:1000 em água deionizada de uma solução 1mg/mL de cloridrato de glucosamina (pH=6,8).

4.3.2 Caracterização das nanopartículas

Os complexos magnéticos produzidos pelo método de co-precipitação dos íons de ferro em meio aquoso, funcionalizadas com o cloridrato de glucosamina, foram caracterizados na forma de suspensões ou sólidos nanoparticulados, empregando-se as técnicas ilustradas na Figura 3.3. A investigação da morfologia e o diâmetro dos óxidos de ferro foi realizada por meio da técnica de MET, enquanto que o diâmetro hidrodinâmico do sólido disperso e o potencial ζ foram obtidos das suspensões coloidais (FMGN e FMGNGLU). As amostras utilizadas nas duas primeiras técnicas foram preparadas a partir de uma diluição de 1:1000 do fluido magnético em água deionizada. Para a análise de MET, gotejou-se 20 microlitros do fluido magnético em telas cobertas com uma película de carbono.

Os sólidos foram obtidos pelo processo de liofilização dos fluidos, no qual as amostras passaram por um período de congelamento a -20°C e foram colocadas a vácuo sob refrigeração por 3 dias. O aparelho utilizado para esse processo foi o Liofilizador L101 (Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil), do Laboratório de Toxinologia (Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília). Os sólidos foram caracterizados pelas técnicas de Raman, a temperatura ambiente; espectroscopia no infravermelho, utilizando pastilhas de KBr; enquanto as análises termogravimétricas foram realizadas em suportes de alumina em atmosfera inerte (N_2), com rampa de aquecimento de 10°C/min, na faixa de 25°C a 500°C e fluxo de N_2 de 30 ml/min.

4.3.3 Estabilidade dos fluidos magnéticos

A estabilidade das dispersões coloidais sintetizadas foram monitoradas em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas após a síntese, visando aplicações biomédicas. Por meio de medidas do diâmetro hidrodinâmico e imagens digitais, foram monitoradas as dispersões finais, assim como suas diluições em DMEM e PBS em proporções de 1:3 de volume de fluido em relação ao diluente.

4.3.4 Teste de Toxicidade

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio do método colorimétrico do brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Esta técnica baseia-se na análise da redução do reagente MTT em formazan por meio da ação das enzimas desidrogenases mitocondriais que, quando presentes tornam-se um indicativo de viabilidade celular. A redução do MTT gera a formação de cristais roxos de formazan, os quais são quantificados por meio da técnica de espectrofotometria UV-vis (HUSSAIN et al., 1993).

O cultivo de células de fibroblastos, retirados da polpa dentária humana, foi realizado inicialmente em garrafa de cultivo, em ambiente com 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibiótico à temperatura de 37°C. As células foram posteriormente cultivadas em placas de 96 poços, seguindo-se o mesmo procedimento. A suspensão coloidal contendo o fármaco, e o mesmo usado como controle (cloridrato de glucosamina – GLU), foram adicionados à cultura de células na proporção de 1:3 entre FM e DMEM. Após o período de incubação (24, 48 e 72 horas), foi feita a remoção da suspensão e os poços foram lavados com PBS.

Com o objetivo de eliminar a interferência da coloração dos fármacos e do meio na reação colorimétrica analisada pelo espectrofotômetro, realizou-se também

tratamentos dos poços sem células, onde os valores obtidos por esses foram utilizados como brancos para posterior normalização dos resultados. A análise estatística foi realizada utilizando-se os teste ANOVA one-way e two-way com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desse trabalho, que teve como objetivo sintetizar e caracterizar complexos magnéticos biocompatíveis funcionalizados com cloridrato de glucosamina. Inicialmente serão descritos os dados obtidos da caracterização do cloridrato de glucosamina, empregada como controle, e em seguida os resultados da caracterização do complexo formado por nanopartículas de magnetita funcionalizada com glucosamina. Em adição, serão apresentados o estudo da estabilidade do complexo magnético em meio biológico em função do tempo até 72 horas, bem como os resultados dos testes de toxicidade empregando o ensaio de MTT, em células fibroblastos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO CLORIDRATO DE GLUCOSAMINA

A Figura 5.1 mostra o espectro Raman obtido da amostra de cloridrato de glucosamina na forma de pó à temperatura ambiente. O ajuste dos dados foi realizado por meio de funções lorentzianas. A identificação dos modos vibracionais foi realizada considerando-se os dados disponíveis na literatura, conforme foi discutido no Capítulo 3. A análise do espectro apresentado na Figura 5.1 pode ser feita considerando-se que o espectro Raman do cloridrato de glucosamina na região de 600 a 1500 cm^{-1} pode ser dividido em três regiões, onde cada uma representa características distintas dessa molécula (ALASDAIR, 1993). A primeira região, que apresenta modos vibracionais abaixo de 900 cm^{-1} , é chamada de anomérica. Na segunda região, denominada *finger print*, é possível fazer a identificação da molécula de glucosamina. Essa região se estende de 950 a 1200 cm^{-1} , sendo a região de maior importância do espectro de glucosamina, portanto será a mais explorada neste estudo. A terceira região corresponde às deformações de CH_2 e

COH e que varia de 1200 a 1500 cm^{-1} , mostra os modos vibracionais dos grupos CH_2 e -COH (SHE, 1974; ALASDAIR, 1993).

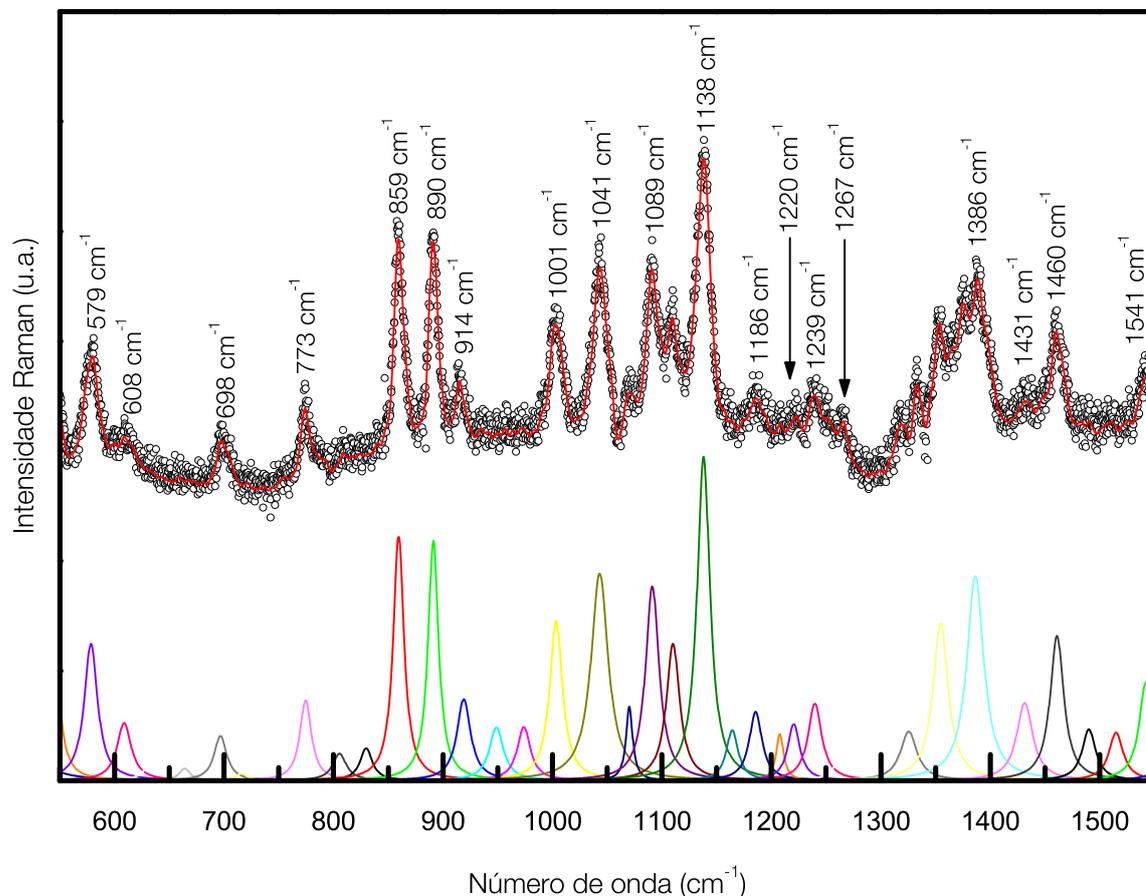


Figura 5.1 – Espectroscopia Raman da amostra de glucosamina pura.

Observa-se no espectro Raman obtido da amostra de cloridrato de glucosamina (Figura 5.1) a presença de bandas característicos em todas as três regiões citadas anteriormente. Na análise da região de deformações de CH_2 e COH , é possível identificar a presença de bandas devido à interação do grupo hidroxil, quando em posição axial, com o grupo hidroximetil exocíclico e o oxigênio presentes no anel aromático.

As bandas em 829 cm^{-1} e 859 cm^{-1} podem ser atribuídas à vibração da ligação alfa dos dissacarídeos, envolvendo o carbono 1 de uma unidade de glucosamina e o carbono 5 de outra unidade de glucosamina. Enquanto a região

entre 891 cm^{-1} e 948 cm^{-1} é uma região de ruído, fazendo com que haja uma variação nas posições das bandas que podem ser atribuídas à vibração do anel da molécula de glucosamina (VASKO, 1971; ALASDAIR, 1993).

Na região de *finger print*, as bandas são originadas por deformações nas ligações dos grupos -C-O-H e nas ligações endocíclicas e exocíclicas de -C-O presente anel da molécula de glucosamina. As vibrações presentes nesta região são de difícil interpretação devido à presença dessas ligações -C-O-C e -C-C . Em particular, a banda em 1001 cm^{-1} é característica da presença do grupo metileno na posição do carbono 6. Os modos vibracionais presentes na região entre 1110 cm^{-1} e 1140 cm^{-1} são atribuídos à vibração da estrutura endocíclica da ligação -C-O . Enquanto a banda em 1138 cm^{-1} se refere à vibração do grupo metileno e do grupo fenol em torno do anel (VASKO, 1971; ALASDAIR, 1993).

Na terceira região, podemos observar a presença de bandas centradas em 1220 cm^{-1} , 1239 cm^{-1} , 1267 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} , 1431 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} . A banda em 1220 cm^{-1} , ocorre devido à presença da amina no carbono 2. A banda em 1239 cm^{-1} é atribuída à vibração da ligação -C-C , enquanto a banda em 1267 cm^{-1} refere-se aos modos vibracionais relativos ao grupo metileno e -COH em torno do anel. A banda em 1460 cm^{-1} é característica da vibração assimétrica do grupo metil (VASKO, 1971;ALASDAIR, 1993).

