



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

**TESE DE DOUTORADO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS  
SUPERPARAMAGNETICAS BASEADAS EM ÓXIDOS DE FERRO E  
GLICOSAMINOGLICANOS**

LUIS MIGUEL RAMÍREZ RIVERA

**ORIENTADORA**

MARIA APARECIDA GODOY SOLER

**COORIENTADOR**

LEONARDO GIORDANO PATERNO

**2018**

**LUIS MIGUEL RAMÍREZ RIVERA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS  
SUPERPARAMAGNETICAS BASEADAS EM ÓXIDOS DE FERRO E  
GLICOSAMINOGLICANOS**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**BRASÍLIA, DF  
2018**

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Maria Aparecida Soler, pelo apoio e compreensão durante todo este período em que estivemos trabalhando juntos, principalmente na fase final da elaboração deste trabalho; pela oportunidade de me permitir crescer na área acadêmica e a confiança depositada em mim.

Ao meu coorientador Prof. Leonardo G. Paterno, pelos ensinamentos científicos; pelo espaço cedido no Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais, no Instituto de Química, no início do desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio ao longo destes anos.

À minha família, em especial: à minha esposa, Tathyana, e filho, Theo, pelo amor incondicional, pela paciência e compreensão durante todo este período que se estende desde o mestrado, sempre me apoiando nas decisões ao longo da vida; e aos meus pais, Rafael (*in memoriam*) Irma, e irmão, Rafael, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando, independente das circunstâncias.

À Prof<sup>ª</sup>. Maryene Camargo, pela amizade, pelo acolhimento, pela compreensão e pela paciência, pelas discussões e pela imensa ajuda em todos estes anos que me permitiram amadurecer não só cientificamente, mas também pessoalmente.

À minha querida amiga, Fernanda Sodré, pela amizade imensa, pelo apoio nas diversas áreas da vida, principalmente no emocional, pela preocupação, pelas correções, pelos ensinamentos científicos e da vida e pelas discussões que me permitiram continuar desenvolvendo este trabalho.

Ao meu amigo, Danilo Rippel, pela ajuda nas batalhas internas e por me proporcionar a força e a coragem necessárias para não desistir.

Aos coordenadores e ex-coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Sebastião W. da Silva, João Paulo Longo e Ricardo Bentes, pelo apoio administrativo.

Aos meus amigos do Laboratório de Síntese Inorgânica e Bioinorgânica: Ghabriel, Daniel, Vitor, Rafael, Munique, Diogo, Grazi (*in memoriam*), Augustto e ao Professor Júlio.

Aos meus colegas e ex-colegas do Laboratório de Nanofilmes e Nanodispositivos e do CNANO: Camila, Elton, Rafael, Jaqueline, Manoela, Antônia, Ariane, Aline, Débora, Deyse, Luísa, Luana, Mohan, Ísis e Hermano. Em especial, à Deizilene, pela amizade e pelo apoio emocional e à Larissa, pela ajuda e dedicação no final deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais: Alan, Jéssica, Amanda, Nilton, Michelle, Marcos, Priscila Rios, Priscila Peregrino, e às professoras Maria José Sales e Roseany Lopes. Em especial ao Ítalo, por me permitir fazer parte do desenvolvimento do seu trabalho.

Aos colegas do Departamento de Genética e Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas: Karen, Diogo, Ludmila, Rayane, Victor, Henrique, Débora e Luiza. Em especial à Maria e Jaqueline, pela ajuda na sala de cultivo; à Mayara e Luiza Gouvea, pela ajuda nos ensaios de toxicidade, e ao meu amigo José de Souza Filho (*in memoriam*), pela amizade, pelos ensinamentos, pela convivência e por me permitir evoluir na área acadêmica. Agradeço também aos Prof. César Grisolia e Sacha Braun, pelas discussões e ajuda nos ensaios biológicos.

Ao Prof. Osmino Júnior, pela ajuda na liofilização das amostras e na tentativa de elaboração de um protocolo de quantificação/deteção por cromatografia líquida de alta eficiência.

À CAPES e as instituições de fomento que permitiram o desenvolvimento deste trabalho por meio do apoio financeiro.

## RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois complexos superparamagnéticos nanoestruturados formados por nanopartículas de óxido de ferro (ION) e os glicosaminoglicanos sulfato de condroitina (ChS) ou glucosamina (GLU), visando o desenvolvimento de plataformas de carregamento desses glicosaminoglicanos para uma maior eficácia no tratamento da osteoartrite. A estrutura e a morfologia dos complexos foram elucidadas por difratometria de raios-X (DRX), espectroscopias no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), Raman e fotoeletrônica de raios-X (XPS), espalhamento dinâmico de luz (EDL), mobilidade eletroforética, microscopia eletrônica de transmissão (MET), medidas de magnetização e análise termogravimétrica (TG). A citotoxicidade dos complexos foi avaliada por ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT em células de polpa dentária humana. Os complexos de ION-ChS foram preparados por co-precipitação alcalina de íons Fe(II)/Fe(III), 1:2, na presença de ChS. Estes se apresentaram como nanopartículas aproximadamente esféricas, com diâmetro médio de ~ 8 nm (com diâmetro hidrodinâmico 105,7 nm) e caráter superparamagnético (com magnetização de saturação de 53 emu/g à temperatura ambiente). A espectroscopia Raman evidenciou a predominância da fase de magnetita nas nanopartículas, enquanto que a espectroscopia no infravermelho permitiu observar a coordenação dos grupos carboxilato da ChS aos íons Fe(II) da superfície das ION. Esta coordenação conferiu às nanopartículas alta estabilidade em meio biológico (DMEM). Para esse complexo, o estudo de citotoxicidade mostrou que, até a maior concentração estudada (0,250 g L<sup>-1</sup> de ChS), os complexos são biocompatíveis com células de polpa dentária humana. Os complexos ION-GLU foram obtidos por sequência de funcionalizações sobre nanopartículas de magnetita (~ 6 nm) preparadas previamente por co-precipitação. As nanopartículas de magnetita foram primeiramente funcionalizadas com grupos citrato, que em seguida serviram de sítio de ancoragem covalente da GLU, por meio da formação de uma ligação amida. Os dados de espectroscopias FT-IR, Raman e XPS confirmaram a identidade dos grupos funcionais introduzidos em cada passo de funcionalização. O fluido magnético produzido também apresentou alta estabilidade inclusive em meio biológico. Ainda, os dados de magnetização confirmaram o superparamagnetismo à temperatura ambiente. A biocompatibilidade foi atestada pelo ensaio de MTT, em que se observou não somente um aumento da viabilidade celular em células de polpa dentária humana, mas também uma modulação da viabilidade quando comparada à glucosamina livre. Esta modulação estaria relacionada com a necessidade da quebra da ligação amida para liberação da GLU e sua posterior utilização pela célula. Diante dos resultados obtidos, observa-se que os complexos nanoestruturados aqui sintetizados possuem propriedades e características desejáveis para aplicações biológicas, tornando-os plataformas promissoras de entrega de sulfato de condroitina ou glucosamina.

**Palavras-chave:** sulfato de condroitina, glucosamina, osteoartrite, complexos nanoestruturados.

## ABSTRACT

Herein, two nanoparticulated systems were developed, each containing iron oxide nanoparticles (ION) and glycosaminoglycans (chondroitin sulfate, ChS, or glucosamine, GLU), aiming the development of a carrier platform for delivery of those glycosaminoglycans to enhance osteoarthritis treatment. Their structure and morphology were studied by X-ray diffraction (XRD), Raman and infrared (FT-IR) spectroscopies, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) dynamic light scattering (DLS), electrophoretic mobility and transmission electronic microscopy (TEM), magnetic measurements and thermogravimetric analysis (TG). Moreover, their biocompatibility against human dental pulp cells was also studied via MTT assay. Chondroitin sulfate functionalized iron oxide nanoparticles (ION-ChS) were synthesized via the alkaline coprecipitation method of Fe(II)/Fe(III) 1:2 ions in the presence of ChS. They presented spherical-like morphology with a mean diameter of ~ 8 nm (hydrodynamic diameter of 105.7 nm) and superparamagnetic behavior (magnetic saturation of 53 emu/g at room temperature). Raman spectroscopy indicated predominant magnetite iron oxide phase of the synthesized nanoparticles. Moreover, infrared spectroscopy showed a coordination between the carboxylate groups of the ChS with the Fe(II) ion of the magnetite nanoparticles' surface. This coordination provided high stability in biological media (DMEM). Cell viability tests showed that, at the highest studied concentration (0.250 g L<sup>-1</sup> of ChS), this complex is biocompatible against human dental pulp cells. In the other hand, iron oxide nanoparticles functionalized with glucosamine were synthesized in a multi-step route after coprecipitation of magnetite nanoparticles (mean diameter ~ 6 nm). First, iron oxide nanoparticles were functionalized with citrate groups who acted as anchor points to conjugate glucosamine via an amide linkage. Raman, FT-IR and XPS spectroscopies confirmed the addition of functional groups in each step of the functionalization process. Moreover, the magnetic fluid was highly stable even in biological media (DMEM). On the other hand, the magnetization data confirmed the superparamagnetism at room temperature. The biocompatibility of this complex was assessed by MTT assay, in which not only an increase in the cell viability in human dental pulp cells was observed, but also a modulation of it when comparing to free glucosamine. This modulation may be related to the fact that the amide bond must be broken before the cell can use the glucosamine. Based on these results, the nanostructured complexes here synthesized have desirable characteristics and properties for biological applications, thus being promising platforms for the delivery of chondroitin sulfate and glucosamine.

**Keywords:** chondroitin sulfate, glucosamine, osteoarthritis, nanocomplexes.

## LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1 – Estrutura do 4-sulfato de condroitina. O GluA é unido ao GalNac, sulfonado no carbono 4, por uma ligação glicosídica <math>\beta(1 \rightarrow 3)</math>. O GalNac, por sua vez, une-se ao próximo mero pelo GluA por uma ligação glicosídica <math>\beta(1 \rightarrow 4)</math> (não mostrada na imagem).....</p>	16
<p>Figura 2 – Estrutura da D-glucosamina. Observa-se a amina primária no carbono 2 que substitui o grupo hidroxila de uma D-glucose. ....</p>	17
<p>Figura 3 – Esquema de variação do campo coercivo <math>H_c</math> em relação ao diâmetro de partículas. ....</p>	21
<p>Figura 4 – Representação da estrutura espinélio cúbica. As esferas azuis representam a posição dos íons de oxigênio, enquanto que as esferas A e B representam os cátions de ferro que ocupam os sítios tetraédrico (roxo) e octaédrico (vermelho), respectivamente. ....</p>	22
<p>Figura 5 – Ilustração dos sítios octaédricos (vermelho) e tetraédrico (roxo) para a <math>Fe_3O_4</math>. As esferas azuis representam os íons de oxigênio.....</p>	24
<p>Figura 6 – Representação de duas nanopartículas com momentos magnético <math>m</math> alinhados, distância entre superfícies <math>s</math> e distância entre os centros <math>r</math>, com espessura de camada protetora <math>\delta</math>. ....</p>	28
<p>Figura 7 – Ilustração de um fluido magnético formado por nanopartículas dispersas em meio ácido, onde as setas representam os momentos magnéticos. ....</p>	29
<p>Figura 8 – Esquema de estabilidade de um FMI em função do pH. Em pH alcalino (<math>pH &gt; 10</math>), as nanopartículas adquirem carga superficial <math>\Sigma &lt; 0</math>, enquanto que em pH ácido (<math>pH &lt; 6</math>) a carga superficial é <math>\Sigma &gt; 0</math>, proporcionando forças repulsivas suficientes para o processo de peptização. Em pH em torno do ponto isoelétrico (<math>pH \cong 7,5</math>), <math>\Sigma \cong 0</math> e as nanopartículas floculam. Adaptado de Bacri et al., 1990.<sup>[51]</sup> .....</p>	30
<p>Figura 9 – Mecanismos de espalhamento de um fóton. ....</p>	35
<p>Figura 10 – Espectro Raman de magnetita. As bandas anti-Stokes (<math>\nu &lt; 0</math>) e Stokes (<math>\nu &gt; 0</math>) possuem arranjo simétrico com o centro em <math>\nu = 0 \text{ cm}^{-1}</math>. Adaptado de Shebanova e Lazor, 2003<sup>[65]</sup>.....</p>	35
<p>Figura 11 –Vibrações fundamentais. Os símbolos + e – representam deslocamentos para cima e para baixo do plano, respectivamente.....</p>	37
<p>Figura 12 – Esquema da coordenação do carboxilato com íons metálicos. No exemplo, o íon metálico é representado pelo ferro. ....</p>	39
<p>Figura 13 – Esquema representando a interação de uma partícula carregada negativamente em um meio líquido.....</p>	43

Figura 14 – Mecanismo de reação do MTT com NADH produzindo formazan. <sup>[93]</sup> .....	46
Figura 15 – Espectro infravermelho do 4-sulfato de condroitina obtido na região de 2000 a 600 cm <sup>-1</sup> com as principais bandas vibracionais indicadas. ....	93
Figura 16 – Viscosidade específica e viscosidade reduzida em função da concentração. ....	96
Figura 17 – Espectro Raman da glucosamina obtido na região de 550 a 1550 cm <sup>-1</sup> .....	97
Figura 18 – Espectro infravermelho da glucosamina obtido na região de 4000 a 2750 cm <sup>-1</sup> e de 1750 a 450 cm <sup>-1</sup> . Em destaque, as bandas dos estiramentos e dobramentos da amina primária da glucosamina. ....	98



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modos Raman atribuídos à magnetita <i>bulk</i> <sup>[65]</sup> .....	38
Tabela 2 – Principais bandas de absorção no infravermelho utilizadas neste trabalho, em ordem crescente pela posição <sup>[60; 87]</sup> .....	39
Tabela 3 – Bandas vibracionais e respectivas atribuições observadas no sulfato de condroitina.....	94
Tabela 4 – Dados viscosimétricos das soluções de 4-sulfato de condroitina. ....	95

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CFC</b>	Cúbica de face centrada
<b>ChS</b>	Sulfato de condroitina
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoxido
<b>DTG</b>	Termogravimétrica diferencial
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<b>EDL</b>	Espalhamento dinâmico de luz
<b>FM</b>	Fluído magnético
<b>FMI</b>	Fluído magnético iônico
<b>FMS</b>	Fluído magnético surfactado
<b>FT-IR</b>	Infravermelho por transformada de Fourier
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>GalNac</b>	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina
<b>GluA</b>	D-Ácido glucorônico
<b>ION</b>	Nanopartículas de óxido de ferro
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MET</b>	Microscópio eletrônico de transmissão
<b>MTT</b>	3 (4,5(dimetiltiazol 2 il) 2,5 difenil tetrazólio
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hidroxissuccinimida
<b>NPM</b>	Nanopartícula magnética
<b>OA</b>	Osteoartrite
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PEI</b>	Poli(etilenoimina)
<b>PEO</b>	Poli(etilenoglicol)
<b>PGA</b>	Ácido poli(glutâmico)
<b>TG</b>	Termogravimetria
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	Ferrita de cobalto
<b>δ</b>	Dobramento
<b>δ<sub>a</sub></b>	Dobramento assimétrico
<b>δ<sub>s</sub></b>	Dobramento simétrico
<b>D<sub>H</sub></b>	Diâmetro hidrodinâmico
<b>D<sub>MET</sub></b>	Diâmetro obtido por microscopia eletrônica de transmissão
<b>η</b>	Viscosidade
<b>ε</b>	Constante dielétrica
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Íon ferroso
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Íon férrico
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	Magnetita
<b>H<sub>C</sub></b>	Campo coercivo
<b>K<sub>B</sub></b>	Constante de Boltzmann
<b>M<sub>R</sub></b>	Magnetização remanente
<b>M<sub>S</sub></b>	Magnetização de saturação
<b>γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Maguemita
<b>r<sub>H</sub></b>	Raio hidrodinâmico
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tempo
<b>v</b>	Estiramento
<b>v<sub>a</sub></b>	Estiramento assimétrico
<b>v<sub>s</sub></b>	Estiramento simétrico
<b>ν̄</b>	Frequência de vibração

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
<b>3 REVISÃO BILIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
3.1 Glicosaminoglicanos e Glucosamina .....	15
3.2 Nanopartículas de Óxido de Ferro.....	20
3.2.1 Superparamagnetismo.....	20
3.2.2 Estrutura cristalina.....	22
3.2.3 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro.....	24
3.2.4 Estabilidade de fluidos magnéticos.....	26
3.3 Técnicas de caracterização de nanopartículas.....	32
3.3.1 Espectroscopia Raman e no infravermelho .....	32
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	40
3.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) e mobilidade eletroforética .....	41
3.3.4 Análise Termogravimétrica.....	44
3.3.5 Ensaio de MTT .....	45
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
4.1 Nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com sulfato de condroitina .....	47
4.2 Nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com glucosamina .....	67
4.3 Caracterização dos materiais.....	93
4.3.1 Caracterização do sulfato de condroitina.....	93
4.3.2 Caracterização da glucosamina.....	97
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>99</b>
5.1 Perspectivas .....	100
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE 1 – ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO.....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas magnéticas podem ser empregadas como plataformas para a produção de complexos nanoestruturados visando aplicações em nanomedicina, devido às suas propriedades químicas e físicas.<sup>[1-3]</sup> Em particular, as nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro têm sido muito investigadas devido às suas características, como o superparamagnetismo, a sua estabilidade química, sua biocompatibilidade e a possibilidade de produção em larga escala, com controle razoável de tamanho e morfologia, com baixo custo utilizando processos químicos.<sup>[1; 4]</sup> Além disso, a superfície das nanopartículas pode ser modificada durante o processo de síntese pela funcionalização com diferentes moléculas, como polímeros, surfactantes, lipídios, ou pela introdução de grupos funcionais aniônicos ou catiônicos. A funcionalização da superfície deve promover estabilidade em ambiente fisiológico. Portanto, a funcionalização da superfície das nanopartículas de óxidos de ferro, utilizando moléculas previamente selecionadas, é um ponto chave no processo de síntese de complexos nanoestruturados para aplicações biomédicas.

A funcionalização com biomoléculas e biopolímeros assegura uma plataforma adequada para uso *in vivo*. Entre os biopolímeros de interesse, o sulfato de condroitina é um glicosaminoglicano sulfatado de extrema importância para a manutenção da matriz extracelular em tecidos humanos, como na cartilagem. Juntamente com outros glicosaminoglicanos, possui papel importante na interação e adesão celular, assim como na manutenção da matriz extracelular, contribuindo para a rigidez, a resiliência e a retenção intersticial de água.<sup>[5]</sup>

A atividade biológica de ambos compostos tem sido bastante estudada na terapia da osteoartrite, que é uma doença degenerativa de cartilagem articular. Observa-se, porém, uma dificuldade na biodistribuição desses devido à baixa irrigação sanguínea da cartilagem articular. Apesar do crescente interesse no desenvolvimento de nanopartículas de óxido de ferro como veiculadoras de fármacos, estudos envolvendo a funcionalização dessas com o sulfato de condroitina ou com a glucosamina têm sido pouco investigados. Ainda, a finalidade principal dos poucos estudos encontrados na literatura não é o estudo do efeito biológico, da estabilidade coloidal, do modo de interação entre as nanopartículas e os fármacos e nem da possível aplicação para o tratamento da osteoartrite.<sup>[6-9]</sup>

Dessa forma, considerando-se o potencial das nanopartículas de óxido de ferro como veículos de fármacos; o grande impacto dos glicosaminoglicanos no tratamento da osteoartrite;

e a dificuldade da biodisponibilidade desses fármacos aplicados por via oral, este projeto desenvolveu a síntese de complexos nanoestruturados magnéticos com base em nanopartículas de óxido de ferro como veículos carreadores de sulfato de condroitina e glucosamina, visando o desenvolvimento de dois novos complexos terapêuticos para o tratamento mais eficiente da osteoartrite. Após a obtenção das dispersões coloidais, foram investigadas as suas características físico-químicas e sua biocompatibilidade com células de polpa dentária humana.

Um sistema nanoestruturado magnético carreador de sulfato de condroitina ou glucosamina pode ser utilizado para o tratamento da osteoartrite por meio de aplicação intra-articular. Por haver deficiência de vasos sanguíneos na cartilagem, a aplicação intra-articular é uma vantagem para a biodistribuição quando comparada à administração via oral. Ainda, uma vez que as nanopartículas são magnéticas, é possível aumentar a biodisponibilidade na cartilagem por meio da aplicação de um campo magnético, o que facilita o carregamento do sulfato de condroitina e glucosamina às lacunas onde encontram-se os condrócitos, proporcionando assim uma maior concentração dos fármacos nos sítios de ação.

Esta tese encontra-se organizada da seguinte forma: no Capítulo 2, são apresentados os objetivos deste trabalho. No Capítulo 3, os materiais utilizados são discutidos, assim como a suas características e propriedades e as técnicas de caracterização de sistemas nanoestruturados. No Capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos. Por último, no Capítulo 5 encontram-se a conclusão e as perspectivas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é sintetizar e caracterizar complexos nanoestruturados superparamagnéticos compostos por nanopartículas de óxido de ferro (ION) funcionalizadas com glicosaminoglicanos (4-sulfato de condroitina, ChS e glucosamina, GLU), na forma de dispersões coloidais biocompatíveis e estáveis em meios biológicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Para alcançar o objetivo mencionado, várias abordagens foram desenvolvidas, tais como: i) sintetizar as ION, ii) caracterizar as suas propriedades físicas; iii) promover a funcionalização das ION com ChS e GLU; iv) estudar a funcionalização das ION por métodos espectroscópicos; v) caracterizar as propriedades físico-químicas das dispersões coloidais; vi) avaliar a citotoxicidade dos complexos produzidos.

### 3 REVISÃO BILIOGRÁFICA

#### 3.1 Glicosaminoglicanos e Glucosamina

Os glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados fazem parte do grupo de polissacarídeos lineares presentes na matriz extracelular (MEC) dos tecidos humanos<sup>[5]</sup> e, com os GAGs não-sulfatados, conferem as principais propriedades físico-químicas aos diferentes tipos de MEC dos tecidos, contribuindo principalmente para a rigidez e resiliência, mantendo a capacidade de retenção intersticial de água.<sup>[10]</sup> Os GAGs se unem a cadeias proteicas, formando macromoléculas biológicas – chamadas de proteoglicanas – constituintes das matrizes extracelulares dos tecidos conjuntivos dos seres humanos. Assim, os GAGs 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.<sup>[5]</sup> Possuem uma grande variedade de uso em aplicações farmacológicas e cosméticas; por exemplo, o ácido hialurônico é utilizado na recuperação de cartilagens<sup>[11]</sup> e como modulador da cicatrização,<sup>[12]</sup> a heparina é utilizada como agente anticoagulante, e o sulfato de condroitina (ChS, do inglês, *chondroitin sulfate*), por possuir propriedades hidrofílicas que permitem à cartilagem absorver grandes quantidades de água e absorver forças compressivas, pode ser utilizado como pele artificial.<sup>[13]</sup>

<sup>[14]</sup> O ChS é um componente importante da matriz extracelular da cartilagem e é conhecido pela sua ação anti-inflamatória e pela produção de sindecanos, receptor celular que interage com proteínas de adesão, células e com a matriz extracelular.<sup>[14; 15]</sup> O ChS é um copolímero alternado cujo mero é um dissacarídeo composto por beta-D-ácido glucorônico (GluA) e *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc).<sup>[16]</sup> O GluA é unido ao GalNAc por uma ligação glicosídica  $\beta(1 \rightarrow 3)$  enquanto que o GalNAc une-se ao GluA por uma ligação glicosídica  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (Figura 1). O GalNAc pode ser sulfonado no carbono 4 ou 6, podendo ocorrer simultaneamente, enquanto que o GluA pode ser sulfonado no carbono 2. Existem, portanto, 6 variações do sulfato de condroitina. De maior importância, tem-se o 4-sulfato de condroitina (ou sulfato de condroitina A) e 6-sulfato de condroitina (ou sulfato de condroitina C). Quando o ácido sulfônico ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) encontra-se no carbono 4, este encontra-se na posição axial, enquanto que quando no carbono 6 sua posição é equatorial.



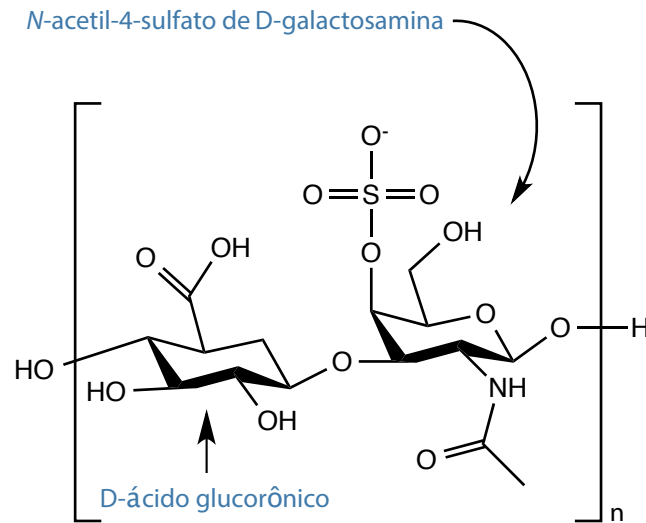


Figura 1 – Estrutura do 4-sulfato de condroitina. O GluA é unido ao GalNAc, sulfonado no carbono 4, por uma ligação glicosídica  $\beta(1 \rightarrow 3)$ . O GalNAc, por sua vez, une-se ao próximo mero pelo GluA por uma ligação glicosídica  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (não mostrada na imagem).

Independentemente da posição do grupo  $-\text{SO}_3\text{H}$ , a sua constante de acidez ( $\text{pK}_a$ ) é 2,60, portanto, quando o pH é maior que 2,60 o grupo encontra-se desprotonado.<sup>[17]</sup> Já o ácido carboxílico, presente no carbono 5 do GluA, possui um  $\text{pK}_a$  de 4,57. A desprotonação desses grupos leva à formação do grupo sulfonato ( $-\text{SO}_3^-$ ) e carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ), respectivamente:



Esses grupos aniônicos são de grande importância para a interação do polímero com as nanopartículas, adequadas não somente para a estabilidade coloidal das suspensões, mas também para o encapsulamento das nanopartículas

Outra molécula de grande interesse é a glucosamina (GLU), molécula precursora da síntese das glicoproteínas. Observa-se na estrutura da glucosamina (2-amino-2-deoxi-alfa-D-glucose), apresentada na Figura 2, que ela é uma glucose modificada: a hidroxila do carbono 2 é substituída por uma amina primária ( $-\text{NH}_2$ ), possuindo uma massa molar de 179,17 g/mol.

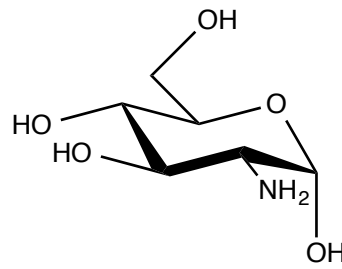


Figura 2 – Estrutura da D-glucosamina. Observa-se a amina primária no carbono 2 que substitui o grupo hidroxila de uma D-glucose.

Ela é importante para a formação de ácido hialurônico e de ChS, os quais, juntamente com as fibras colágenas, são os principais componentes da matriz extracelular cartilaginosa e do líquido sinovial.<sup>[18-20]</sup> 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 MAP quinase p38, envolvidas na ativação das células do líquido sinovial, resultando na produção de mediadores inflamatórios.