A Figura 5.2 mostra o espectro infravermelho obtido da amostra de cloridrato de glucosamina na forma de pó à temperatura ambiente entre 1700 à 1150 cm^{-1} uma vez que, de acordo com a literatura, a região apresenta bandas características para o cloridrato de glucosamina (Tabela 5.1). As bandas em 1064 , 1183 , 1250 e 1420 cm^{-1} são características da vibração da ligação -C-O-C- . A deformação da ligação

-CH pode ser observada em 1396 cm^{-1} . Entre 1500 e 1700 cm^{-1} , podemos observar vibrações referentes ao grupo amina presente na molécula de glucosamina, assim, essa região é considerada a de maior importância no espectro de FT-IR dessa molécula (DAYOUNG, 2008). Portanto, as bandas em 1536 , 1585 podem ser atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico, respectivamente da amina primária da glucosamina (FOOT, 2005). A banda em 1617 cm^{-1} pode ser atribuída a vibração do grupo -NH.

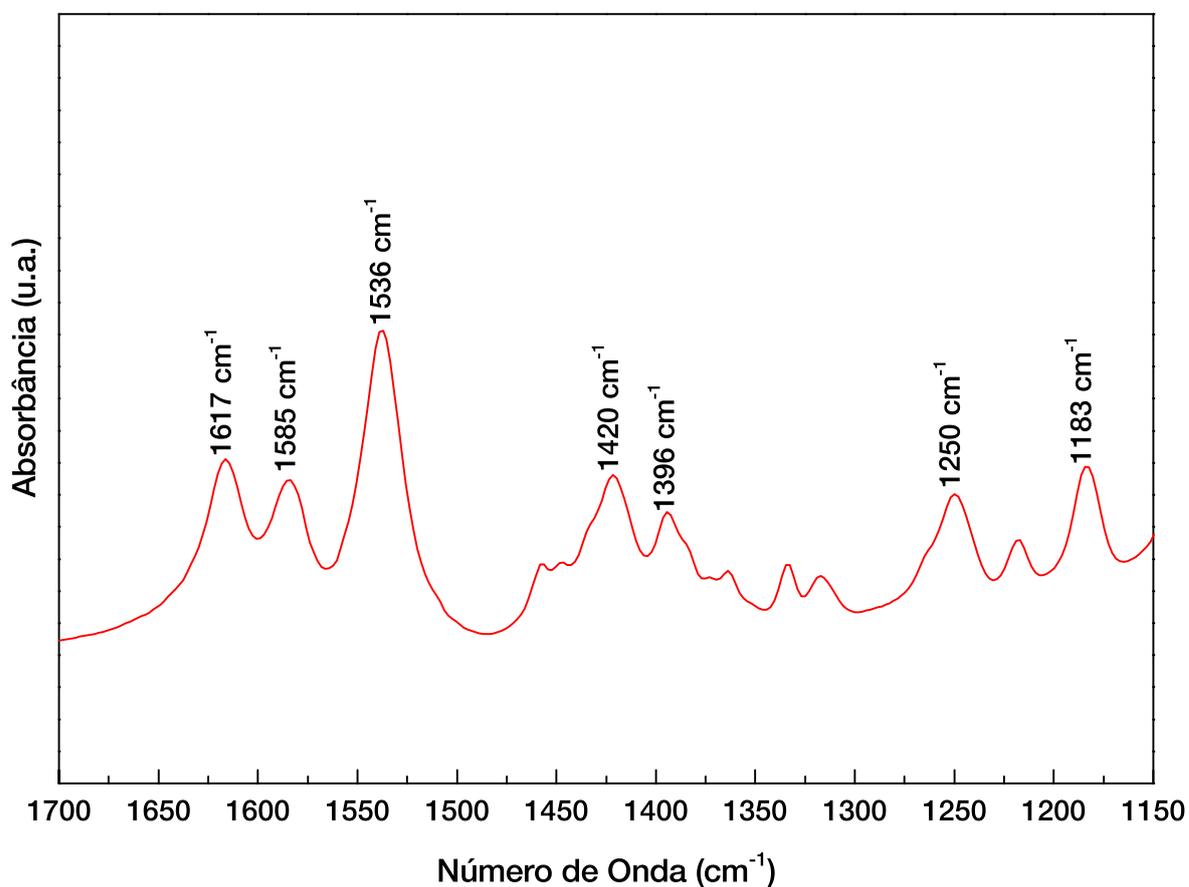


Figura 5.2 – Espectro infravermelho obtido para a amostra de glucosamina.

Tabela 5.1 – Relação das principais bandas observadas no espectro infravermelho da amostra de cloridrato de glucosamina, apresentado na Figura 5.2.

Banda	ν (cm^{-1})
Estiramento -C-O-C	1396 cm^{-1}
Estiramento simétrico amina primária	1536 cm^{-1}
Estiramento assimétrico amina primária	1585 cm^{-1}
Estiramento -NH	1617 cm^{-1}

No espectro de termogravimetria para a amostra GLU (Figura 5.3) observa-se uma perda total de 60%. Este é apresentado em dois estágios, onde o primeiro estágio, entre 178 e 250°C, pode ser atribuído a água adsorvida, no qual houve uma perda de 48%. O segundo estágio, entre 250 e 345°C, é atribuído ao cloridrato de glucosamina, onde houve uma perda de 12% (Tabela 5.2).

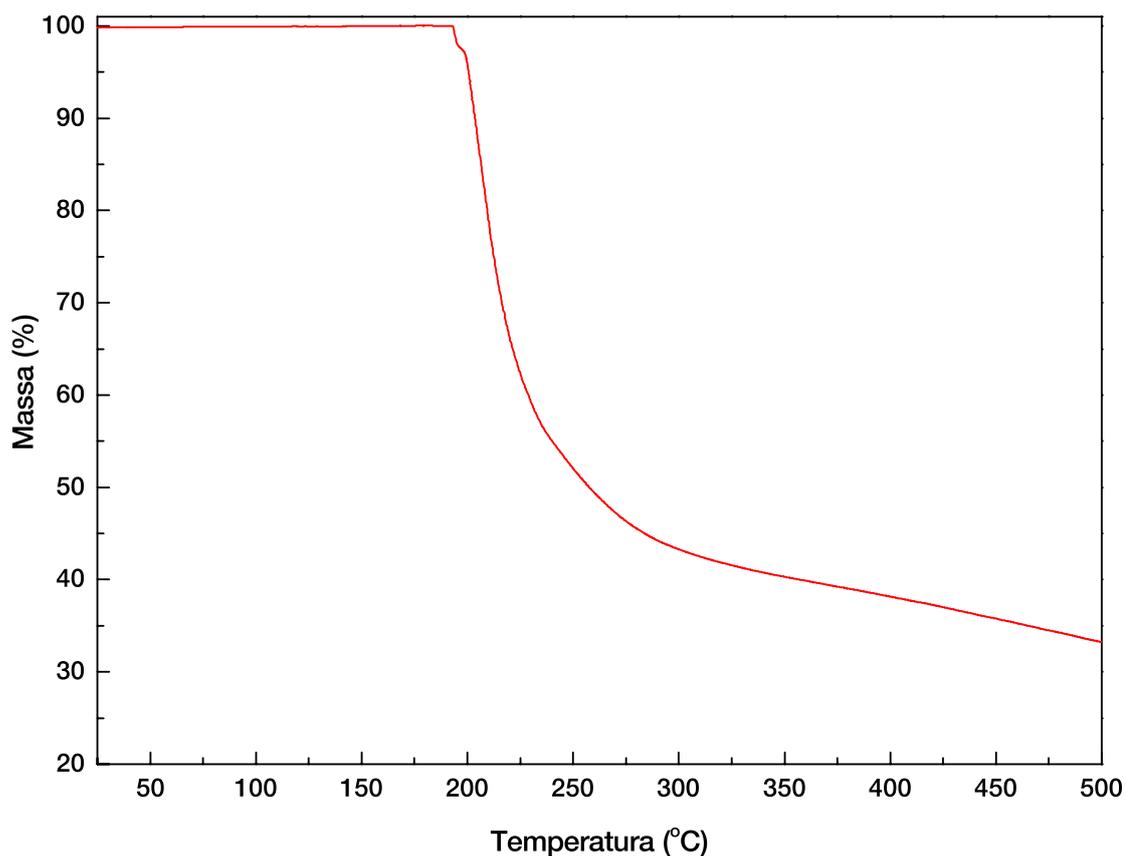


Figura 5.3 – Curva de termogravimetria da amostra de cloridrato de glucosamina (GLU).

Tabela 5.2 – Estágios de decomposição térmica da amostra de cloridrato de glucosamina.

Estágio					
I			II		
Perda (%)	Posição (°C)	Atribuição	Perda (%)	Posição (°C)	Atribuição
48,00	178~250	Água	12,00	250~345	Cloridrato de glucosamina

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS MAGNÉTICOS

Inicialmente serão apresentados os resultados referentes à caracterização dos fluidos magnéticos para obtenção da concentração de ferro na dispersão coloidal, o diâmetro e a morfologia das nanopartículas, o tamanho hidrodinâmico e a carga superficial. Em seguida, serão apresentados os resultados relativos à caracterização das amostras sólidas mostrando a identificação do material produzido, o acoplamento da glucosamina na superfície das partículas, bem como a obtenção da massa da cobertura.

5.2.1 Caracterização das suspensões coloidais

A concentração de ferro presente nas suspensões coloidais FMGN e FMGNGLU foi estimada empregando-se uma curva de calibração de dados da intensidade da banda de absorbância em 460 nm obtidos de espectros UV-Vis em função de dados da concentração de ferro gerados a partir da técnica de absorção atômica. Para a amostra FMGN, a concentração de ferro determinada foi 10,5 mg/L, enquanto para a amostra FMGNGLU a concentração foi de 2,52 mg/L. É possível observar uma diminuição significativa da concentração de ferro na amostra FMGNGLU, em relação à amostra precursora. Isso pode ser atribuído ao processo de dialise, assim como pelas diluições realizadas durante o processo de funcionalização.

A Figura 5.4a mostra uma imagem típica de microscopia eletrônica de transmissão da amostra FMGNGLU. Observa-se partículas em geral de formato esférico, porém, a diluição realizada não foi suficiente para evitar a aglomeração das mesmas. O histograma apresentado na Figura 5.4b foi obtido a partir de diversas micrografias. Após o ajuste obteve-se o diâmetro médio $D_{MET} = 6,31 \pm 0,02$ nm e dispersão de tamanho $\sigma = 0,25 \pm 0,02$ nm. Este valor de diâmetro médio para as nanopartículas de óxidos de ferro, sugere que elas apresentam comportamento superparamagnético (SOLER, 2011). É possível observar pelo valor da dispersão de tamanho obtido das nanopartículas que a amostra é polidispersa.

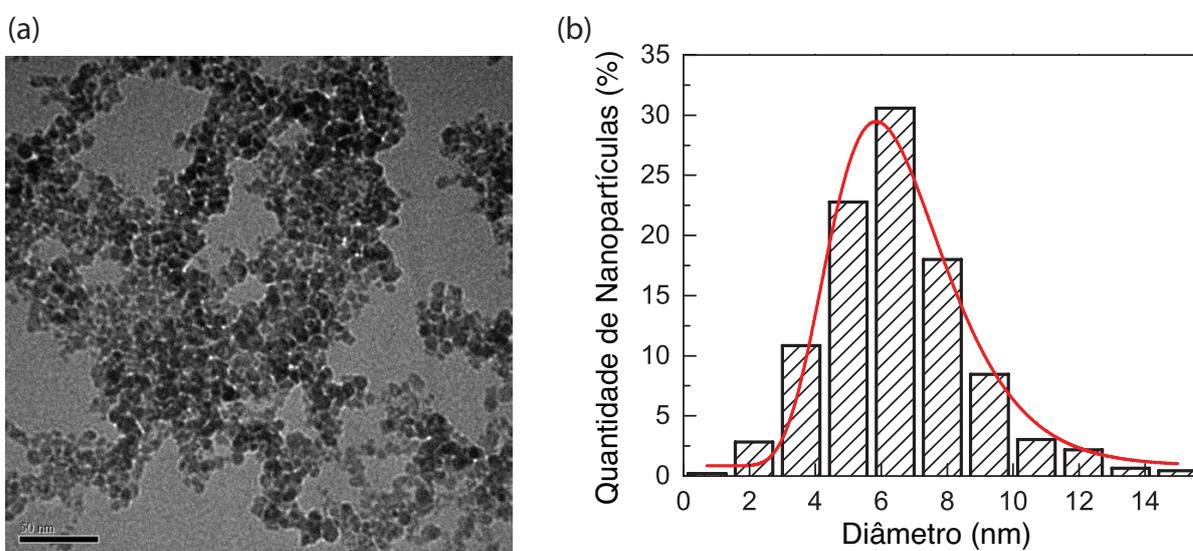


Figura 5.4 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra de magnetita funcionalizada com glucosamina (a) e histograma de distribuição obtido (b).

As suspensões coloidais foram caracterizadas por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz, assim como do potencial ζ . As medidas de potencial ζ foram realizadas para monitorar a mudança de carga superficial à medida que as camadas moleculares eram adsorvidas na superfície das nanopartículas, além de fornecer informação sobre estabilidade das suspensões. Suspensões com valores de potencial ζ superior a 30 mV ou inferior a -30 mV são consideradas cineticamente

estáveis. As medidas de tamanho hidrodinâmico, conforme foi mencionado, dão informações sobre o estado de aglomeração das partículas.

Os valores obtidos das medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ estão listados na Tabela 5.3. Observa-se que para a amostra de FMGN obteve-se o valor do potencial ζ igual +19,70 mV, enquanto o diâmetro hidrodinâmico (D_H) igual a 50,75 nm. Observa-se o valor de ζ positivo é devido ao fato que as partículas foram dispersas em meio ácido. Em pH ácido, as nanopartículas apresentam-se protonadas, com carga superficial positiva, gerando a repulsão eletrostática entre as mesmas e levando à estabilidade coloidal. As nanopartículas de magnetita funcionalizadas com glucosamina apresentaram D_H 81,83 nm e potencial ζ igual a -34,2 mV, indicando que as moléculas de glucosamina foram adsorvidas na superfície das partículas. O valor negativo do potencial ζ é atribuído à presença dos grupos hidroxila desprotonados na glucosamina. O valor obtido, inferior a -30 mV, indica estabilidade coloidal. Em adição, a inversão da carga nas amostra de positivo para negativo, quando comparadas com a amostra FMGN, evidencia o sucesso na funcionalização das nanopartículas. Com relação aos valores do diâmetro hidrodinâmico, observa-se um aumento para a amostra de FMGNGLU, que pode ser atribuído ao recobrimento dessas nanopartículas com interação entre as cadeias de glucosamina de diferentes partículas gerando *clusters* na suspensão.

Tabela 5.3 – Tabela como os dados de potencial ζ e diâmetro hidrodinâmico das amostras FMGN e FMGNGLU.

Amostra	Potencial ζ	D_H
FMGN	+19,7 mV	50,8 nm
FMGNGLU	-34,2 mV	81,8 nm

5.2.2 Caracterização dos sólidos nanoestruturados

A técnica de espectroscopia Raman foi empregada para o estudo das amostras preparadas na forma de sólidos, visando a identificação da fase do óxido de ferro sintetizada e detecção da presença da cobertura na amostra funcionalizada. A Figura 5.5 apresenta o espectro Raman na faixa de 150 a 800 cm^{-1} , obtido com intensidade do laser igual a 0,25 mW onde se observa as bandas características do óxido de ferro. Esta baixa intensidade foi utilizada para evitar a degradação da amostra (SILVA, S. W., et al. 2003.) O ajuste do espectro foi feito utilizando-se funções lorentzianas.

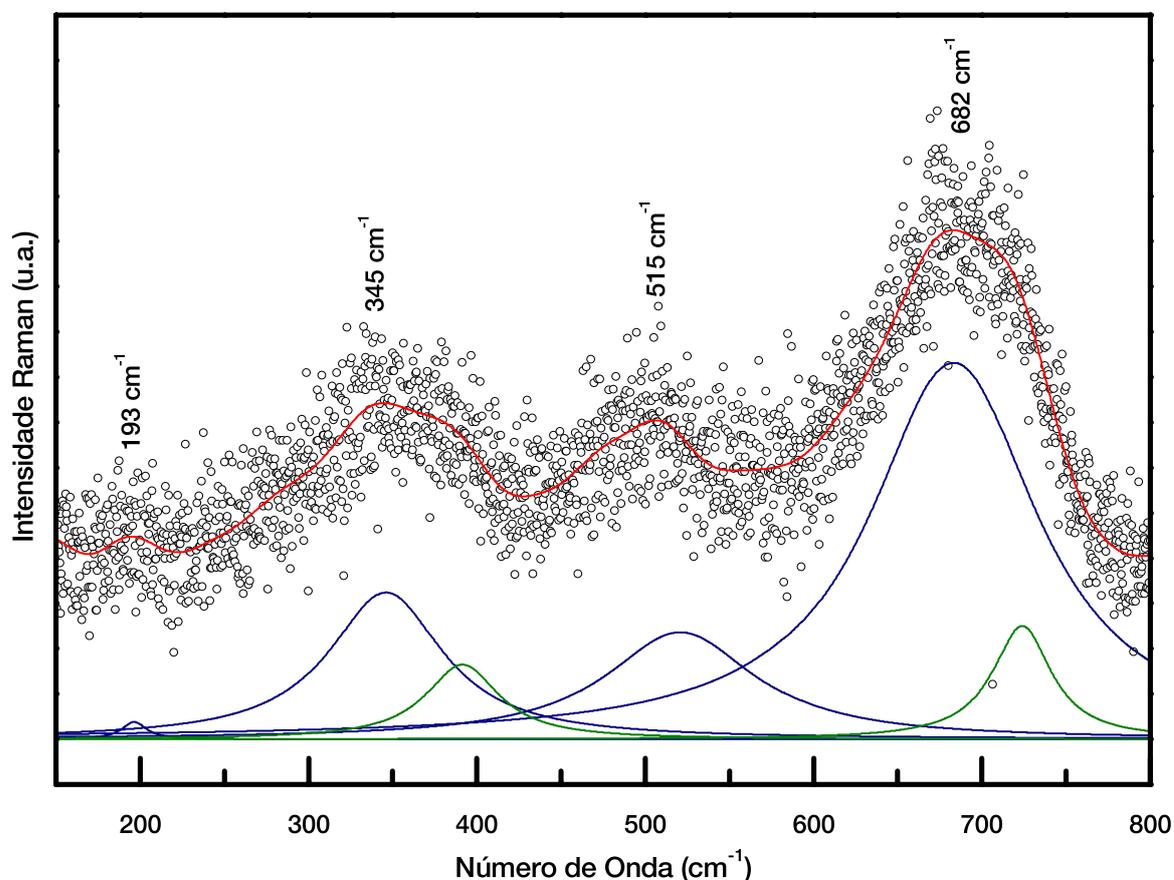


Figura 5.5 – Espectroscopia Raman da amostra de magnetita (SMGN).

Observa-se na Figura 5.5 as bandas características da magnetita, as quais podem ser identificadas considerando-se os modos vibracionais previstos: a banda

em 193 cm^{-1} refere-se à vibração T^1_{2g} , enquanto as bandas em 345 , 515 e 682 cm^{-1} referem-se aos modos vibracionais T^2_{2g} , E_g e A_{1g} respectivamente (Tabela 5.4). A banda em 719 cm^{-1} , entretanto, é característica da maguemita. O comportamento do espectro apresentado indica uma oxidação parcial da magnetita para maguemita, que pode ter sido induzida pelo laser.

Tabela 5.4 – Relação das bandas observadas no espectro Raman da amostra SMGN, apresentado na Figura 5.5.

Banda	$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$
T^1_{2g}	193 cm^{-1}
T^2_{2g}	345 cm^{-1}
E_g	515 cm^{-1}
A_{1g}	682 cm^{-1}

A Figura 5.6 mostra o espectro Raman, com o respectivo ajuste empregando-se junções lorentzianas, para a amostra SMGN-GLU na região de 150 a 2750 cm^{-1} . O espectro foi obtido ao incidir-se na amostra o laser com intensidade $0,25\text{ mW}$. As bandas na faixa de 150 cm^{-1} a 800 cm^{-1} são associadas aos modos vibracionais da estrutura de óxido de ferro espinélio cúbico, conforme foi discutido no Capítulo 3. Assim, as bandas observadas em 315 cm^{-1} , 536 cm^{-1} e 665 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais E_g , $3T_{2g}$ e A_{1g} da magnetita, respectivamente. A banda em 716 cm^{-1} entretanto, é característica da maguemita. Dessa forma, é possível identificar a fase magnetita da amostra SMGN-GLU. As estruturas observadas para maiores números de onda evidenciam a presença do cloridrato glucosamina. A identificação dos modos vibracionais listados na Tabela 5.5 pode ser feita considerando-se o espectro do cloridrato de glucosamina apresentado na Figura 5.1.