Devido às propriedades farmacêuticas de ambas as moléculas (ChS e GLU), estas ganharam popularidade nos anos recentes como agentes terapêuticos para a osteoartrite (OA).<sup>[14]</sup>

A OA é uma doença articular crônica, progressiva e degenerativa, que é particularmente comum nas articulações que suportam peso, sendo considerada um problema de saúde pública.<sup>[14; 21]</sup> Em resposta à demanda por terapias para a OA, vários fármacos têm sido pesquisados, como o ChS e a GLU.<sup>[22]</sup> O ChS é o principal componente da MEC dos tecidos conectivos, e, quando presente nas cartilagens articulares em grandes concentrações, proporciona um aumento da pressão osmótica que expande a matriz e leva ao tensionamento da rede de colágeno, proporcionando uma resistência à compressão.<sup>[23-25]</sup> Possui ação anti-inflamatória ao se ligar ao TNF- $\alpha$ <sup>[26]</sup> ou ao inibir a expressão de moléculas pró-inflamatórias.<sup>[27]</sup> Em adição, quando empregado no tratamento da OA, o ChS aumenta nos condrócitos a expressão de genes que promovem a condrogênese e diminui a expressão daqueles que degradam a MEC da cartilagem.<sup>[28]</sup> A GLU, por sua vez, estimula a síntese de proteoglicanas por condrócitos, inibe a ação de enzimas catabólicas, reduz os níveis de IL-1 $\beta$  no líquido sinovial e exibe ação anti-inflamatória suprimindo a quimiotaxia, a fagocitose e a produção de superóxidos.<sup>[29]</sup> Um estudo recente demonstrou, *in vivo*, a eficácia de uma dose de ChS intra-articular no tratamento da OA em equinos.<sup>[30]</sup>

A cartilagem articular tem como função absorver 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 medicamentos: o tratamento da OA com o ChS e GLU, em conjunto ou não, são, em geral, administrados por via oral, apresentando dificuldade de biodistribuição dos fármacos devido à ausência ou baixa irrigação sanguínea do tecido alvo (cartilagens).<sup>[5; 31]</sup> Estudos têm demonstrado que complexos contendo GLU administrados por meio intravenoso tiveram 10% da GLU 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 nos ossos.<sup>[32]</sup>

A cartilagem articular é composta por quatro zonas principais, 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.<sup>[5]</sup>

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 carboxilato e sulfonato dados GAGs. 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 dos glicosaminoglicanos.<sup>[5]</sup>

No processo patogênico da cartilagem na OA, sinais metabólicos e de degeneração resultam na estimulação da cascata de citocinas inflamatórias.<sup>[33]</sup> Os condrócitos também influenciam e levam a um aumento dos níveis de produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , 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 pela perda das macromoléculas da matriz, sem que haja dano mecânico aos condrócitos ou à rede de fibras colágenas; ou pela disruptura 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.<sup>[5]</sup>

Encontra-se poucos trabalhos na literatura sobre nanoestruturas relacionadas com o ChS e a GLU,<sup>[6; 7; 34]</sup> sendo que a maioria dos estudos encontrados propõe a produção de géis ou nanocápsulas. Os poucos trabalhos existentes associando NPMs à esses GAGs não estudaram a sua toxicidade, nem a sua influência na proliferação e expressão celular.<sup>[6; 7; 9]</sup>

No caso da GLU, em um estudo foram sintetizados nanopartículas de prata funcionalizadas com a GLU por meio de reticulação.<sup>[35]</sup> Após a síntese, as nanopartículas foram recobertas com ácido 11-mercaptoundecanoico para introduzir o terminal carboxílico na superfície das mesmas. Em seguida, esse grupo foi ligado à amina primária da GLU por meio da reação de reticulação com *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

Para o ChS, encontram-se mais trabalhos, tais como a síntese de NPMs em solução de ChS e a produção de nanoestruturas de vários formatos de ouro ou prata.<sup>[6; 7; 34]</sup> Por exemplo,

Wilson e colaboradores produziram nanobastões de ouro nos quais cadeias de ChS foram acopladas por meio do processo de automontagem via atração eletrostática.<sup>[34]</sup> Mais especificamente, um estudo envolvendo ION foi desenvolvido por Aoyagi e colaboradores, que prepararam um coloide composto por nanopartículas de magnetita funcionalizadas com ChS.<sup>[6]</sup> Para obter o coloide, a síntese foi realizada na presença do ChS. Recentemente, Guilherme e colaboradores desenvolveram um hidrogel com nanoesferas de magnetita contendo ChS com a ajuda de um carreador (metacrilato de glicídio).<sup>[7]</sup> Em outro trabalho relevante, nanopartículas lipídicas contendo ChS e diacereína, fármaco utilizado também no tratamento de OA, foi inoculado via intravenosa em ratos Charles foster com OA induzida e foi observado um melhoramento histopatológico, assim como da biodisponibilidade da reína, metabólito da diacereína.<sup>[36]</sup> Em outro trabalho, ChS foi adicionada à um FM de nanopartículas de magnetita e foi realizado um estudo de estabilidade em função da salinidade, entretanto, o fluido produzido somente foi estável em até 24 horas e não foram realizados estudos de citotoxicidade e biocompatibilidade.<sup>[8]</sup>

Assim, observa-se a falta de estudos que contemplem a produção de nanopartículas veiculadoras de ChS e GLU, principalmente para o melhoramento da terapia da osteoartrite. Dessa forma, no intuito de complementar essa área, a proposta deste trabalho é a produção de complexos nanoestruturados formados por nanopartículas magnéticas de óxido de ferro funcionalizadas com ChS e GLU.

## 3.2 Nanopartículas de Óxido de Ferro

### 3.2.1 Superparamagnetismo

Descoberto por Elmore em 1938 por meio do estudo de uma suspensão coloidal de partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ <sup>[37]</sup>, o superparamagnetismo é um fenômeno que ocorre apenas em baixa dimensionalidade. Este fenômeno é similar ao paramagnetismo, no sentido em que o material apresenta magnetização nula na ausência de um campo externo, entretanto, a sua magnetização de saturação é muito maior, em torno de  $10^2$  a  $10^4$  vezes o momento magnético do elétron<sup>[38]</sup>.

Considerando-se partículas esféricas, a coercividade ( $H_C$ ) do material depende do seu tamanho. Quando o diâmetro da partícula se reduz, a coercividade aumenta, atingindo um máximo no limite da passagem de multidomínio para monodomínio. Na região de multidomínios, a magnetização varia de acordo com o movimento das paredes de domínio. No

limite de multidomínios para monodomínios, representado pelo diâmetro crítico  $D_C$ , a coercividade atinge um máximo, seguido de uma tendência à zero ao atingir o limite do superparamagnetismo (SP)<sup>[39]</sup>, conforme a Figura 3. O diâmetro crítico ( $D_C$ ) é dado pela expressão<sup>[40]</sup>:

$$D_C = \frac{2A^{1/2}}{M} \quad (3)$$

onde  $A$  é a constante de troca e  $M$  é o momento magnético do material por unidade de volume. Este diâmetro encontra-se normalmente na faixa entre 10 e 20 nm<sup>[41]</sup>.

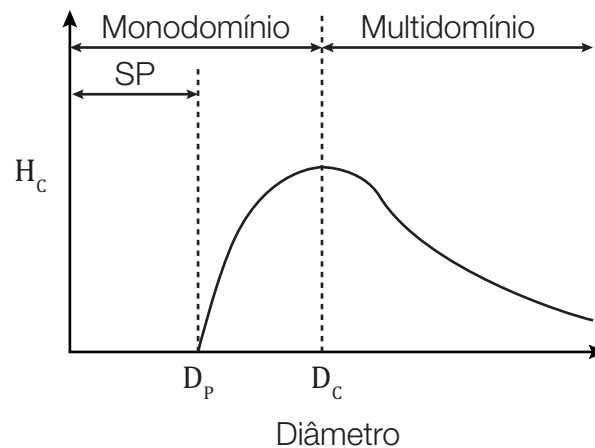


Figura 3 – Esquema de variação do campo coercivo  $H_c$  em relação ao diâmetro de partículas.

No regime superparamagnético, uma vez que não existem paredes de domínios para se moverem, a reversão da magnetização ocorre devido à rotação do momento magnético. Essa rotação espontânea é possível graças à energia térmica presente nos materiais, que induz flutuações nos momentos magnéticos com um determinado tempo de relaxação ( $\tau_N$ ) definido por Néel<sup>[42]</sup>, que representa o tempo que o momento magnético leva para se reorientar e é dado por:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_{ef}V}{k_B T}} \quad (4)$$

em que  $\tau_0$  assume valores entre  $10^{-11}$  a  $10^{-9}$  segundos,  $K_{ef}V$  é a energia da barreira magnetocristalina e  $k_B T$  é a energia térmica. Quando a energia térmica excede a energia da barreira, a energia térmica é suficiente para induzir a flutuação no momento magnético.

Nos materiais superparamagnéticos, como a condição de flutuação dos spins depende da energia térmica, existe uma temperatura crítica, chamada de temperatura de bloqueio ( $T_B$ ) que define o ponto no qual, acima dessa temperatura, ocorre a flutuação espontânea dos spins e o material apresenta uma curva de magnetização sem histerese. Abaixo da temperatura de bloqueio, porém, o material apresenta magnetização remanescente ( $M_R$ ), uma vez que a energia térmica não é mais suficiente para superar a energia da barreira magnetocristalina.

### 3.2.2 Estrutura cristalina

As ferritas cúbicas superparamagnéticas, como maguemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), apresentam estrutura do tipo espinélio e formam monodomínios com diâmetros que variam entre 5 e 20 nm.<sup>[1]</sup> Na estrutura de espinélio cúbica, os íons de oxigênio ocupam posições que correspondem a uma estrutura cúbica de fase centrada (CFC) e os cátions bivalentes e trivalentes distribuem-se entre os átomos de oxigênio e formam os sítios tetraédricos (sítio A) e os octaédricos (sítio B), conforme a ilustração da Figura 4. A célula unitária da estrutura espinélio possui aresta de aproximadamente 8 Å e contém 32 íons de oxigênio, gerando 64 interstícios de simetria tetraédrica e 32 de simetria octaédrica. Entretanto, apenas 8 sítios tetraédricos e 16 sítios octaédricos são ocupados pelos cátions.<sup>[1]</sup>

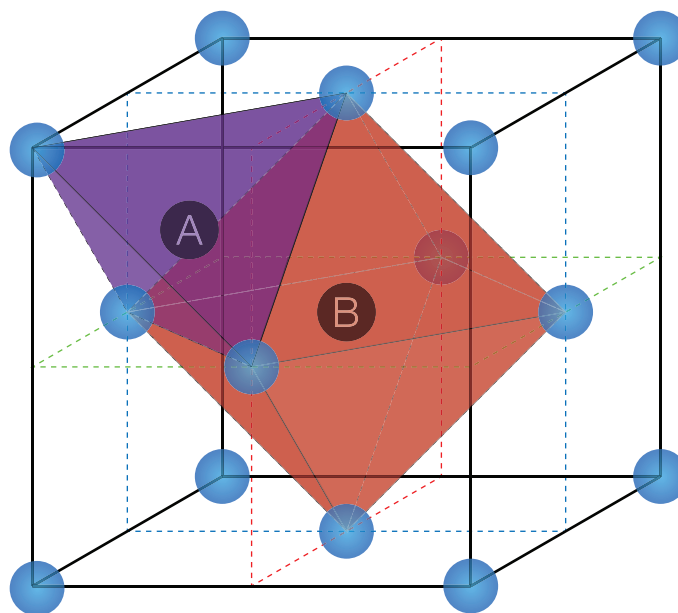


Figura 4 – Representação da estrutura espinélio cúbica. As esferas azuis representam a posição dos íons de oxigênio, enquanto que as esferas A e B representam os cátions de ferro que ocupam os sítios tetraédrico (roxo) e octaédrico (vermelho), respectivamente.

As ferritas cúbicas apresentam estruturas cristalinas e composições variadas, podendo ser representadas por:<sup>[43]</sup>



em que o primeiro termo, entre parênteses, representa o sítio A (tetraédrico) e o segundo, entre colchetes, o sítio B (octaédrico); M um cátion metálico de valência 2+ e  $\delta$  indica o grau de inversão, onde  $\delta = 1$  para estrutura normal,  $\delta = 0$  para espinélio inversa e  $0 < \delta < 1$  para estrutura mista. Quando  $M = Fe$ , tem-se um óxido puro.<sup>[43]</sup>

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

Na magnetita, os átomos de oxigênio formam uma rede cúbica de face centrada com os átomos de ferro ocupando os sítios intersticiais<sup>[44]</sup>. Os sítios tetraédricos são ocupados por íons  $Fe^{3+}$  e os sítios octaédricos são ocupados por um  $Fe^{3+}$  e um  $Fe^{2+}$ , conforme a ilustração apresentada na Figura 5. Os momentos magnéticos de spin dos íons de  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  dos sítios octaédricos se alinham antiparalelamente ao momento magnético de spin do íon de  $Fe^{3+}$  do sítio tetraédrico, o que leva a um cancelamento dos momentos magnéticos dos íons  $Fe^{3+}$ .



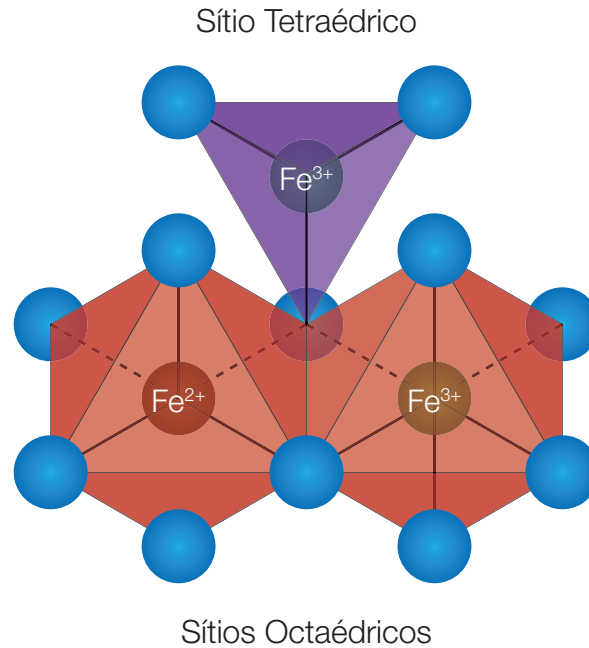


Figura 5 – Ilustração dos sítios octaédricos (vermelho) e tetraédrico (roxo) para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. As esferas azuis representam os íons de oxigênio.

Apesar de a maguemita apresentar também estrutura cristalina do tipo espinélio inversa igual à magnetita, esta possui apenas Fe<sup>3+</sup> como cátion. A maguemita é obtida por meio de um processo de oxidação da magnetita. Essa oxidação pode ocorrer de forma natural devido à exposição ao ambiente, ou pode ser acelerada devido a tratamentos térmicos. Nas nanopartículas de magnetita, o processo natural de oxidação é mais acelerado devido à grande área superficial.<sup>[1]</sup>

### 3.2.3 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro

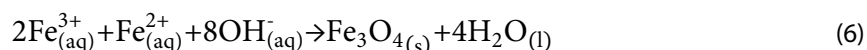
Vários métodos são utilizados para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro, podendo ser físicos ou químicos. Por exemplo, pode-se chegar a nanopartículas partindo de micropartículas que são submetidas a um processo de moagem na presença de um surfactante, obtendo-se um fluido magnético (FM) estável. Entre os métodos mais empregados pode-se citar o sonoquímico, sol-gel, microemulsão, coprecipitação e decomposição térmica de precursores organometálicos ou de compostos de coordenação.

As diversas aplicações exigem materiais nanoparticulados com características específicas tais como tamanho, morfologia, distribuição de tamanho uniforme, estabilidade em

meios aquosos ou orgânicos, entre outras. Essas características são controladas durante a síntese das nanopartículas e do FM.

Quando as nanopartículas de óxidos de ferro são sintetizadas por meio do método de coprecipitação, pode-se obter um controle razoável da morfologia, tamanho, distribuição, composição, cristalinidade e propriedades físicas<sup>[45]</sup>. Em adição, é possível fabricar grandes quantidades por meio desta técnica, a custo relativamente baixo. O método foi introduzido em 1973 por Khalafalla e Reimers e consiste na mistura de sais inorgânicos em ambiente aquoso seguido de precipitação através de reação de hidrólise alcalina<sup>[46]</sup>. Em 1981, Massart obteve nanopartículas de magnetita dispersas em solventes polares sem a necessidade de surfactantes<sup>[47]</sup>.

Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> podem ser obtidas pela reação de coprecipitação de íons Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> em meio alcalino, conforme a equação química<sup>[1]</sup>:



A precipitação total de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> deve ocorrer em um pH entre 9 e 14, mantendo-se a proporção de Fe<sup>3+</sup> : Fe<sup>2+</sup> em 2:1.

Durante a síntese, normalmente a base é adicionada à solução de íons metálicos sob agitação. O diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas depende de parâmetros da síntese tais como velocidade de agitação, concentração da base e temperatura da reação. Em adição, o tipo de sais utilizados, a razão molar de Fe<sup>3+</sup> : Fe<sup>2+</sup>, o pH do meio, a concentração dos íons, a presença de surfactantes e a composição da atmosfera também influenciam no tamanho, forma e composição das nanopartículas.

O processo de coprecipitação envolve os fenômenos de nucleação e crescimento cristalino. Na nucleação, os átomos ou moléculas se unem para formar um núcleo estável com poucas células unitárias. A nucleação depende da colisão entre os átomos e moléculas devido à difusão térmica, portanto, a nucleação ocorre em meios supersaturados. O crescimento cristalino é obtido pelo crescimento de camadas ordenadas em torno do núcleo por meio da difusão dos solutos na superfície dos cristais. Assim, em um conjunto de partículas com dimensões diferentes, as maiores crescem devido à dissolução das menores, cuja massa é incorporada à das maiores<sup>[48]</sup>.

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

### 3.2.4 Estabilidade de fluidos magnéticos

Um fluido magnético é definido como um sistema coloidal contendo nanopartículas magnéticas de modo que, quando um campo magnético é aplicado, arrasta o líquido carreador e o sistema age macroscopicamente como um sistema único de fase líquida<sup>[1]</sup>. Para aplicações biológicas, normalmente as nanopartículas estão dispersas em meios biológicos compatíveis, como água ou soluções salinas, incluindo tampões, como o tampão fosfato salino (PBS). Dessa forma, o sistema possui propriedades tanto coloidais quanto magnéticas.

As nanopartículas dispersas tendem a se agregar espontaneamente como mecanismo de redução da energia livre proveniente da grande área superficial. Por ser um processo lento, os fluidos magnéticos apresentam uma aparente estabilidade durante longos períodos, chamada de estabilidade coloidal. Essa agregação pode ocorrer por dois processos: a floculação ou a coagulação. Na floculação, há formação de flocos pouco densos que se desfazem por diluição ou adição de eletrólitos. Na coagulação ocorre a formação de um coágulo pela agregação de partículas primárias, sendo mais coeso e denso que o floco<sup>[49]</sup>.

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

### 3.2.4.1. Interações atrativas

Dentre as forças atrativas, podem ser citadas as interações dipolares magnéticas e as interações de van der Waals<sup>[50]</sup>. A introdução de forças de repulsão que compensem essas interações garante estabilidade coloidal ao FM.

Considerando-se duas nanopartículas separadas por uma distância  $s + d$ , em que  $s$  é a distância entre as superfícies das nanopartículas e  $d$  é o diâmetro das mesmas, conforme ilustrado na Figura 6, a energia de interação dipolo-dipolo ( $E_{dd}$ ) entre as duas partículas quando seus momentos magnéticos  $\vec{m}$  estão alinhados, é dada por<sup>[50]</sup>:

$$E_{dd} = \frac{m^2}{2\pi\mu_0 r^3} \quad (7)$$

Se  $r = (s + d)$  e  $m = \frac{\mu_0 M^2 \pi d^3}{6}$ , onde  $M$  é a magnetização,  $\mu_0$  a permeabilidade no vácuo e  $d$  o diâmetro das nanopartículas, temos na equação (7):

$$E_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 \pi d^3}{9(l + 2)^3} \quad (8)$$

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

$$E_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 V}{12} \quad (9)$$

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

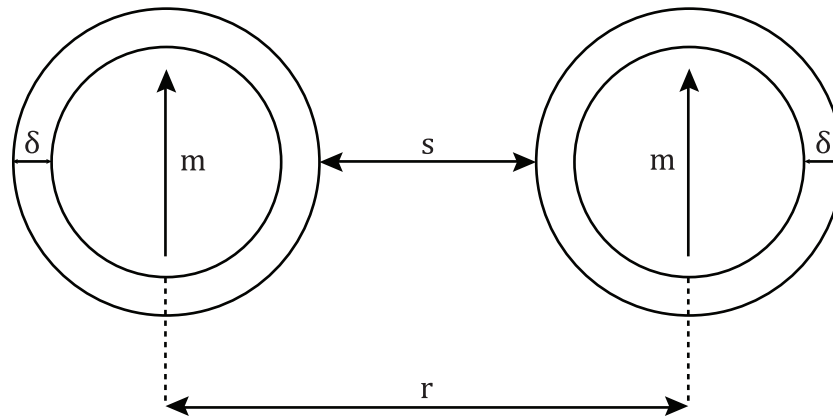


Figura 6 – Representação de duas nanopartículas com momentos magnético  $\vec{m}$  alinhados, distância entre superfícies  $s$  e distância entre os centros  $r$ , com espessura de camada protetora  $\delta$ .

A interação atrativa provocada pela interação de van der Waals produz atrações entre átomos neutros ou moléculas e entre cargas elétricas devido à flutuação de energia das forças dipolo-dipolo que estão presentes, como os dipolos induzidos e os dipolos permanentes. A energia de interação entre duas partículas esféricas idênticas,  $E_{vw}$ , é dada por:<sup>[50]</sup>

$$E_{vw} = -\frac{A}{6} \left[ \frac{2}{l^2 + 4l} + \frac{2}{(l + 2)^2} + \ln \frac{l^2 + 4l}{(l + 2)^2} \right] \quad (10)$$

em que  $A$  é a constante de Hamaker, que depende das propriedades dielétricas das nanopartículas e do meio, e  $l = \frac{2s}{d}$ . Segundo a equação (10), a força de van der Waals é proporcional à  $l^{-1}$  para partículas que estão próximas e a  $l^{-6}$  para partículas distantes. Dessa forma, quando as partículas estão próximas, a energia necessária para separar um par de partículas que se agregaram tende ao infinito.

As forças atrativas estão presentes em todos os fluídos magnéticos, portanto é necessário introduzir no sistema forças repulsivas entre as nanopartículas para obter a estabilização do fluído.

### 3.2.4.2. Interações repulsivas

Se as partículas possuírem cargas e potenciais de superfície de mesmo sinal (positivo ou negativo), será formada uma dupla camada elétrica que impede a agregação das partículas por meio de uma repulsão eletrostática. Esta camada é composta por uma parte interna, devido à

presença dos contraíons, e uma difusa, formada pelos contraíons em excesso e os co-íons, como ilustrado na Figura 7. Devido à origem dessa repulsão, essa estabilidade é chamada de estabilidade eletrostática.

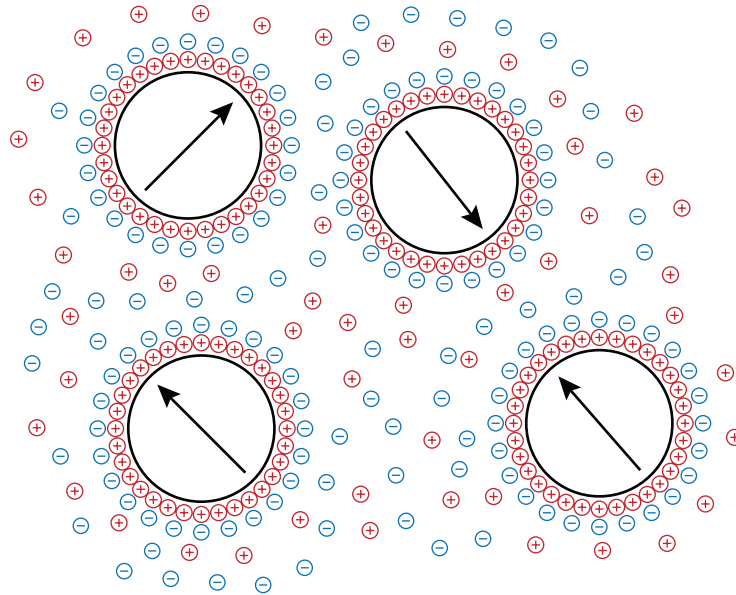
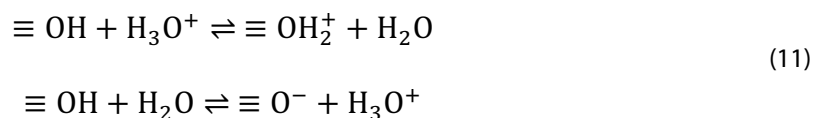


Figura 7 – Ilustração de um fluido magnético formado por nanopartículas dispersas em meio ácido, onde as setas representam os momentos magnéticos.

Partículas sintetizadas por meio da técnica de coprecipitação são consideradas macroânions devido à presença da carga superficial<sup>[51]</sup> e os fluidos magnéticos em pH ácido ou básico produzidos são chamados de fluidos magnéticos iônicos (FMIs)<sup>[1]</sup>, ou seja, a dispersão das nanopartículas é feita em meios ácidos ou alcalinos. A reação de equilíbrio ácido-base leva à uma grande carga superficial ( $\Sigma$ ) através da adsorção de grupos hidroxila anfotéricos, proporcionando uma carga negativa em meios alcalinos e positivos em meios ácidos, conforme se observa na Figura 8. A equação do equilíbrio ácido-base na superfície da nanopartícula pode ser escrita como:



onde  $\equiv$  representa a superfície da nanopartícula<sup>[1]</sup>.

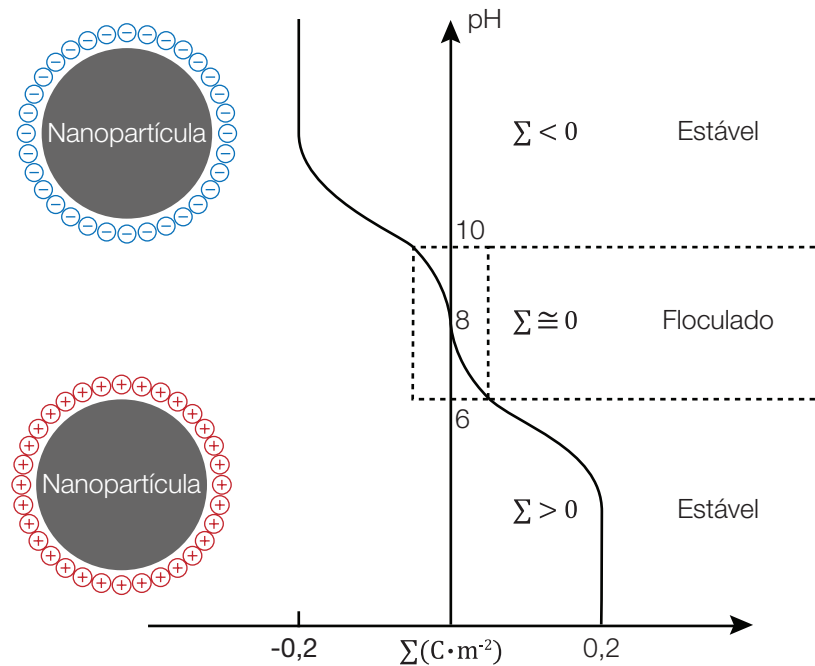


Figura 8 – Esquema de estabilidade de um FMI em função do pH. Em pH alcalino ( $pH > 10$ ), as nanopartículas adquirem carga superficial  $\Sigma < 0$ , enquanto que em pH ácido ( $pH < 6$ ) a carga superficial é  $\Sigma > 0$ , proporcionando forças repulsivas suficientes para o processo de peptização. Em pH em torno do ponto isoelétrico ( $pH \approx 7,5$ ),  $\Sigma \approx 0$  e as nanopartículas floculam. Adaptado de Bacri et al., 1990.<sup>[51]</sup>

Outro tipo de interação repulsiva é a estérica, na qual ocorre uma interação repulsiva com origem nas moléculas adsorvidas na superfície das nanopartículas. Essas moléculas têm uma afinidade pelo líquido carreador e impedem a aproximação das nanopartículas pelo preenchimento do espaço a redor delas, criando uma barreira estérica<sup>[52]</sup>. As moléculas adsorvidas, também chamadas de surfactante, impedem a aproximação das nanopartículas e eventual agregação das mesmas. Normalmente, os surfactantes são formados por grupos polares que se ligam à superfície das nanopartículas e possuem caudas com propriedades similares às do meio, produzindo uma repulsão entrópica para suprimir a atração, prevenindo assim uma agregação irreversível<sup>[53]</sup>. Os fluídos magnéticos com estabilidade proporcionada por surfactantes são chamados de fluídos magnéticos surfactados (FMS). Como exemplo de surfactante, pode-se citar o ácido oleico<sup>[54]</sup>.