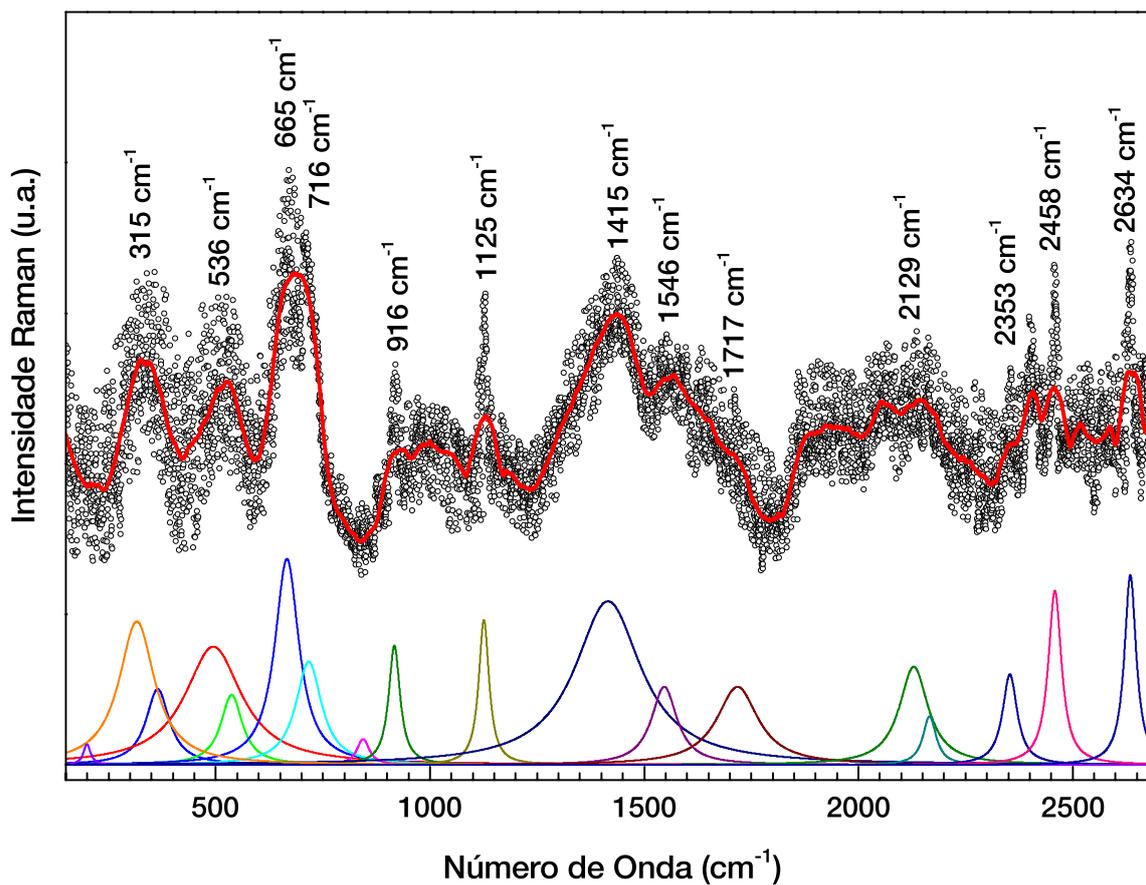


Figura 5.6 –Espectro Raman da amostra de magnetita funcionalizada com glucosamina SMGNGLU.

A banda presente em 916 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração do metileno na posição do carbono 6; o modo vibracional em 974 cm^{-1} refere-se à vibração da ligação entre o grupo -COH- na posição do carbono 2 e o grupo metileno; a banda entre 1125 cm^{-1} e 1397 cm^{-1} , pode ser atribuída às vibrações da ligação -C-O-C- . Observa-se que os modos vibracionais em 1546 cm^{-1} e 1646 cm^{-1} indicam a presença da molécula de glucosamina ligada ao ácido cítrico através da formação de uma amida (VASKO, 1971; ALASDAIR, 1993). O ombro em 1717 cm^{-1} e a banda em 2458 cm^{-1} são atribuídas ao modo vibracional do grupo -NH ; a banda, em 2529 cm^{-1} , é atribuída à vibração da hidroxila presente na água. Em adição, a coordenação entre o ferro da nanopartícula e o grupo carboxilato do ácido cítrico pode ser observada devido à presença dos modos vibracionais relativos ao

estiramento simétrico e assimétrico do grupo -COO^- em 1125 e 1397 cm^{-1} (SOLER, et al., 2007).

Tabela 5.5 Modos Raman da amostra SMGNGLU, cujo espectro está apresentado na Figura 5.6.

Banda	$\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)}$
Est. Simétrico -C(6)H	916 cm^{-1}
Est. Assimétrico -C-2-OH e -CH_2	974 cm^{-1}
Est. Assimétrico -O-C(2)	1125 cm^{-1}
Est. Simétrico -O-C(2)	1397 cm^{-1}
Est. Simétrico Amida	1546 cm^{-1}
Est. Assimétrico Amida	1646 cm^{-1}
Estiramento -NH-	1717 cm^{-1}
Estiramento Simétrico -NH-	2458 cm^{-1}
Estiramento Simétrico -OH	2529 cm^{-1}

A Figura 5.7 mostra o espectro no infravermelho obtido da amostra SMGNGLU dispersa em KBr. As bandas listadas na Tabela 5.6 podem ser identificadas com base nos trabalhos da literatura Veerapadian (2010) e Cael (1973). A banda em 597 cm^{-1} , refere-se ao óxido de ferro; a banda presente em 1060 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do grupo -C-O ; as bandas em 1172 cm^{-1} e 1267 cm^{-1} ao modo vibracional do grupo -C-O , presente na molécula de glucosamina; a presença do grupo metil pode ser observado em 1440 cm^{-1} ; as bandas em 1395 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} referem-se, respectivamente, ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo carboxilato. Através da diferença de posição entre a vibração assimétrica e a vibração simétrica dos carboxilatos, é possível indicar o tipo de coordenação estabelecida entre o grupo carboxílico, presente no ácido cítrico, e o metal, das nanopartículas. Uma vez que estas bandas apresentaram deslocamento $\Delta\tilde{\nu}$ que se encontra entre 91 e 230 cm^{-1} , pode se sugerir uma coordenação do tipo monodentada (SOLER, et al., 2007). Os ombros presentes em 1723 cm^{-1} e 1756 cm^{-1}

¹ referem-se à vibração da ligação do grupo carboxila presentes na molécula de ácido cítrico livre na nanopartícula.

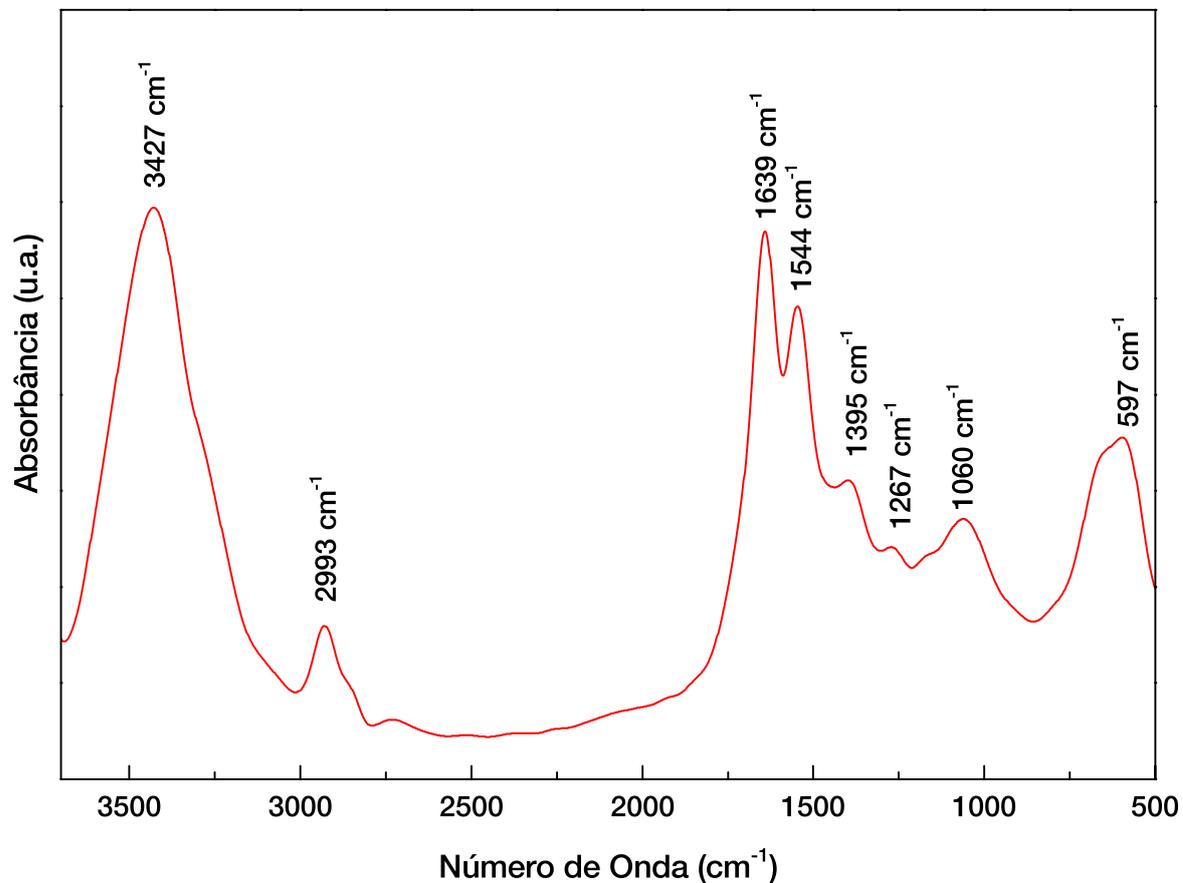


Figura 5.7 – Espectro FT-IR da amostra de magnetita funcionalizada com glucosamina (SMGNGLU).

As bandas presentes na região entre 1500 a 1700 cm^{-1} são características do grupo amina presente no anel, a banda presente em 1544 cm^{-1} refere-se ao estiramento assimétrico do grupo $-\text{NH}_2^+$, enquanto a banda em 1639 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação $-\text{NCOOH}$, caracterizando a interação entre o cloridrato de glucosamina e o ácido cítrico, uma vez que houve um deslocamento significativo da posição da banda quando comparada à da glucosamina na forma livre (VEERAPADIAN, 2010). A banda em 2933 cm^{-1} é atribuída a vibração do grupo metileno presente no ácido cítrico. A última banda, em 3427 cm^{-1} , pode ser atribuída ao grupo hidroxila, podendo essa ser associada à

molécula de glucosamina, ao ácido cítrico, assim como à água presente no sistema. Assim, a análise do espectro da amostra SMGNGLU, apresentado na Figura 5.7, sugere que a glucosamina está associada às nanopartículas de magnetita.

Tabela 5.6 – Relação das bandas observadas no espectro FTIR apresentado na Figura 5.7.