No caso de fluidos biocompatíveis, estes são estabilizados por surfactantes cujos terminais possuem cargas, proporcionando uma repulsão eletrostérica<sup>[55]</sup>. Para a obtenção de FMs estáveis, é necessário fazer um tratamento da superfície das nanopartículas, que será descrito a seguir.

### 3.2.4.3. Métodos de estabilização de FMs

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

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

Um dos métodos de tratamento da superfície de nanopartículas por interação eletrostática, é a técnica de automontagem layer-by-layer.<sup>[56]</sup> Inicialmente proposta para a deposição de filmes poliméricos, a técnica de automontagem consiste na deposição alternada de monocamadas de polieletrólitos, partículas ou outros entes de cargas opostas. Essa técnica vem sendo investigada para produção de nanopartículas poliméricas como veículos carreadores de drogas. Esses materiais possuem multicamadas, são preparados no formato de cápsulas ou nanocompósitos planares, podendo encapsular uma grande carga de drogas. Em adição, essas cápsulas podem ser funcionalizadas com propriedades específicas dependendo da aplicação<sup>[57]</sup>. Permite também a obtenção de complexos com polieletrólitos e nanomateriais magnéticos com resposta ao pH, adequados ao papel de carreadores de drogas. A técnica permite também um controle a nível molecular, bem como a deposição de monocamadas, sendo de alta precisão e de preparação relativamente simples<sup>[58]</sup>.

Como exemplos do emprego da técnica de automontagem para produção de complexos com óxidos de ferro e polímeros, tem-se a síntese de nanopartículas de maguema cobertas com poli(etilenoimina) (PEI) e poli(etilenoglicol)-ácido poli(glutâmico) (PEO-PGA), para a produção de carreadores nanoparticulados<sup>[59]</sup>.

Neste trabalho, as nanopartículas de óxido de ferro foram funcionalizadas com ChS e GLU, produzindo complexos superparamagnéticos estáveis e biocompatíveis, com propriedades físico-químicas promissoras para carreamento de glicosaminoglicanos.



### 3.3 Técnicas de caracterização de nanopartículas

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

#### 3.3.1 Espectroscopia Raman e no infravermelho

Por meio da absorção ou espalhamento da radiação eletromagnética incidida sobre a molécula, as técnicas de espectroscopia permitem o estudo de diversas propriedades das moléculas, como as suas vibrações.<sup>[60]</sup> A vibração de uma molécula consiste no movimento dos núcleos relativamente entre eles. Sabe-se que uma única partícula possui 3 graus de liberdade translacional. Por outro lado, caso duas partículas estejam ligadas, como em moléculas diatômicas, existem 6 graus de liberdade, porém, apenas 3 são translacionais. Os outros 3 restantes são rotacionais (perpendiculares ao eixo da molécula) e vibracionais (no eixo da molécula).<sup>[61]</sup> Para moléculas diatômicas, observa-se que apenas 2 graus são rotacionais (uma vez que a rotação ao longo do eixo da molécula não provoca alteração significativa) e 1 vibracional (ao longo do eixo da molécula).<sup>[61; 62]</sup> Por tanto, de forma geral, uma molécula não linear com  $n$  átomos possui  $3n-6$  vibrações fundamentais enquanto que moléculas lineares possuem  $3n-5$ .<sup>[61; 62]</sup> As frequências dessas vibrações é que são observadas nos espectros de infravermelho e Raman, porém, a origem desses espectros é diferente.<sup>[62]</sup> A espectroscopia no infravermelho baseia-se no espectro de bandas de absorção pelas moléculas da luz incidida.<sup>[60]</sup> A molécula absorve a radiação infravermelha quando a vibração dos grupos funcionais na molécula produz um campo elétrico oscilante que leve à mudança do seu momento de dipolo.<sup>[62]</sup>

Dessa forma, somente há absorção do feixe incidente se a sua frequência  $\nu$  for igual à frequência da vibração.<sup>[60; 62; 63]</sup>

Por outro lado, os espectros Raman possuem origem na polarização eletrônica causada pela radiação eletromagnética.<sup>[62]</sup> Quando uma luz monocromática de frequência  $\nu$  irradia uma molécula, devido à polarização da molécula induzida por essa radiação, ocorre o espalhamento elástico (espalhamento Raylight), onde a luz de frequência  $\nu$  é espalhada, e o inelástico (espalhamento Raman), onde a frequência da luz espalhada é  $\nu \pm \nu_i$ , onde  $\nu_i$  representa a frequência vibracional da molécula.<sup>[62]</sup>

O estudo da interação de luz monocromática com a matéria pode ser feito considerando-se uma onda eletromagnética, que incide na matéria, cuja intensidade do campo elétrico  $E$  varia com o tempo, dada por<sup>[62]</sup>:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (12)$$

em que  $t$  é o tempo,  $E_0$  é a amplitude da onda e  $\nu_0$  é a frequência da radiação incidente. Se a radiação incide em uma molécula diatômica com polarizabilidade  $\alpha$ , o momento de dipolo induzido  $\vec{P}$  produzido pela interação com a nuvem eletrônica é dado por:

$$P = \alpha E \therefore P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (13)$$

A constante de proporcionalidade  $\alpha$  é chamada de polarizabilidade. A coordenada normal de vibração devido à frequência de vibração  $\nu_v$ , pode ser escrita como:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \quad (14)$$

em que  $q_0$  é a amplitude vibracional.

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

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q \quad (15)$$

onde  $\alpha_0$  é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e a derivada, calculada na posição de equilíbrio, é a taxa de variação de  $\alpha$  em relação à variação em  $q$ .

Combinando as equações à (12) à (15):

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \cos 2\pi\nu_v t \quad (16)$$

Considerando-se que:

$$\cos(a) \cos(b) = \left(\frac{1}{2}\right) [\cos(a + b) + \cos(a - b)] \quad (17)$$

obtém-se a partir da equação (16):

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \{\cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t]\} \quad (18)$$

Na equação (18), o primeiro termo da igualdade descreve um dipolo oscilante que irradia luz na frequência  $\nu_0$  – espalhamento Rayleigh. O segundo termo contribuirá para o valor do momento induzido se  $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right) \neq 0$ , ou seja, para ocorrer o efeito Raman, é necessário que a polarizabilidade varie com o deslocamento da coordenada  $q$  em relação à posição de equilíbrio. Neste caso, a luz espalhada terá duas frequências: a  $(\nu_0 + \nu_v)$ , que é chamada de espalhamento Raman anti-Stokes, e a  $(\nu_0 - \nu_v)$ , denominada espalhamento Raman Stokes. É importante ressaltar que, se a derivada da polarizabilidade em função do deslocamento de vibração for nula, a vibração não terá modo vibracional Raman ativo.<sup>[62]</sup>

No caso de um espalhamento elástico (Rayleigh), a luz é espalhada com a mesma frequência da incidente ( $\nu_0$ ). No espalhamento inelástico (Raman), a onda espalhada possui frequência  $\nu_0 \pm \nu_v$ . Nas bandas Stokes a molécula no estado fundamental é excitada para um estado excitado virtual e retorna para um estado excitado, absorvendo parte da energia do fóton incidente e emitindo luz de frequência  $(\nu_0 - \nu_v)$ . Por outro lado, nas bandas anti-Stokes a molécula, inicialmente no estado excitado, retorna para o estado fundamental, liberando energia na luz espalhada, de frequência  $(\nu_0 + \nu_v)$  conforme se observa na ilustração apresentada na Figura 9. Apesar do espalhamento Raman ser extremamente fraco em comparação ao espalhamento Rayleigh (por um fator de  $10^{-3} \sim 10^{-5}$ ), utilizando-se como fonte de excitação um laser, é possível observar o efeito<sup>[64]</sup>.

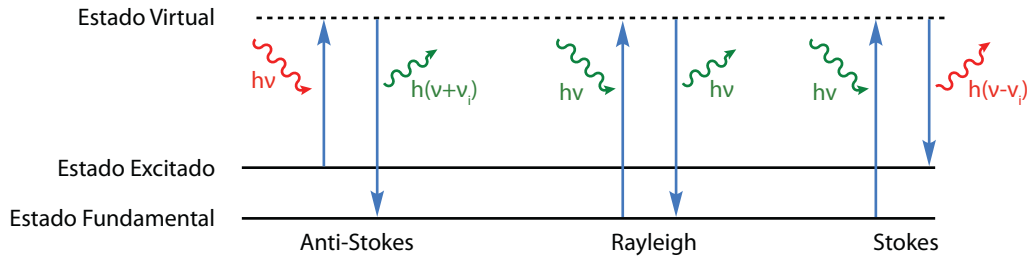


Figura 9 – Mecanismos de espalhamento de um fóton.

No espectro Raman de um dado material tem-se simetricamente, em relação à linha Rayleigh, uma banda do lado de deslocamento positivo, a Stokes, e uma do lado de deslocamento negativo, a anti-Stokes. Classicamente, as duas deveriam ter a mesma intensidade, mas observa-se que a Stokes é mais intensa que a anti-Stokes. Considerando-se a distribuição de Maxwell-Boltzmann, à temperatura ambiente, a população de moléculas no estado excitado é menor que as no estado fundamental, de forma que o espectro Raman à temperatura ambiente resulta em intensidade das bandas Stokes maior do que a das bandas anti-Stokes, conforme se observa no exemplo do espectro Raman para o cristal de magnetita mostrado na Figura 10.

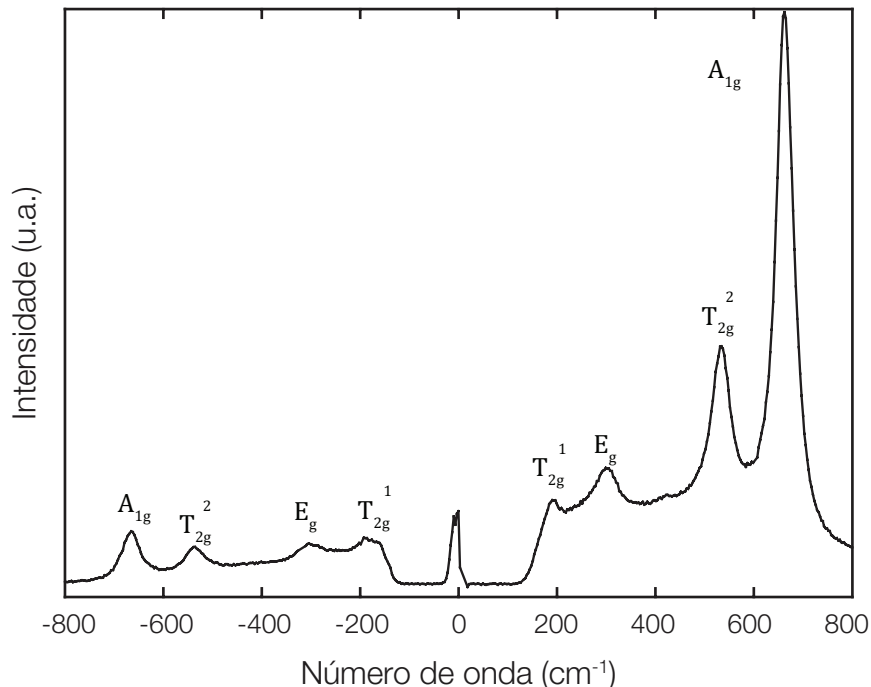


Figura 10 – Espectro Raman de magnetita. As bandas anti-Stokes ( $\nu < 0$ ) e Stokes ( $\nu > 0$ ) possuem arranjo simétrico com o centro em  $\nu = 0 \text{ cm}^{-1}$ . Adaptado de Shebanova e Lazor, 2003<sup>[65]</sup>.

A posição (frequência) das bandas de absorção depende da constante de força das ligações, da massa relativa dos átomos e da sua geometria. O mecanismo da absorção da radiação eletromagnética pode ser simplificado através de um modelo clássico, considerando uma molécula diatômica em que a sua frequência natural de vibração é dada pela Lei de Hooke<sup>[60-63]</sup>:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (19)$$

onde  $k$  é a constante de força,  $\mu$  a massa reduzida e  $c$  a velocidade da luz. A constante de força,  $k$ , depende da força da ligação, portanto, uma ligação simples possui aproximadamente  $5 \times 10^5$  dyne  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que ligações duplas e triplas possuem aproximadamente de 2 a 3 vezes esse valor, respectivamente.<sup>[63]</sup> Como a frequência  $\bar{\nu}$  está diretamente relacionada com a raiz quadrada da constante de força, observa-se que a posição da banda de absorção diminui com a força da ligação (efeito da constante de força).<sup>[60; 62]</sup> Por outro lado, a frequência  $\bar{\nu}$  é inversamente proporcional à massa reduzida  $\mu$ , portanto, átomos pesados contribuem para a diminuição da frequência de vibração (efeito da massa).<sup>[60; 62]</sup>

Os principais modos vibracionais observados são os modos de estiramento ( $\nu$ ) e dobramento ( $\delta$ ) (Figura 11). O estiramento produz mudanças na distância interatômica por meio de um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação; a flexão, por sua vez, resulta na mudança do ângulo da ligação entre um grupo de átomos com um átomo em comum. Em grupos de três ou mais átomos, em que pelo menos dois sejam idênticos, há dois modos de estiramentos: assimétrico ( $\nu_a$ ) e simétrico ( $\nu_s$ ). Este fenômeno pode ser observado no grupo amina, em que uma amina primária ( $-\text{NH}_2$ ) possui duas bandas de absorção, devido aos estiramentos simétrico e assimétrico, enquanto que uma amina secundária ( $-\text{RNH}$ ) possui apenas uma banda de estiramento.<sup>[60; 62; 63]</sup>

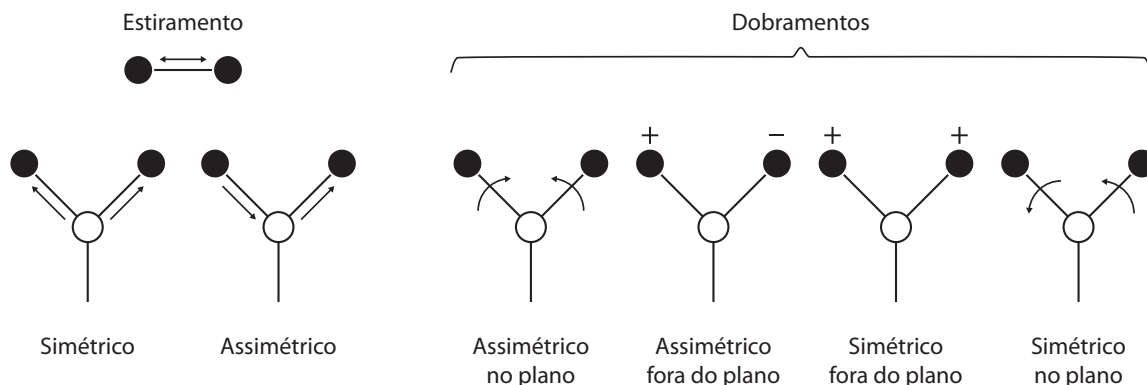


Figura 11 –Vibrações fundamentais. Os símbolos + e – representam deslocamentos para cima e para baixo do plano, respectivamente.

Apesar de ser possível prever vários modos vibracionais, normalmente é observada uma quantidade diferente de bandas. A diminuição da quantidade de bandas observadas está relacionada com (1) a ocorrência de vibrações que são redundantes, (2) vibrações que necessitam da mesma energia (ou frequência) ou (3) vibrações que são inativas na espectroscopia utilizada. No caso da espectroscopia Raman, uma vibração que não induz uma mudança na polarizabilidade da molécula é Raman inativa. Já na espectroscopia no infravermelho, caso a vibração não gere um momento de dipolo, a vibração também é inativa. Por outro lado, o aumento da quantidade de bandas de vibração observadas (vibrações fundamentais) é proveniente de sobretons ( $2\bar{\nu}$ ,  $3\bar{\nu}$ , etc.) e bandas de combinação ( $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_b$ ,  $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_b$ ,  $2\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_b$ , etc.). De forma geral, grupos funcionais que possuem um forte momento de dipolo apresentam bandas de absorção mais intensas. <sup>[60; 62; 63]</sup>

A espectroscopia Raman é uma das técnicas mais empregadas no estudo dos materiais pois fornece informações como a simetria cristalina, arranjo atômico e interações entre as moléculas, permitindo assim a identificação do material investigado<sup>[65; 66]</sup>. A técnica não é destrutiva e normalmente não requer preparo da amostra, pode ser realizada à temperatura ambiente e a análise dos resultados pode ser obtida de forma qualitativa e/ou quantitativa. Enquanto que na espectroscopia Raman não é necessário um prévio preparo da amostra, as amostras sólidas na espectroscopia no infravermelho devem ser diluídas em brometo de potássio (KBr) e em seguidas submetidas à prensa hidráulica para a formação de pastilhas. O KBr é utilizado uma vez que é transparente na região do infravermelho.

Nas últimas décadas, a espectroscopia Raman vem sendo empregada para a investigação de nanomateriais, em particular dos óxidos de ferro, seja no estudo de suspensões coloidais<sup>[1; 67-71]</sup>, da estabilidade do núcleo<sup>[66; 72-74]</sup>, passivação da superfície<sup>[75; 76]</sup>, dos efeitos da cobertura<sup>[54; 77;</sup>

<sup>78]</sup>, de nanocompósitos<sup>[79-81]</sup> ou da interação com o sangue<sup>[82; 83]</sup>, entre outros. Uma das grandes vantagens da espectroscopia Raman no estudo das nanopartículas de óxido de ferro é a capacidade de distinguir as suas diferentes fases.<sup>[66; 84]</sup>

Os cálculos teóricos preveem para a estrutura do tipo espinélio cúbico na forma *bulk*, 5 modos vibracionais Raman ativos.<sup>[85]</sup> Apenas os íons de ferro e oxigênio do sítio tetraédrico contribuem para o efeito Raman.<sup>[65]</sup> Conforme descrito na Tabela 1, o modo  $A_{1g}$  representa o estiramento simétrico dos átomos de oxigênio em relação aos átomos de ferro; o modo  $E_g$  representa a flexão simétrica dos átomos de oxigênio e os 3 modos  $T_{2g}$  representam o movimento de translação dos cinco átomos, o estiramento assimétrico dos átomos de oxigênio e a flexão assimétrica dos átomos de oxigênio<sup>[1; 65; 86]</sup>.

Tabela 1 – Modos Raman atribuídos à magnetita *bulk*<sup>[65]</sup>.

Modo	Origem	Número de Onda
$A_{1g}$	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 $\text{FeO}_4$	$\cong 193 \text{ cm}^{-1}$
$T_{2g}^3$	Flexão assimétrica O–Fe	$\cong 450 \sim 490 \text{ cm}^{-1}$

O principal uso da espectroscopia no infravermelho, por sua vez, é identificar grupos funcionais presentes nas moléculas. Apesar de o espectro ser característico de cada molécula (obtendo-se uma identidade única), há grupos funcionais que apresentam bandas de absorção em frequências iguais ou muito próximas independente da estrutura da molécula, permitindo a identificação desses grupos em outras amostras de composição diferente. As principais bandas de absorção utilizadas neste trabalho encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais bandas de absorção no infravermelho utilizadas neste trabalho, em ordem crescente pela posição<sup>[60; 87]</sup>

Banda de absorção	Origem	Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )
v(Fe-O)	Magnetita	210, 270, 350, 560
v(Fe-O)	Maguemita	212, 362, 440, 523
v(S-O)	Ácido sulfônico	650
v <sub>a</sub> (S=O), v <sub>s</sub> (S=O)	Ácido sulfônico	1350, 1150
v(C-N)	Amina	1350 – 1000
v(C-N)	Amida primária	1400
δ(N-H)	Amina secundária	1500
v(C-N)	Amida secundária	1550
v <sub>a</sub> (C=O), v <sub>s</sub> (C=O)	Carboxilato	1600, 1400
δ <sub>a</sub> (N-H), δ <sub>s</sub> (N-H)	Amina primária	1640 – 1560
v(C=O)	Amida	1700 – 1640
v(C=O)	Ácido carboxílico	1730 – 1700
v(N-H)	Amida secundária	3300
v <sub>a</sub> (N-H), v <sub>s</sub> (N-H)	Amida primária	3350, 3180
v <sub>a</sub> (N-H), v <sub>s</sub> (N-H)	Amina primária	3500 – 3300
v(O-H)	Ácido carboxílico	3400 a 2400

Por meio da análise das bandas de absorção dos estiramentos assimétricos e simétricos dos carboxilatos coordenados, é possível prever o método de coordenação (monodentado, bidentado ou bidentado em ponte, Figura 12).<sup>[62]</sup>

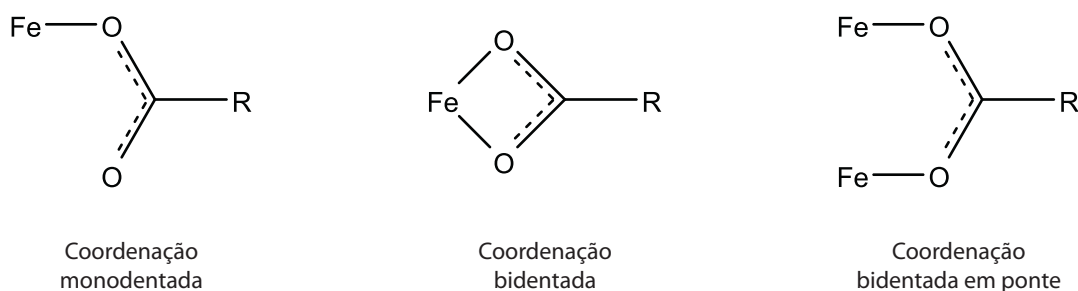


Figura 12 – Esquema da coordenação do carboxilato com íons metálicos. No exemplo, o íon metálico é representado pelo ferro.

De forma geral, quando a diferença ( $\Delta\bar{\nu}$ ) entre a bandas assimétrica e simétrica é maior que 200 cm<sup>-1</sup>, a coordenação é do tipo monodentada. Por outro lado, quando  $150 \leq \Delta\bar{\nu} \leq 200$  cm<sup>-1</sup>, a coordenação é bidentada. Já para  $\Delta\bar{\nu} < 150$  cm<sup>-1</sup>, tem-se uma coordenação bidentada em ponte.<sup>[62; 88]</sup>



As espectroscopias Raman e no infravermelho foram empregadas para a caracterização dos materiais utilizados neste trabalho e para o estudo da interação desses com a superfície das nanopartículas nos sistemas produzidos.

### 3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amplamente usada no ramo da nanotecnologia, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) possui resolução suficiente para observar a morfologia das nanopartículas e estimar as suas dimensões<sup>[89]</sup>. Na MET, em um sistema à vácuo, um feixe de elétrons é emitido por um filamento, normalmente de tungstênio, e direcionado para a amostra. Para que ocorra a formação da imagem, os elétrons devem interagir com a amostra, podendo ser transmitidos ou espalhados. Através dessa interação, uma imagem (contraste) é formada, onde átomos mais densos espalham mais elétrons. Desta forma, nanopartículas metálicas bloqueiam o feixe de elétrons, enquanto que nanopartículas poliméricas necessitam de contrastes para permitir a sua visualização por meio desta técnica. Apesar de ser possível a visualização do núcleo de nanopartículas metálicas, assim como nas nanopartículas poliméricas, é necessário o uso de algum contraste que permita observar a sua cobertura.

Considerando-se as nanopartículas com formato esférico, é possível medir os diâmetros a partir das imagens obtidas e construir um histograma em função do tamanho (diâmetro) das mesmas. Para melhores resultados estatísticos, a quantidade de nanopartículas mensuradas ( $n$ ) deve ser próximo de mil. Considerando a população amostral como uma única série com uma dispersão  $R$  e com  $n$  itens, o intervalo entre as classes  $C$  para o histograma da distribuição do tamanho é dado por<sup>[90]</sup>:

$$C = \frac{R}{1 + 3,322 \cdot \log(n)} \quad (20)$$

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

$$P(D) = \frac{1}{D\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\ln\left(\frac{D}{D_{\text{méd}}}\right)^2}{2\sigma^2}} \quad (21)$$

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

O preparo das amostras para realização da microscopia dos fluídos magnéticos consiste na deposição e secagem de algumas gotas do material diluído (normalmente de 1:100 ou 1:1000, no mesmo solvente e pH da amostra) em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono. Esta técnica foi utilizada para a análise da morfologia das nanopartículas e para obtenção do diâmetro médio das mesmas.

### 3.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) e mobilidade eletroforética

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

No experimento de espalhamento de luz, um feixe de luz monocromático incide na amostra e é espalhado em várias direções, sendo que um detector coleta a luz espalhada em um ângulo  $\theta$  com referência ao feixe incidente. O espalhamento de ondas eletromagnéticas por qualquer sistema está relacionado à heterogeneidade das moléculas, tanto em escala molecular como na escala de agregações moleculares. Como as moléculas iluminadas possuem seus movimentos de translação, rotação e vibração, a luz espalhada no detector encontra-se em constante mudança, variando com o tempo. Dessa forma, a técnica leva em conta o movimento Browniano das partículas e o relaciona com o tamanho das mesmas. Ainda, o  $D_H$  difere do diâmetro obtido pela técnica de MET, não somente por considerar as moléculas de água carregadas pelas nanopartículas durante o seu deslocamento no movimento Browniano, mas também (1) pela a detecção de agregados como uma única partícula e/ou (2) por considerar a cobertura presente na sua superfície, cuja visibilidade na MET somente é possível com o uso de um contraste.<sup>[91]</sup>

O movimento Browniano das partículas suspensas no líquido depende da viscosidade ( $\eta$ ) e da temperatura ( $T$ ) além do tamanho ( $r_H$ ), relacionados pela equação de Stokes-Einstein:<sup>[91]</sup>

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (22)$$

em que  $D$  é o coeficiente de difusão,  $k_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta,  $\eta$  a viscosidade do meio e  $r_H$  o raio hidrodinâmico da partícula. A partir da equação (22) tem-se:<sup>[91]</sup>

$$D \propto T \propto \eta^{-1} \propto r_H^{-1} \quad (23)$$

Observa-se que as partículas de maior tamanho possuem um coeficiente de difusão menor que partículas de menor tamanho. A técnica de EDL utiliza a relação apresentada para obter a distribuição de tamanho do material suspenso (partículas ou aglomerados) em uma amostra, conhecendo-se a viscosidade do material dispersante e a temperatura da amostra, entre outros dados.<sup>[91]</sup>

O potencial  $\zeta$ , representa o potencial no plano de cisalhamento resultante da interação das cargas das nanopartículas com as do meio. A carga superficial da partícula promove uma bicamada elétrica de distribuição dos contraíons ao redor da partícula.<sup>[91]</sup> Esta bicamada é dividida em uma parte interna e uma parte externa, mais difusa.<sup>[91]</sup> Na parte interna, os contraíons encontram-se mais fortemente ligados às partículas, enquanto na camada externa ocorre uma difusão das cargas.<sup>[91]</sup> Quando a partícula se encontra em movimento, os contraíons da camada interna se deslocam juntamente com a partícula, porém, não há deslocamento das cargas da camada difusa.<sup>[91]</sup> O potencial  $\zeta$  é a medida do potencial que existe entre as duas partes da bicamada (Figura 13).

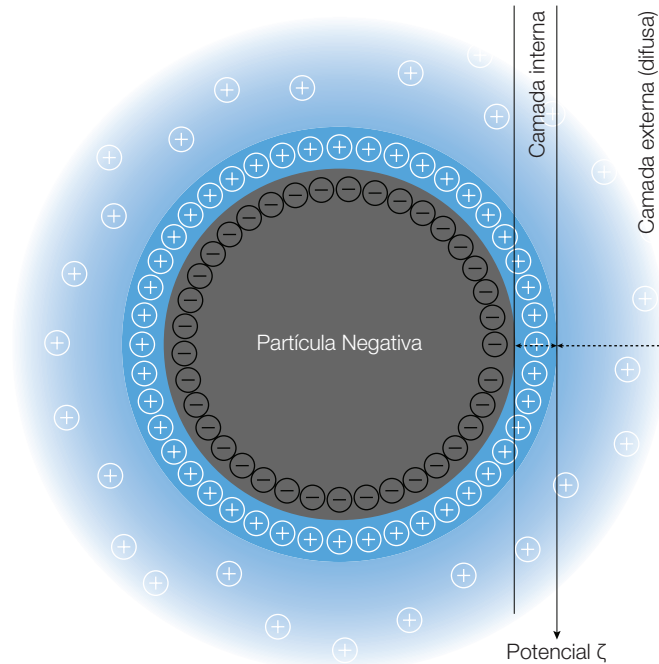


Figura 13 – Esquema representando a interação de uma partícula carregada negativamente em um meio líquido.