Banda	ν (cm⁻¹)
Est. Simétrico -CO	1060 cm ⁻¹
Est. Assimétrico -CO	1172 cm ⁻¹
Est. Assimétrico -CO	1267 cm ⁻¹
Est. Simétrico -COO ⁻	1395 cm ⁻¹
Est. Simétrico -NH ₂ ⁺	1544 cm ⁻¹
Est. Assimétrico -COO ⁻	1640 cm ⁻¹
Est. Simétrico -NCOOH	1639 cm ⁻¹
Est. Simétrico -COOH	1723 cm ⁻¹
Est. Simétrico -COOH	1756 cm ⁻¹
Est. Simétrico -CH ₂	2933 cm ⁻¹
Est. Simétrico -OH	3427 cm ⁻¹

Com base nas informações adquiridas pela espectroscopia Raman e a espectroscopia no infravermelho, o modelo proposto para a interação entre as nanopartículas, o ácido cítrico e a glucosamina encontra-se ilustrado na Figura 5.8. Observa-se que há uma coordenação monodentada entre o ferro da nanopartícula e o grupo carboxilato do ácido cítrico que, por sua vez, através da ligação -NCOOH formada une-se a molécula de glucosamina.

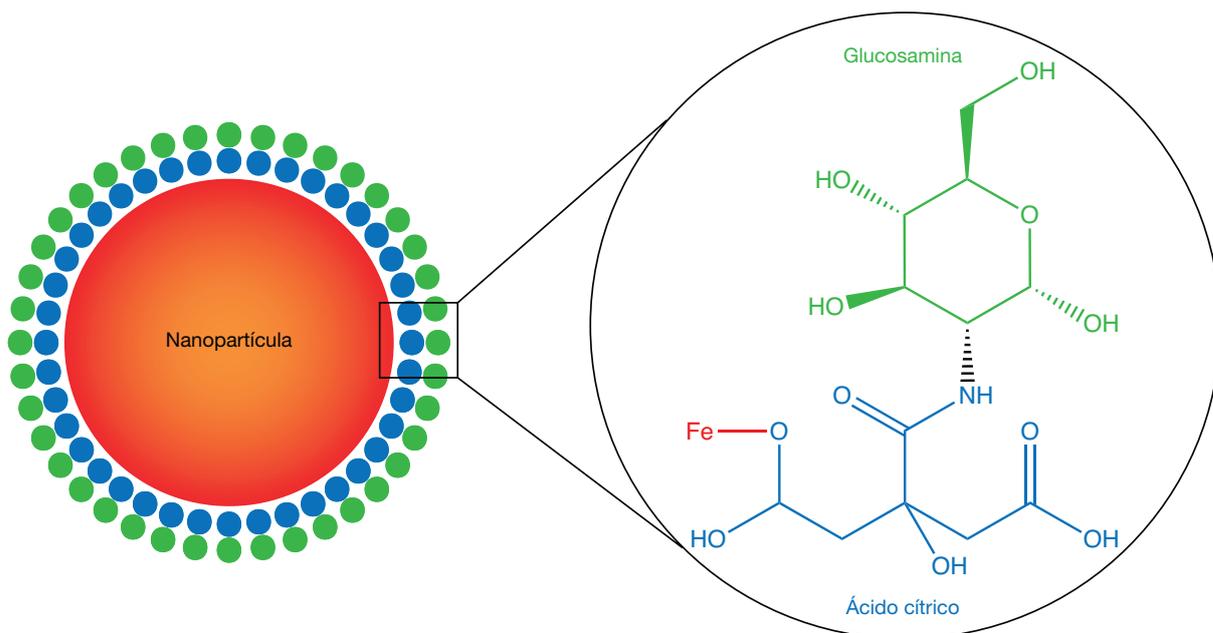


Figura 5.8 – Modelo de interação entre as nanopartículas, o ácido cítrico e a glucosamina.

As Figuras 5.9 e 5.10 mostram os espectros de termogravimetria obtidos das amostras SMGN e SMGNGLU.

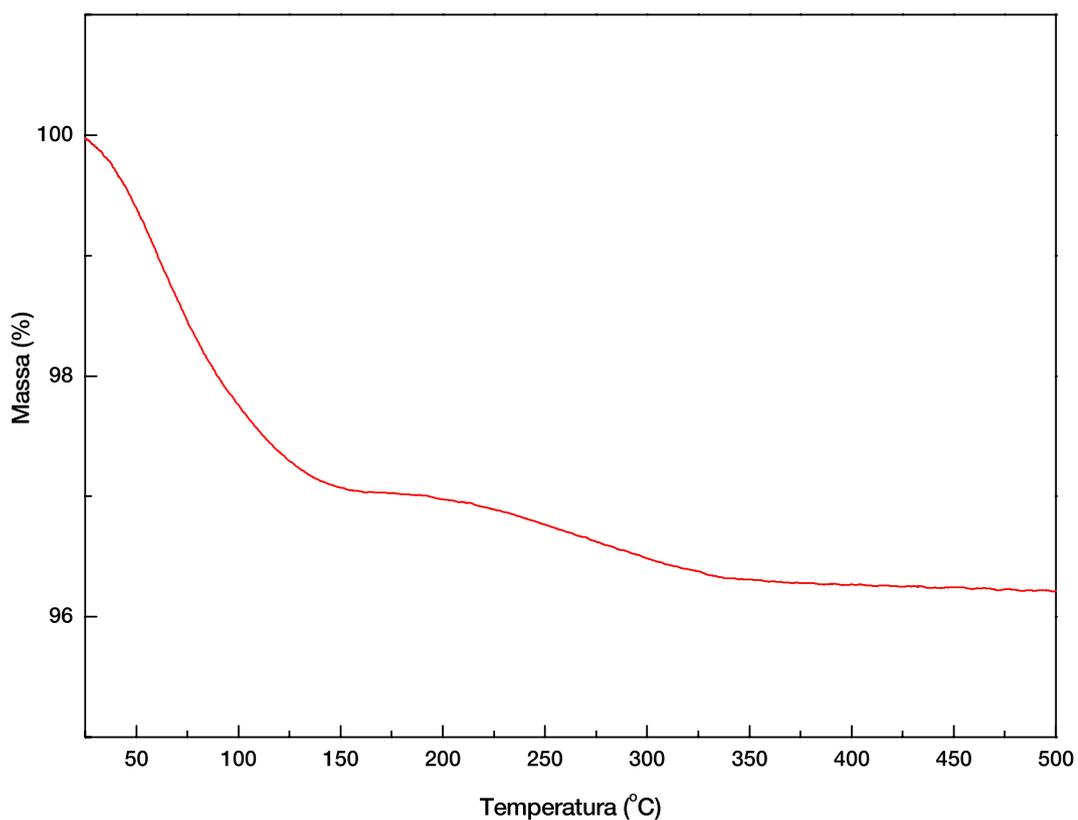


Figura 5.9 – Curva de termogravimetria da amostra de magnetita (SMGM).

Observa-se na Figura 5.9 que, para a amostra SMGN, é possível observar dois estágios de decomposição térmica, cujos dados estão apresentados na Tabela 5.7. A perda total de massa da amostra SMGN pura foi de 3,60%, dos quais 2,97% foram no primeiro estágio, na faixa de temperatura entre 25 à 170 °C, e 0,25% no segundo estágio, para a temperatura variando entre 170 e 360 °C. A variação da massa no primeiro estágio pode ser atribuída à perda de água remanescente no material, entretanto no segundo estágio a perda é atribuída à água adsorvida na superfícies das nanopartículas.

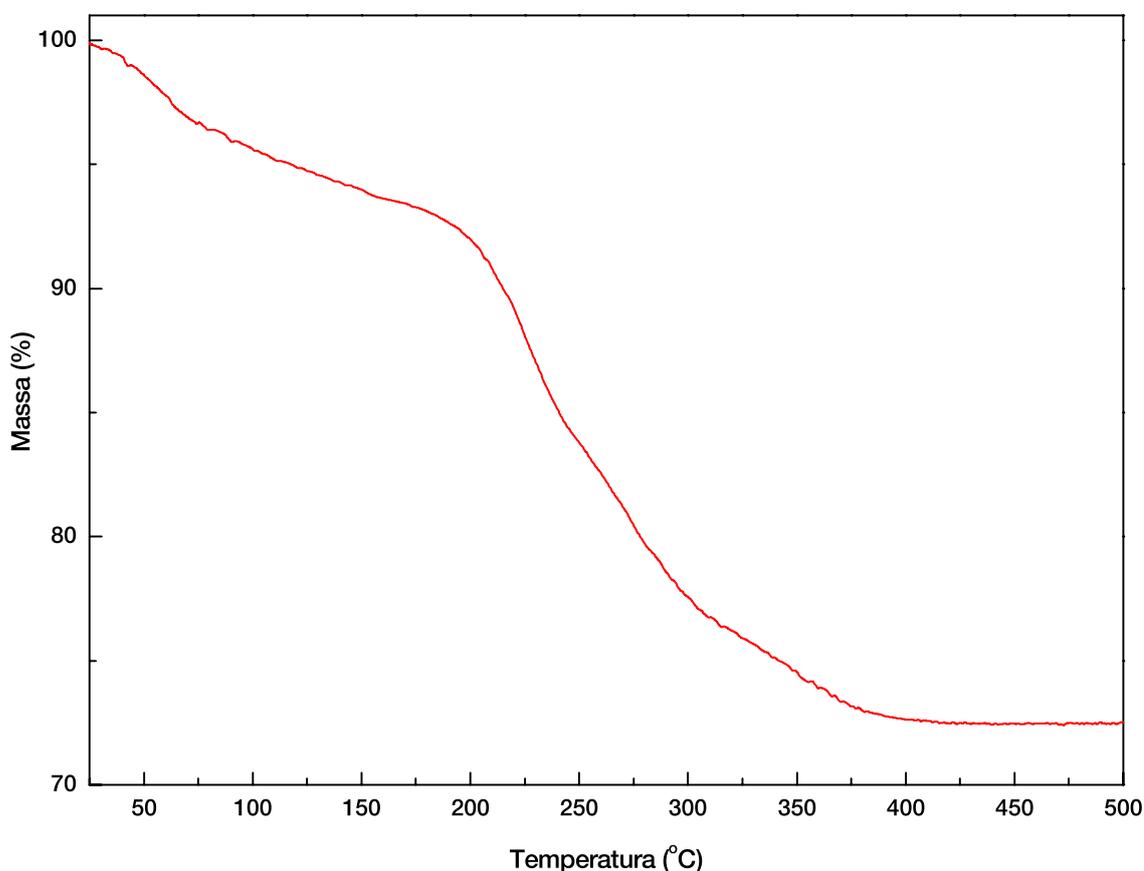


Figura 5.10 – Curva de termogravimetria da amostra de magnetita funcionalizada com cloridrato de glucosamina (SMGNGLU).

Observa-se no espectro de termogravimetria para a amostra de SMGNGLU (Figura 5.10) uma perda total de 28%, apresentando dois estágios de

decomposição, cujos dados encontram-se listados na Tabela 5.7. Durante o primeiro estágio, na faixa de temperatura entre 30 a 170°C, a perda de 7% pode ser atribuída à perda de água remanescente na amostra, enquanto para o segundo estágio (170 a 440°C) a perda de 21%, pode ser atribuída à decomposição térmica da cobertura.

Tabela 5.7 – Estágios de decomposição térmica das amostras de magnetita (SMGN), magnetita funcionalizada com cloridrato de glucosamina (SMGNGLU) e do cloridrato de glucosamina.

Amostra	Estágio					
	I			II		
	Perda (%)	Posição (°C)	Atribuição	Perda (%)	Posição (°C)	Atribuição
SMGN	2,97	25~170	Água	0,75	170~360	Água adsorvida
SMGNGLU	7,00	30~170	Água	21,00	170~440	Cobertura adsorvida

Por meio das curvas de termogravimetria foi possível estimar a massa da cobertura associada às nanopartículas, tendo sido considerada majoritariamente como a massa do cloridrato de glucosamina adsorvido, resultando em uma concentração aproximada de 20% (p/p).

5.3 ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS EM MEIO BIOLÓGICO

Considerando-se as possíveis aplicações do complexo magnético sintetizado para o transporte e liberação de fármaco, foi realizado o estudo da estabilidade das suspensões em meio biológico (meio de cultura – DMEM – e tampão – PBS). O monitoramento da estabilidade das suspensões nesses 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 partir de imagens dos fluidos puros e diluídos nos respectivos meios, a cada intervalo de tempo.

O meio de cultura DMEM foi escolhido devido ao fato que as culturas de fibroblastos, linhagem paralelas aos condrócitos e condroblastos, células de interesse do tecido cartilaginoso, são realizadas neste meio. Enquanto o tampão PBS foi escolhido por ser utilizado como solvente e tampão na formulação do DMEM. A Figura 5.11 apresenta as imagens adquiridas das suspensões, assim como de suas diluições em DMEM e PBS em função do tempo decorrido após a preparação das suspensões.

Observa-se nas imagens (Figura 5.11) e nos valores do D_H , apresentados na Tabela 5.8, que os fluidos magnéticos apresentaram diferentes períodos de estabilidade.

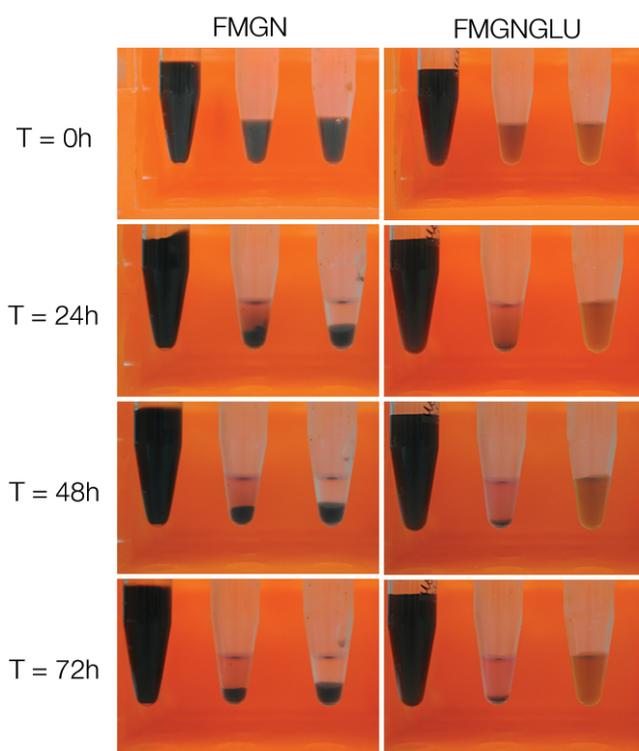


Figura 5.11 – Imagens obtidas dos fluidos magnéticos FMGN e FMGNGLU para os tempos de 24, 48 e 72 horas. Para cada amostra, o tubo à esquerda é o fluido puro, o tubo do centro é o fluido diluído em DMEM e o tubo à direita é o fluido diluído em PBS.

As suspensões FMGN e FMGNGLU se mantiveram estáveis durante todo o tempo de monitoramento (72 horas), não sendo possível observar sedimentos. Em

adição, a amostra FMGN apresentou valores do D_H variando de 54 a 62 nm, enquanto FMGNGLU mostrou maior flutuação nos valores de D_H , variando de 33 a 633 nm. Quando diluída com DMEM, na proporção de 1:3, a amostra de FMGN apresentou início de sedimentação após 24 horas do início do monitoramento e sedimentou após 48 horas. Em adição, quando diluída em PBS, sedimentou após 24 horas. A amostra de FMGNGLU, quando diluída em DMEM, iniciou o processo de sedimentação após 24 horas do monitoramento e sedimentou após 48 horas. Quando diluída em PBS, por sua vez, manteve-se estável durante todo o período de monitoramento (72 horas), não sendo possível observar sedimentos.

A falta de estabilidade da amostra FMGN, quando diluída em DMEN ou PBS, ocorre devido à alteração do pH no meio, uma vez que a amostra é estável em pH ácido devido à repulsão eletrostática entre as partículas. A adição do tampão PBS, assim como do meio de cultura DMEM, levam a uma alteração do pH do meio (pH 7,2), levando à precipitação.

A amostra de FMGNGLU diluída em PBS apresentou um comportamento esperado uma vez que a sua síntese foi realizada em meio PBS/Tween 20. Entretanto, para a amostra diluída em DMEN, embora o pH seja o mesmo do PBS, não houve estabilidade pois à adição de radicais fez com que ocorra um deslocamento do equilíbrio, levando à neutralização dos terminais livres da molécula de glucosamina, gerando a floculação.

Pode-se observar pela Tabela 5.8 que a adição do tampão PBS, assim como do meio DMEM, levou a um aumento do diâmetro hidrodinâmico, independentemente do tipo do coloide.

Tabela 5.8 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) obtidos em função do tempo após a preparação das amostras FMGN e FMGNGLU para os tempos de 24, 48 e 72 horas após a síntese

Amostra	FMGN			FMGNGLU		
	Puro	DMEM	PBS	Puro	DMEM	PBS
0	50,8	206,2	283,7	34,3	465,9	33,1
24	59,3	–	-	86,2	–	266,0
48	34,8	–	-	122,4	–	416,0
72	62,5	–	-	220,2	–	633,0

5.4 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE

As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam a viabilidade celular para o grupo controle (CTRL), células tratadas com cloridrato de glucosamina (GLU) e células tratadas com o fluido de nanopartículas de magnetita cobertas com cloridrato de glucosamina (FMGNGLU), durante 24, 48 e 72 horas de tratamento em duas concentrações de cloridrato de glucosamina (0,125 mg/mL e 0,250 mg/mL), respectivamente.

Observa-se que o grupo FMGNGLU, bem como o GLU, apresentaram viabilidade celular comparáveis ao controle para ambas as concentrações durante todo o tempo de estudo. Para o grupo FMGNGLU, em ambas as concentrações, a viabilidade celular manteve-se acima do controle durante todo o tempo observado, sendo que a menor concentração ficou em torno de 50% maior do que o controle, para o período de 48 horas, e aumentou ainda mais para 72 horas. A viabilidade celular para o grupo de maior concentração apresentou o mesmo comportamento, entretanto com viabilidade celular menor do que a apresentada pelo grupo de menor concentração. No caso do grupo GLU, decorridos 48 horas observa-se que, para a menor concentração, manteve-se o aumento observado em 24 horas, porém para a maior concentração houve um aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao controle. Esse aumento manteve-se para essa amostra em 72 horas.

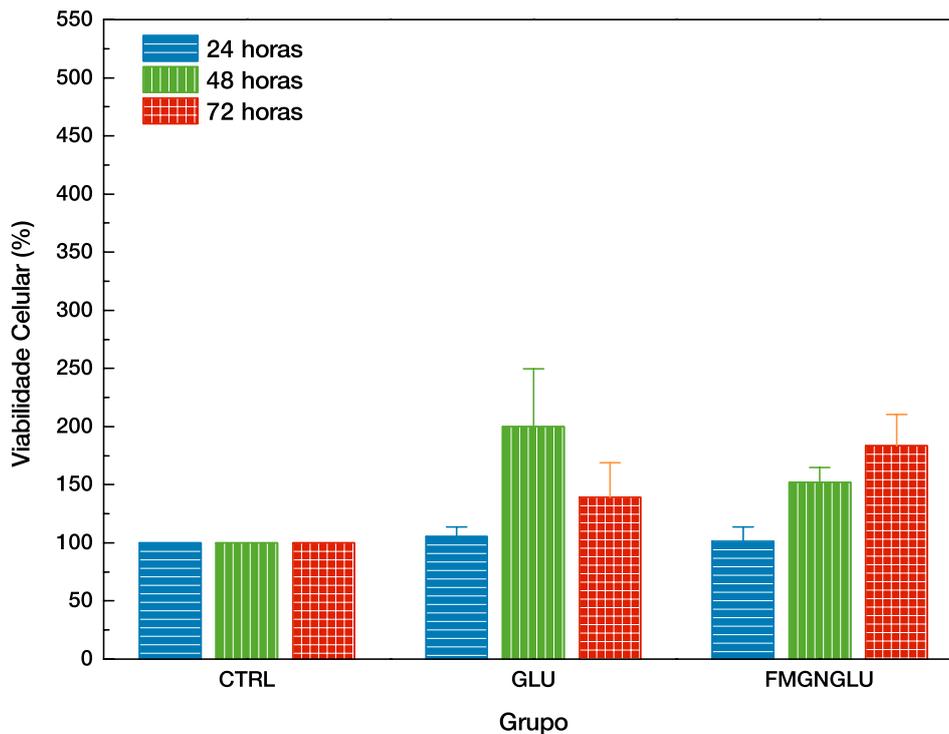


Figura 5.12 – Viabilidade celular dos grupos CTRL, GLU e FMGNGLU com a concentração de glucosamina igual a 0,125 mg/mL para os tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas.