O potencial  $\zeta$  reflete a estabilidade de um coloide: considera-se que, para um coloide ser potencialmente estável, o valor absoluto do potencial  $\zeta$  deve ser maior ou igual à 30 mV. Se todas as partículas possuem cargas iguais, elas tenderão a se repelir, promovendo uma estabilidade eletrostática. É importante ressaltar que o pH do meio interfere diretamente no potencial  $\zeta$ . Conforme explicado em 3.2.4.2 Interações repulsivas (pg. 28), a carga superficial das nanopartículas varia com o pH: uma vez que em meio ácido as nanopartículas possuem carga positiva, se mais ácido for adicionado ao meio, maior carga positiva irão adquirir, tornando-as mais estáveis; por outro lado, se base é adicionada ao meio, haverá redução das cargas até a obtenção de uma carga nula (ponto isoelétrico), e, posteriormente, uma inversão da carga superficial das nanopartículas, no caso, uma carga negativa. O ponto isoelétrico é o ponto em que um coloide que possui sua estabilidade dependente da repulsão eletrostática floclula. Para aplicações biomédicas, o estudo do potencial  $\zeta$  é de extrema importância, uma vez que o pH do fluido deve se encontrar na faixa do pH fisiológico e ainda apresentar estabilidade coloidal.

Para determinação do potencial  $\zeta$ , são utilizados os efeitos eletrocinéticos, como a eletroforese, provocados pela interação entre a carga superficial das partículas e um campo elétrico aplicado no meio. Na eletroforese, as partículas com carga tendem a se mover em

direção ao eletrodo de carga oposta, entretanto, as forças viscosas do meio se opõem a esse movimento. Quando o equilíbrio entre essas forças é atingido, a velocidade das partículas é constante. Essa velocidade é chamada de mobilidade eletroforética ( $U_E$ ) e é relacionada com o potencial  $\zeta$  conforme a equação de Henry:<sup>[91]</sup>

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (24)$$

onde  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do meio,  $\eta$  a viscosidade do meio e  $f(ka)$  a função de Henry, cujo valor depende principalmente do tamanho das partículas. Normalmente, o valor da função de Henry é aproximado dependendo da composição do meio; para meios polares, a aproximação de Smoluchowski é utilizada e a função de Henry é igual a 1,5.<sup>[91]</sup>

### 3.3.4 Análise Termogravimétrica

As técnicas de análise térmica caracterizam um sistema (elemento, composto ou mistura) através da mensuração das mudanças das propriedades físico-químicas em função da temperatura<sup>[92]</sup>. Uma das técnicas que é bastante utilizada é a análise termogravimétrica (TG), na qual a variação da massa é medida em função do aumento da temperatura.

Basicamente, o equipamento é constituído por um forno com temperatura controlada e uma balança de alta precisão. Além disso, a atmosfera também é controlada, podendo ser uma atmosfera oxidante, redutora ou inerte, e evitando um aumento da pressão do sistema.

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

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

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

### 3.3.5 Ensaio de MTT

Muitos ensaios biológicos requerem a análise da proliferação ou viabilidade celular. Essa análise pode ser realizada por vários métodos, dentre eles, o uso de corantes seguido da contagem manual de células pelo método de inclusão/exclusão de azul de tripan.<sup>[93]</sup> Por outro lado, espectrômetros de placas possuem maior precisão e capacidade de processamento. Portanto, o uso destes, aliado a reações colorimétricas, proporciona resultados mais precisos e rápidos. Em um ensaio colorimétrico, é desejável que o substrato utilizado seja incolor e seja usado apenas pelas células vivas para se obter um produto colorido. Os sais de tetrazólio foram estudados com esse fim, uma vez que são indicadores da atividade de enzimas desidrogenase.<sup>[94]</sup> Nas mitocôndrias ativas, o anel de tetrazólio é clivado, portanto, a reação ocorre apenas em células com mitocôndrias viáveis.<sup>[95]</sup> O ensaio de MTT utiliza o brometo de 3-(4,5(dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), um composto levemente amarelado que produz cristais azuis escuros de formazan quando incubado com células viáveis. A reação de redução do MTT não é bem definida, mas a literatura sugere uma reação com NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) ou outra molécula que transfira elétrons ao MTT (Figura 14).<sup>[93]</sup> O produto resultante, cristais de formazan, é insolúvel em água e, por tanto, um solvente, normalmente DMSO (dimetilsulfoxido), é adicionado ao final do ensaio para permitir a solubilidade dos cristais e a obtenção de uma amostra homogênea que possibilite a leitura pelo espectrofotômetro.<sup>[93; 95]</sup>

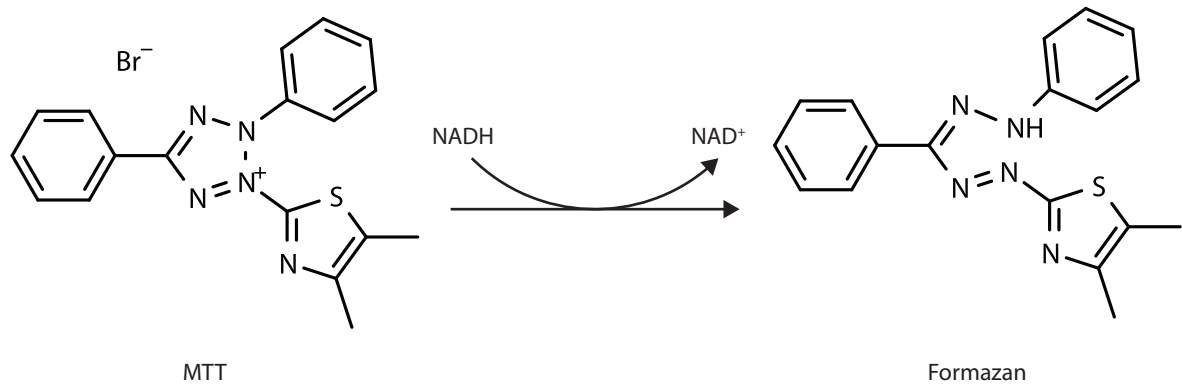


Figura 14 – Mecanismo de reação do MTT com NADH produzindo formazan.<sup>[93]</sup>

O ensaio é versátil, quantitativo e é amplamente usado devido à sua simplicidade e precisão. A absorbância está ligada diretamente com o número de cristais produzidos, que, por sua vez, é diretamente proporcional ao número de células. Existe uma linearidade entre a quantidade de células viáveis e a absorbância que se estende de 200 células/poço até 50.000 células/poço.<sup>[95]</sup> Como a produção dos cristais depende da atividade mitocondrial, células vivas sem atividade metabólica (como eritrócitos) não produzem cristais de formazan.<sup>[95]</sup> Por outro lado, células ativadas, como linfócitos ativados com concanavalina-A, produzem uma maior quantidade de formazan do que células em condições normais.<sup>[95]</sup> Observa-se, por tanto, que o ensaio de MTT permite analisar a viabilidade celular mesmo na ausência da proliferação.

O ensaio de MTT permite, portanto, a distinção entre células viáveis e células mortas, com uma ampla aplicação em diversos tipos celulares. Neste trabalho o ensaio de MTT foi utilizado para analisar a biocompatibilidade dos complexos nanoestruturados produzidos.

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta tese de doutorado deram origem a 2 artigos. Um deles empregou o sulfato de condroitina e outro a glucosamina conjugados com nanopartículas de óxido de ferro por diferentes rotas sintéticas. Os manuscritos submetidos para publicação são apresentados a seguir, com um resumo da metodologia e resultados encontrados. Ainda, a caracterização dos materiais (sulfato de condroitina e glucosamina) também é apresentada.

### 4.1 Nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com sulfato de condroitina

Para a obtenção das nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com sulfato de condroitina, foi utilizado o método de coprecipitação em meio alcalino na presença do sulfato de condroitina. Resumidamente, uma solução com proporções estequiométricas de 2:1  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  e sulfato de condroitina foi adicionada lentamente sob agitação à uma solução alcalina contendo NaOH. Após a coprecipitação das nanopartículas, estas foram lavadas por decantação magnética e peptizadas em água deionizada (pH 7), produzindo um fluido magnético estável. Este foi, em seguida, dialisado em água deionizada para remoção de íons excedentes. O estudo por mobilidade eletroforética demonstrou um potencial zeta negativo ( $-56,8$  mV), atribuído à presença dos grupos carboxilato e sulfato desprotonados do sulfato de condroitina presente na superfície das nanopartículas. A morfologia das nanopartículas foi estudada por MET, obtendo-se um diâmetro médio de  $\sim 8$  nm, com morfologia esférica. Por meio da espectroscopia Raman, foi constatado que as nanopartículas de óxido de ferro são de fato magnetita com uma leve oxidação a maguemita. A espectroscopia no infravermelho possibilitou elucidar a funcionalização das nanopartículas com o sulfato de condroitina. Por meio do deslocamento das bandas, constatou-se que o sulfato de condroitina encontra-se coordenado com o ferro da nanopartícula por meio do carboxilato e sulfato. Estes dados foram corroborados por meio da espectroscopia fotoeletrônica. Ainda, o comportamento superparamagnético das nanopartículas foi constatado por meio das medidas de magnetização, obtendo-se uma magnetização de saturação de  $53$  emu/g à  $300$  K. Por último, por meio do ensaio de MTT em células de polpa dentária humana, em 24, 48 e 72 horas, foi demonstrado a biocompatibilidade do material, havendo inclusive aumento da viabilidade celular em relação ao controle e ao sulfato de condroitina livre.



A seguir, o manuscrito submetido à revista *Materials Research Express*.

## **Biocompatible superparamagnetic carriers of chondroitin sulfate**

Luis M. R. Rivera<sup>a,b</sup>, Leonardo G. Paterno<sup>c</sup>, Natalia L. Chaves<sup>b</sup>, Danijela Gregurec<sup>d</sup>, Sônia N. Báb<sup>b</sup>, Sergio E. Moya<sup>d</sup>, Menka Jain<sup>e</sup>, Ricardo B. Azevedo<sup>b</sup>, Paulo C. Morais<sup>a</sup>, Maria A. G. Soler<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil

<sup>d</sup> Soft Matter Nanotechnology Laboratory, CIC biomaGUNE, Guipuzkoa 20009, Spain

<sup>e</sup> Department of Physics and Institute of Materials Science, University of Connecticut, Storrs CT 06269, USA

### **Abstract**

The present study reports on the fabrication, morphological and structural characterizations, magnetic and biological tests of a biocompatible superparamagnetic carrier comprising iron oxide nanoparticle (ION) surface-functionalized with chondroitin sulfate (ChS), labelled ION@ChS. The reported ION@ChS sample is produced by alkaline coprecipitation of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ions in aqueous media in the presence of ChS. Fourier Transform infrared, Raman and x-ray photoelectron spectroscopies provide evidences for coordination of the ChS molecule (mainly through sulfonic groups) onto the ION's surface. As a consequence of this structural feature, the ION@ChSs show superior colloidal stability in physiological media (DMEM). Transmission electron microscopy reveals that the ION@ChS are nearly spherical (mean diameter = 8.2 nm ± 0.1) and almost monodispersed (diameter dispersity = 0.11 ± 0.01), while dynamic light scattering and electrophoretic mobility measurements confirm the presence of ChS at the ION's surface, providing mean hydrodynamic diameter (~ 100 nm) and very high negative zeta potential (around -50 mV). Moreover, the ION@ChS is superparamagnetic at room temperature, with no coercivity or remanence. Cell viability tests performed by means of the MTT assay indicates that ION@ChS shows no cytotoxicity effect (p < 0.05). Therefore, one can anticipate potential biotechnological applications of the ION@ChS sample for site-specific delivery of ChS as well as a contrast agent in magnetic resonance imaging.

Keywords: Chondroitin sulfate, iron oxide nanoparticle, glycosaminoglycan, superparamagnetism, nanocarriers.

## 1 INTRODUCTION

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (IONs) provide ideal and unique platforms for multifunctional diagnostic and therapeutic agents [1] as they group together superparamagnetism, biocompatibility, and easy surface functionalization [2-5]. The ION-based biocompatible platforms comprise a nanomagnetic core whose surface is dressed with bio-friendly molecules, the later meant to provide the core with multifunctionality [6]. Besides that, surface coating is also engineered to ensure the colloidal stability of IONs in suspension at pH and ionic strength of physiological media. Lastly, surface coatings should also be designed to suppress quick uptake by the reticuloendothelial system while delivered into the blood stream [7-9]. Thus, ION surface functionalization protocols are a key step for a successful technological and biomedical applications of IONs [10-13]. As it is well-known, high-resolution magnetic resonance imaging can be accomplished by magnetically tagging tumor cells with ION-based materials [14, 15]. Additionally, chemotherapeutic agents [16] can be attached onto surface-functionalized IONs, which can thus enable specific targeting and delivery by either applying magnetic field gradients following injection into the blood circulation near the tumor site or via biological recognition using bioactive molecules attached onto the IONs' surface [17-19]. Consequently, to foster IONs' bio-inspired technologies it is of high interest to improve surface coating protocols that can support further development of nanomaterials platforms for diagnostic and/or drug delivering. Polymers are commonly used as a coating to improve the biocompatibility, stability and bioavailability of the IONs. As an example, superparamagnetic IONs coated with PVA showed no cytotoxicity when compared to uncoated IONs [20]. Dextran coated IONs were stable in various biological media up to 8 days [21]. Moreover, a glycosaminoglycan, hyaluronic highly selective for human hepatocellular liver carcinoma cells [22]. Another glycosaminoglycan of interest is chondroitin sulfate.