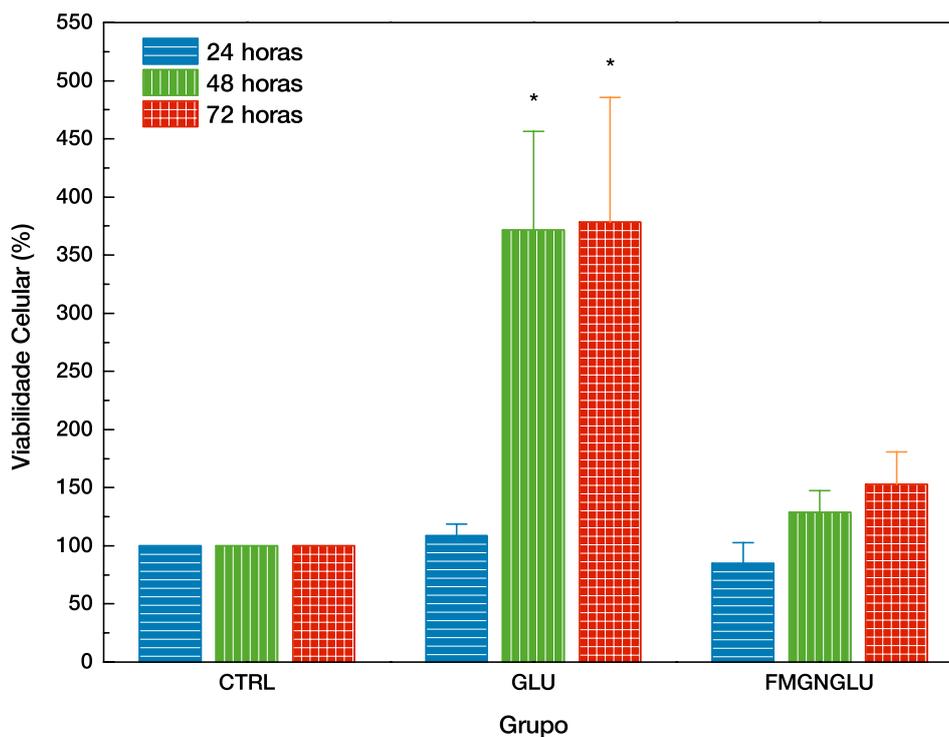


Figura 5.13 – Viabilidade celular dos grupos CTRL, GLU e FMGNGLU com a concentração de glucosamina igual a 0,250 mg/mL para os tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas.

O crescimento celular, estimulado pela presença da glucosamina no meio, pode ser explicado uma vez que esta inibe a ação de enzimas catabólicas e reduz os níveis de interleucinas (HUA, et al., 2002). O aumento significativo da viabilidade celular observado para a menor concentração de glucosamina (Figura 5.12) no grupo GLU, quando comparado ao grupo FMGNGLU, pode ser explicado pelo fato de que no grupo GLU, a glucosamina encontra-se livre no meio, enquanto que no grupo FMGNGLU a glucosamina teria que ser primeiramente separada do complexo para então ser utilizada pelas células. Essa liberação da glucosamina ocorre de duas formas, uma lenta e outra rápida, já que a glucosamina interage de formas diferentes com as nanopartículas. Na primeira forma, a glucosamina encontra-se ligada às nanopartículas através da ligação $-NCOOH$, portanto, a liberação da glucosamina é mais lenta nesta forma uma vez que as ligações devem ser primeiramente quebradas. Na segunda forma, ocorre interação eletrostática entre a glucosamina e as nanopartículas, portanto, por se tratar de uma interação fraca, quando em contato com o meio, a interação é diminuída e há liberação do cloridrato e glucosamina.

Dessa forma, os resultados obtidos através do ensaio do MTT demonstram que o nanocomposto produzido possui alta biocompatibilidade.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um processo de síntese para obtenção de complexos nanoestruturados coloidais compostos por nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com cloridrato de glucosamina. As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por meio da técnica de coprecipitação em meio aquoso e posteriormente funcionalizada. A caracterização dos nanomateriais produzidos foi realizada empregando as técnicas de espectroscopia Raman, infravermelho, termogravimetria, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento dinâmico de luz. Em seguida a estabilidade das suspensões coloidais produzidas foi monitorada em função do tempo de armazenamento por um período de 72 horas após a síntese. Em adição, a viabilidade celular de células fibroblastos foi realizada empregando-se o ensaio de MTT.

Os resultados da caracterização dos fluidos magnéticos sintetizados mostraram a presença de interação entre a superfície da nanopartículas e a cobertura, bem como funcionalização com cloridrato de glucosamina. Por meio da estabilidade coloidal, foi possível observar que a amostra FMGNGLU quando adicionada ao PBS, manteve-se estável, tornando viável sua aplicação biológica, uma vez que o PBS apresenta o pH idêntico ao meio biológico. Por das análises dos resultados do ensaio de MTT, foi possível observar que a amostra de FMGNGLU, assim como a amostra de GLU, não apresentaram citotoxicidade. Essas apresentaram um aumento na viabilidade celular, fator desejável no tratamento da osteoartrite.

Assim os resultados obtidos demonstram que o nanocomposto produzido à base de nanopartículas de óxido de ferro recobertas com glucosamina possui alta

biocompatibilidade e grande potencial como sistema de liberação de glucosamina para o tratamento da osteoartrite.

Como perspectivas futuras, pode-se sugerir o estudo da citotoxicidade do coloide *in vivo*, assim como a eficácia terapêutica dos complexos nanoestruturados produzidos para o tratamento da osteoartrite.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. *Imunologia Celular e Molecular* Ed. **Saunders**, 5 edição, 2008
- ALCANTARA, G.B., et al., Layer-by-layer Assembled Cobalt Ferrite Nanoparticles for Chemical Sensing **Phys.Chem. Chem. Phys.**, vol. 15, pg. 175-183, 2013.
- ALISATOS AP Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. **Science** vol. 271, p.933–937, 1996.
- ANDERSON, J.W., NICOLOSI, R.J., BORZELLECA, J.F. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 43, pg. 187-201, 2005
- BACRI, J. PERZYNSKI, R., SALIN, D., CABUIL, V., MASSART, R. Ionic Ferrofluids: A crossinf of chemistry and physics. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, vol.85, p. 27-32, 1990
- BANSIL, R.; YANNAS, I. V. e 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.
- BATLLE X, LABARTA A Finite-size effects in fine particles, magnetic and transport properties. **J Phys D: Appl Phys**, vol. 35:R15–R42, 2002
- BEAN CP, LIVINGSTON JD Superparamagnetism. **J Appl Phys** vol. 30:120S–129S, 1959
- BERRY, C.C.; WELLS, S.; CHARLES, S.; CURTIS, A.S.G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 25, p. 4551-4557, Nov. 2003.
- BLUMS E. , C., A. e MAIOROW, M. M. *Magnetic Fluids*. **Walter de Gruyter**, 1985.
- BUCKWALTER J, HUNZIKER E, ROSENBERG L, COUTTS R, ADAMS M, EYRE D. Articular cartilage: composition and structure. In: Woo SLY, Buckwalter JA, eds.

Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues. Park Ridge, IL: **American Academy of Orthopaedic Surgeons**, p.405–425, 1988:

BULTE, JEFF W. M., DARA L. KRAITCHMAN Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. **NMR in biomedicine**, pg. 484-499, 2004.

BUZEA C, PACHECO II, ROBBIE K Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases** , 2007

CAEL, J.J., KOENIG, J.L., BLACKWELL, J. Infrared and Raman Spectroscopy of carbohydrates, **Carbohydrates Research**, vol. 29, pg. 123-134, 1973.

CHOURPA, I.; DOUZIECH-EYROLLES, L.; NGABONI-OKASSA, L.; FOUQUENET, J-F.; COHEN-JONATHAN, S.; SOUC'E, M.; MARCHAIS, H.; DUBOIS, P. 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, out., 2005.

DAHMER, S. e SCHILLER, R. M. Glucosamine. **Am Fam Physician**, v. 78, n. 4, p. 471-6, 2008.

DE FARIA, D.L.A.; SILVA, S.V.; DE OLIVEIRA, M.T. Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. **J. Raman. Spec.**, v.28, n.11, p.873-878, nov., 1997.

GARNETT, M.C.; KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. **Occupational Medicine**, v. 56, n. 5, p. 307-311, Aug. 2006.

GASPAROV LV, TANNER DB, ROMERO DB, BERGER H, MARGARITONDO G, FORRO´ L Infrared and Raman studies of the Verwey transition in magnetite. **Phys Rev B**, vol. 62, pg.7939–7944, 2000.

GUIMARÃES, A. P. Principles of Nanomagnetism. **Springer-Verlag**, 2009.

GUPTA, R.; SOOD, A. K.; METCALF, P.; HONIG, J.M.S. Raman study of stoichiometric and Zn-doped Fe₃O₄. **Phys.Rev. B**, v.65, n.10, p.104430, 2002.

- GURURAJ, A., GRAEME, A.Z, KUSANALE, A., PETER, A.B. Pathogenesis of post-traumatic ankylosis of temporomandibular joint: a critical review. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.50, pg. 8-12, 2012.
- HAMMOND, C. The basics of crystallography and diffraction. **Oxford: Oxford University Press**, 2009.
- HARUTA, M.; DELMON, B.; J. **Chim. Phys.**,v.83, p. 859. 1986.
- HIROSHIMA NAKAMURA Application of glucosamine on humam disease – Osteoarthritis. **Carbohydrate Polymers**, vol. 84, pg. 835-839, 2011.
- HOSAPPLE, M. P.; FARLAND, W. H.; LANDRY, T. D.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; CARTER, J. M.; WALKER, N. J.; THOMAS, K. V. **Research strategies for safety evaluation of nanomaterials part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs**. Toxicological Sciences, v. 88(1), p. 12– 17, 2005.
- HUA, J., SAKAMOTO, K., NAGAOKA, I. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophil. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 71, n.4, pg. 632-640, 2002.
- HUSKISSON, E. C. Glucosamine and Chondroitin for Osteoarthritis. **Journal of International Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 1161-1179, 2008.
- HUSSAIN, R., A. NOURI, et al. "A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay." *Journal of immunological methods* 160(1): 89-96.
- JACINTHO, G. V. M. *et al.* Structural investigation of MFe₂O₄ (M 1/4 Fe, Co) magnetic fluids. **J Phys Chem C**, v. 113, n. 18, p. 7684–7691, abr., 2009.
- JEROSCH, J Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids International **Journal of Rheumatology**, pg. 17, 2011
- JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 11ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2008.

- KANG, Y. S. *et al.* Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ Particles. **Chem. Mater.**, v. 8, n. 9, p. 2209-2211, set. 1996.
- KETERRING, M., *et al.* Magnetic Nanoparticles as biomodal tools in magnetically induced labeling and magnetic heating of tumour cells. **Nanotechnology**, pg. 1-9, 2007.
- KIRKHAM, S. G. e SAMARASINGHE, R. K. Review article: glucosamine. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 17, n. 1, p. 72-76, 2009.
- 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.
- LIN, PO-CHIAO, MEI-CHUN TSENG, AN-KAI SU, YU-JU CHEN, e CHUN-CHENG LIN. Funcionalized Magnetic Nanoparticles for Small-Molecule Isolation Indentification, and Quantificaton of Magnetic Nanoparticles for Small-Molecule Isolation, **Analytical Chemistry**, pg. 3401-3408, 2007.
- MAHMOUDI, M.; SAHRAIAN, M. A.; SHOKRGOZAR, M. A. *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.
- MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE**, v.17, n.2, p.1247-1248, mar.1981.
- MASSART, R.; ROGER, J.; CABUIL, V. New Trends in Chemistry of Magnetic Colloids: Polar and Non Polar Magnetic Fluids, Emulsions, Capsules and Vesicles, **Braz. J. Phys.**, v.25, n.2, p.135-141, jun.1995.
- MAZZUCHELLI, S.; COLOMBO, M.; DE PALMA, C. *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.

- MEI, F.; VALTER, S. M.; RICHARD, T. O. et al. Particle size and magnetic properties dependence on growth temperature for rapid mixed co-precipitated magnetite nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 23, n. 14, p. 145601, 2012.
- MELO, T.F.O., et al, Investigation of surface passivation process on magnetic nanoparticles by Raman spectroscopy, **Surface Science**, v.601, n. 18, p. 3921-3925, 2007.
- MILLER, K. L.; CLEGG, D. O. Glucosamine and Chondroitin Sulfate. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 103-118, 2011.
- MINELLI, C.; LOWE, S. B. e STEVENS, M. M. Engineering Nanocomposite Materials for Cancer Therapy. **Small**, v. 6, n. 21, p. 2336-2357, 2010.
- MORAIS, P. C., et al. Raman investigation of uncoated and coated magnetic fluids. **Journal of Physical Chemistry**, v.104, p.2894 - 2896, 2000.
- MORALES, M.P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; MONTERO, M.I.; Serna, C.J.; ROIG, A.; CASAS, L.; MARTINEZ, B.; SANDIUMENGE, F.; **Chem. Mater.** 11, 3058, 1999.
- MYKHALYK, O., DIALEKTI V., TRESILWISED, N. e PITHAYANUKUL, P. Magnetic nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, pg. 275281, 2007.
- NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622-627, 2006.
- ODZIEMKOWSKI, M.; FLIS, J.; IRISH, D. Raman spectral and electrochemical studies of surface-film formation on iron and its alloys with carbon in Na₂CO₃/NaHCO₃ solution with reference to stress-corrosion cracking. **Elec. Acta**, v.39, n.14, p.2225-2236, 1994.
- PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K. et al. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 36, p. 167, 2003.

- PATERNO, L. G. et al. Fabrication and characterization of nanostructured conducting polymer films containing magnetic nanoparticles. **Thin Solid Films**, vol. 517, pg. 1753-1758, 2009.
- PATERNO, L. G., E SOLER, M.A., FONSECA, F.J., SINNECKER, J.P., SINNECKER, E.H., LIMA, E.C., NOVAK, M.A., MORAIS, P.C. Layer-by-Layer Enabled Nanomaterials for Chemical Sensing and Energy Conversion. **JOM**, vol. 65, pg. 709-719, 2013.
- PATERNO, L. G., et al. Tuning of magnetic dipolar interactions of maghemite nanoparticles embedded in polyelectrolyte layer-by-layer films. **J. Nanosci. Nanotech.**, vol. 12, pg. 6672-6678, 2012.
- PATERNO, L. G., et al., Magnetic Nanocomposites fabricated via layer by layer approach. **J. Nanosci. Nanotech.**, vol. 10, pg. 2679-2685, 2010.
- PIERRE, A.C.; Introduction to Sol-Gel Processing; **Kluwer Academic Publishers**: Norwell, 2002.
- RACHAKATLA, R. S.; BALIVADA, S.; SEO, G.-M. 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.
- RAMAN CV, KRISHANN KS A new type of secondary radiation. **Nature** 121:501–502, 1928.
- REYNOLDS, P.J. On custer and clustering. **Elsevier Science**, Amsterdam, 1993.
- ROMDOHR, P. The ore minerals and their intergrowths. **Toronto: Pergamon Press**, p. 906, 1969.
- RUBIM, J. C.; SOUSA, M. H.; SILVA, J. C. O.; TOURINHO, F. A. Raman spectroscopy as a powerful technique in the characterization of Ferrofluids. **Braz. J. Phys.**, v.31, n.3, p.402-408, set., 2001.
- RUBY, C.; GÉHIN, A.; ABDELMOULA, M. et al. Coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) cations in sulphated aqueous medium and formation of hydroxysulphate green rust. **Solid State Sciences**, v. 5, n. 7, p. 1055-1062, 2003.

- RUSSEL, J.B Quimica Geral: Volume 1 **Ed. Makaron Books**, 2 ed., 1929.
- RUSSELL, MAI, e YOSHIMI ANZAI Ultrasmall superparamagnetic iron oxide ehaced MR imaging for lymph node metastases. **Radiography**, 1 ed.: pg. e73-e84, 2007.
- SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, Mar. 2007.
- SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho, **São Paulo:Unesp**, 1995.
- SANTANA, J.F.B, et al. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyldextran and blood cells using Ramam spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.289, p.452-454, 2005.
- SANTOS, C. M. B.; DA SILVA, S. O. W.; GUILHERME, L. R. et al. SERRS Study of Molecular Arrangement of Amphotericin B Adsorbed onto Iron Oxide Nanoparticles Precoated with a Bilayer of Lauric Acid. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 42, p. 20442-20448, 2011.
- SEO, Y.W., CHEON, J.W. J. Nanoscalling laws of magnetic nanoparti- cles and their applicabilities in biomedical sciences. **Acc. Chem. Res.**, v. 41, n. 2, p. 179-189, feb. 2008.
- SETNILAR, I., PACINI, M.A., REVEL, L., Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied in animal models. **Arzneimittel-Fors- chung (Drug Research)**, vol. 41, pg. 542–545, 1991.
- SHE, C.Y., DINH, N.D. and ANTHONY T.TU Laser RAMAN Scattering of glucosamine, N-Acetilglucosamine, and Glucuronic acid **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 372, 345-357, 1974.
- SHEBANOVA, O.N. and P. LAZOR, Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe₂O₄): a new assignment for the vibrational spectrum. **Journal of Solid State Chemistry**. 174(2): p. 424-430, 2003.

- SHI J, GILDER S, BABCOCK K, AWSCHALOM DD Magnetic clusters in molecular beams, metals, and semiconductors. **Science** 271:937–941, 1966.
- SILVA, S. W., MELO, T., SOLER M. A. G., Da Silva, M.F., Lima, E.C.D, MORAIS, P. C. Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: a Raman spectroscopy investigation. **IEEE Transactions on Magnetics** , v.39, p.2645 - 2647, 2003.
- SINCAI, MARIANA, DIANA GANGA, MARIUS GANGA, DIANA ARGHERIE, e DOINA BICA. Antitumor effect of magnetite nanoparticles in cat mammary adenocarcinoma. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, pag. 438 441, 2007.
- SMITH E, DENT G Modern Raman spectroscopy – a practical approach. **Wiley, Chichester**, 2005.
- SOLER, M.A., ALCANTARA, G.B., SOARES, F.Q., VIALI. W.R., SARTORATTO, J.R., SILVA, S.W., GARG, V.K., OLIVEIRA, A.C., MORAIS, P.C. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. **Surface Science**, v.601, n.18, p.3921-3925, 2007.
- SOLER, M.A., LIMA, C.D., ALCANTARA, G.B., MORAIS, P.C. Superparamagnetic Iron Oxides. In: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. (California, USA: **American Scientific Publishers**, vol. 23, pg. 513-532, 2011.
- SOLER, M. A. G.; FANYAO, Q. Raman Spectroscopy of Iron Oxide Nanoparticles. In: **Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization**. Berlin: Springer, p. 379-416, 2012.
- 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.
- 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 A.

- SOLER, M.A.G., et al., Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 272: p. 2357-2358, 2007.
- SOUSA, M.H.; RUBIM, J. C.; SOBRINHO, P. G.; TOURINHO, F.A. Biocompatible magnetic fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified maghemite nanostructures. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.225, n.1-2, p.67-72, 2001.
- THAKRAL, R., DEBNATH, U.K., DENT, C. Role of Glucosamine in osteoarthritis. **Current Orthopaedics**, vol. 21, pg. 386-389, 2007.
- VEERAPADIAN, M., SADHASIVAN, S., et al. Glucosamine Functionalized copper nanoparticles: Preparation, characterization and enhancement of anti-bacterial activity by ultraviolet irradiation **Chemical Engineering Journal**, v.209, 558-567, 2012.
- VEERAPADIAN, M., KYUSIK, Y. Synthesis of Silver Nanocluster and Functionalization with Glucosamine for Glyconanoparticles **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry** vol. 40, 56-64, 2010.
- VERBLE, J. L. Temperature-dependent light-scattering studies of Verwey transition and electronic disorder in magnetite. **Phys. Rev. B**, v.9, n.12, p.5236-5248, 1974.
- VERBLE, J.L. Temperature-dependent light-scattering studies of Verwey transition and electronic disorder in magnetite. **Phys. Rev. B**, v.9, n.12, p.5236-5248, Jun. 1974.
- VIALI, W. R., ALCANTARA, G.B., SARTORATTO, P.C., SOLER, M.A., MOSNIEWICZ-SZABLEWSKA, E., ANDRZEJEWSKI, B., MORAIS, P.C. Investigation of the molecular surface-coating on the stability of insulating magnetic oils. **J. Phys. Chem. C**, vol. 114, pg. 179-188, 2010.
- WANG, H.; CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. et al. Probing the orientation of surface-immobilized immunoglobulin G by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. **Langmuir**, v. 30, p. 1877-1887, 2004.

- WANG, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **The Analyst**, p. 421-426, 2005.
- WHITE, W.B.; DEANGELIS, B. A.. Interpretation of the vibrational spectra of spinels. *Spectrochimica Acta Part A: A Molecular Spectroscopy*, v. 23, n. 4, p. 985- 995, abr. 1967.
- YANG, Z.-C.; LI, X. e WANG, J. Intrinsically fluorescent nitrogen-containing carbon nanoparticles synthesized by a hydrothermal process. **Carbon**, v. 49, n. 15, p. 5207-5212, 2011.
- YOUNG & FREEDMAN Fisica III - Eletromagnetismo **Ed. Pearson**, 2008.
- YOO, D., JAE-HYUN, L., TAE-HYUN, S. e JINWOO, C. Therostic Magnetic Nanoparticles **Acc. Chem. Res.**, vol. 44, pg.863-874, 2011
- YU, T.; SHEN, Z. X.; DING, J. Cation migration and magnetic ordering in spinel CoFe_2O_4 powder: micro-raman scattering study. **Journal of Physics: Condensed Matter** 14, 613-618, 2002.