Chondroitin sulfate (ChS) is a glycosaminoglycan with a polymeric chain that consists of 1:1 disaccharide units of 1,4-D-glucuronic acid and 1,3-N-acetyl galactosamine sulfate at either the 4- (4-ChS) or 6-position (6-ChS) of the N-acetyl galactosamine subunit. Usually, ChS exhibits molecular weight in the range of  $20\text{--}50 \times 10^3 \text{ g}\times\text{mol}^{-1}$  [23-25] and it is synthesized in the intracellular environment from glucose or glucosamine precursors [26] and can be secreted in cartilage by chondrocytes as a macromolecular complex into the extracellular matrix (ECM) or else remains localized at the cell surface. Moreover, the secreted ChS can bind to a core

protein to produce highly absorbent proteoglycans, which is a major structure inside cartilage and acts as shock absorber. ChS and glucosamine have been introduced as “nutraceutical agents” for treatment of osteoarthritis [27]. Importantly, investigations have shown that ChS exhibits anti-inflammatory and immunomodulatory effects [28], chondroprotective activity [29] and accounts for cell adhesion regulation [23]. These properties have promoted ChS as a promising for the development of biomaterial for cartilage regeneration [30] and tissue engineering [31]. ChS has been associated with inorganic nanoparticles aiming at stabilization of the latter, as reductant agent and as drug delivery system. For instance, metal iron and gold nanoparticles were successfully produced with ChS acting as both reductant and stabilizing agent [32, 33]. ChS-coated ION have been produced for manifold purposes, for example in the investigation of redox reactions of nitrite ions at the nanoparticles’ surface [34], for preparation of hollow microspheres [35], in studies on colloidal stability in a wide range of pHs and salt concentrations [36], and for controlled delivery of doxorubicin hydrochloride [16]. More recently, polymeric nanoparticles were studied, like ChS self-assembled nanoparticles loaded with docetaxel (DTX), which improved DTX biodistribution and decreased metastasis-promotion protein expression of melanoma [37]. ChS can also be used to produce hydrogels containing specific drugs, like loxoprofen loaded hydrogels with improved release [38].

In the human body, chondrocytes have an important role in cartilage maintenance. Due to the limited proliferation potential of chondrocytes and their catabolic response to pathological mediators, cartilage can only spontaneously repairing small damages. Additionally, the avascular nature of cartilage prevents immigration of regenerative cells [30] to the affected site. In this regard, ChS can be prescribed as part of the medical treatment although its efficacy should depend on the route of administration. In the present study, we report on a simple and effective method of synthesis to obtain a biocompatible ChS-coated ION carrier for ChS site delivery. The as-fabricated ChS-nanocarrier represents a step forward in the delivery of ChS to damaged cartilage once it is designed for intra-articular injection, aiming the effective interiorization by the chondrocytes. Moreover, its effectiveness should be enhanced by application of an external gradient of magnetic field, thus improving site-localization. The synthesis protocol of the new ChS-nanocarrier consists on aqueous co-precipitation of ION in the presence of ChS (ION@ChS). In fact, the covalent interaction between ION and ChS that prevails in the ION@ChS sample is reflected in its superior colloidal stability at physiological conditions. Dynamic light scattering, transmission electron microscopy, Raman, Fourier

transform infrared and x-ray photoelectron spectroscopies and magnetic measurements were carried out for structural characterization of bare and ChS-functionalized IONs samples. In vitro cytotoxicity of ChS-coated ION carriers against human dental pulp fibroblast cells was assessed by the MTT assay.

## 2 MATERIALS AND METHODS

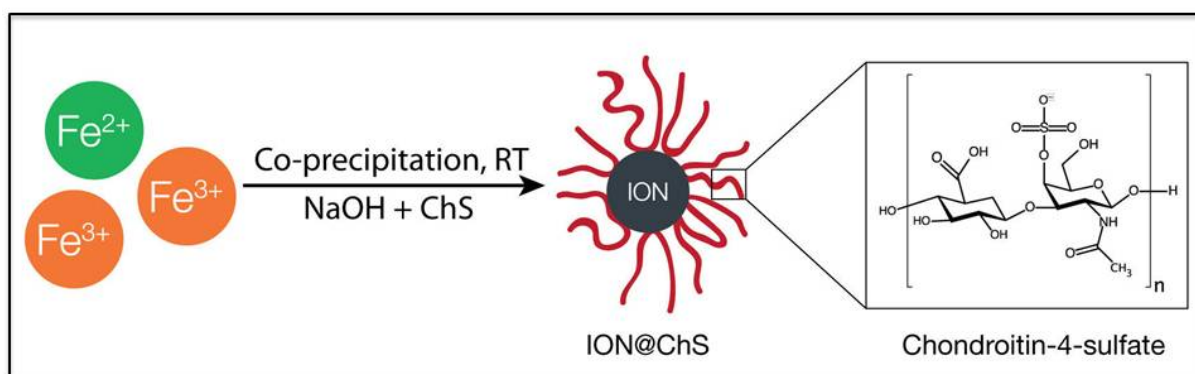
### 2.1 Materials

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , NaOH, HCl, chondroitin-4-sulfate (ChS) extracted from bovine trachea, Prussian blue and Nuclear Fast Red were all purchased from Sigma Aldrich (USA) and used as received. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PBS and MTT were acquired from Gibco Life Technologies Inc. (USA). All water used for synthesis and suspension preparations was provided by a Milli-Q water purification system (water resistivity:  $18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}^{-1}$ ).

### 2.2 Synthesis of colloidal samples

Samples were produced by precipitation of IONs from a mixture of 1:2  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$  ions with aqueous solution of NaOH at room temperature (bare ION employed as control sample) or in the presence of ChS (sample ION@ChS). The employed route is schematically illustrated in Scheme 1. Actually, the protocol for synthesizing the IONs is the same as the one described by Kang et al. [39] and reproduced elsewhere [40, 41]. In short,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (25 mL,  $0.30 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) and  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (25 mL,  $0.60 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) aqueous solutions were mixed and slowly added to 150 mL of NaOH ( $2.0 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) and kept under mechanical stirring (2,000 rpm), at room temperature, for extra 30 min. A black precipitate (solid magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  or simply ION) obtained at the end was isolated by centrifugation and washed several times with ultrapure water. A stock aqueous suspension of positively-charged ION (sample ION) was produced by dispersing the as-produced IONs into aqueous solution of perchloric acid ( $0.25 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) with mechanical stirring overnight. The suspension was then centrifuged for elimination of aggregates and adjusted to pH3 with perchloric acid solution, being from now on considered as control sample. The acidic medium provides protonation of the IONs' surface sites [42] and the resulting colloid is stabilized by repulsive electrostatic interaction. For preparation of the ION@ChS sample, an identical 1:2  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$  solution was prepared and mixed with ChS ( $0.1 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ), producing a clear solution after gentle magnetic stirring. Next, the as-prepared solution ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  plus ChS) was slowly added to 750 mL of NaOH ( $1.5 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ , pH 13) under mechanical stirring and kept under stirring for extra 30 min, at room temperature. The ION@ChS black precipitate was washed 3 times with ultrapure water and then suspended in

ultrapure water (pH=5.5) using overnight mechanical stirring. The resulting colloid (magnetic fluid sample) was then centrifuged (4,000 RPM, 10 minutes) to remove aggregates. The resulting ION@ChS colloidal suspension was dialyzed against ultrapure water for 24 h. The dialyzed suspension was adjusted to pH 7.2. The final ION@ChS colloid changed color from black to dark brown after the dialysis step, suggesting partial oxidation of the as-precipitated IONs, from magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) to maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Colloidal stability of the ION@ChS suspension in biological medium (DMEM at 1:4 v/v) was monitored by visual inspection at room temperature for 24, 48 and 72 h after sample preparation. A small aliquot of each colloidal sample, i.e. ION and ION@ChS, was freeze-dried for 3 days in a vacuum chamber for further structural characterization in its solid, powder form. Dried samples were labeled s-ION and s-ION@ChS.



Scheme 1 – Illustration of the synthesis processes employed to produce the ION@ChS sample.

### 2.3 Sample morphology and structural characterization

Morphology, mean diameter size (DTEM) and polydispersity index ( $\sigma$ ) of the as-produced ION-based structures were assessed using transmission electron microscopy (TEM) images recorded in a JEOL JEM-1011 system. Additionally, mean hydrodynamic diameter (DH) and zeta potential ( $\zeta$  potential) of colloidal samples (ION and ION@ChS) were determined by Dynamic Light Scattering and electrophoretic mobility measurements using a Nano ZetaSizer Z90 instrument from Malvern. Structural features of dried samples (s-ION and s-ION@ChS) were assessed by micro Raman, Fourier transform-infrared (FT-IR) and x-ray photoelectron (XPS) spectroscopies. The employed micro Raman system was a commercial triple spectrometer (Horiba Scientific) equipped with a liquid N<sub>2</sub> cooled CCD detector. Spectra

were recorded at room temperature while exciting the samples with an Argon ion laser ( $\lambda = 514$  nm) operating at 0.25 mW. FT-IR measurements were carried out in a Vertex 70 spectrometer (Bruker Corporation, USA) in transmittance mode with samples dispersed in KBr pellets. Spectra were recorded in the range of 500 to 1800  $\text{cm}^{-1}$  using the system's resolution set at 4  $\text{cm}^{-1}$  while performing 128 scans. XPS data were collected in a SPECS SAGE HR 100 system equipped with an AlK $\alpha$  source (non-monochromatic, operating at 12.5 kV and 300 W) and take-off angle of 90° with pressure set at  $\sim 10^{-8}$  Torr. Energy shift in the spectra was corrected by the C(1s) energy line at 284.7 eV. Detailed spectra for O(1s) and S(2p) was recorded with pass energy of 10 eV.

Room temperature magnetization measurements (field-dependent) of the samples were carried out in a Quantum Design vibrating sample magnetometer connected to an Evercool physical property measurement system. The contribution of ChS in the ION@ChS weight was removed out by measuring its content via thermogravimetric analysis (TGA), as described elsewhere [11]. TGA was also used to extract the ChS content in colloidal samples used in the biological assay. TGA curves (not shown) of powdered samples ( $\sim 5$  mg) were acquired from 25 to 500 °C at heating rate of 10 °C  $\text{min}^{-1}$  with a DTG-60H Shimadzu thermo-analyzer under nitrogen atmosphere (30  $\text{mL} \times \text{min}^{-1}$ ).

#### 2.4 In vitro cytotoxicity assay

Human connective tissue cells harvested from dental pulp of normal teeth were maintained in primary culture [43]. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Life Technologies, USA) and 100  $\text{U} \times \text{mL}^{-1}$  penicillin plus 100  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  streptomycin (Gibco Life Technologies Inc., USA) in an incubator with 5%  $\text{CO}_2$  and 80% humidity at 37 °C. The cytotoxicity assay was conducted with cells seeded at  $3 \times 10^3$  cells/well in flat-bottomed 96-well plates for 24 h. The medium was renewed and ChS solutions (0.0125% and 0.0250%, w/v) or colloidal ION@ChS (at same concentration of ChS) were added. Plates were incubated at 37 °C for 24, 48, and 72 h. Toxicity was determined by removing residual solutions, following PBS rinsing and culture medium reestablishment. Cytotoxicity was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay with cells incubated at different elapsed times. Cells were maintained with DMEM and MTT (5  $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$ , dissolved in PBS), and incubated at 37 °C in a  $\text{CO}_2$  incubator for 2 h. The resulting solution was carefully removed and 100  $\mu\text{L}$  of dimethyl

sulfoxide was added in order to solubilize the as-produced violet formazan crystals. The solution's absorbance at 595 nm was measured in a 96-well spectrophotometer microplate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA). The recorded data were normalized to the control data (cells treated with PBS only). Statistical analysis (ANOVA two-way,  $p < 0.05$ ) was performed using the GraphPad Prism 5 software.

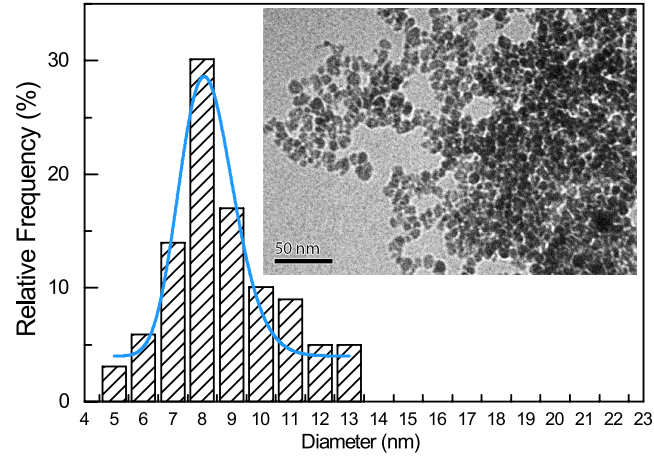


### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Characterization of the colloidal samples

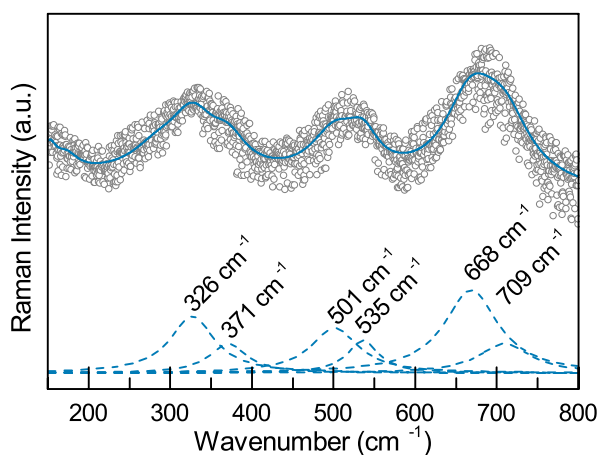
The ChS coating onto the IONs' surface in the as-prepared colloidal suspension was confirmed by measuring the  $\zeta$  potential. The  $\zeta$  potential obtained for the stock acid ionic colloidal suspension (ION sample) was +19.7 mV, consistent with the positively charged surface originated from protonation of the hydroxyl surface groups [42, 44]. In addition, the  $\zeta$  potential of the ION@ChS was -56.8 mV, attributed to the presence of deprotonated carboxyl and sulfate groups from ChS. The impressively high negative  $\zeta$  potential value found in the ION@ChS explains its superior colloidal stability, typically achieved with  $\zeta$  potential higher than  $\pm 30$  mV. Moreover, the observed  $\zeta$  potential value is also consistent with the presence of ChS onto the IONs' surface. Recorded DH values were 50.7 nm and 105.7 nm for the ION and ION@ChS samples, respectively. Additionally, colloidal stability of the ION@ChS sample in biological media was evaluated aiming at fabrication of ChS-delivering nanocarriers. Colloidal stability of the as-prepared ION@ChS sample and its corresponding dilution in biological medium (1:4 proportion in DMEM) were assessed by visual inspection 0, 24, 48 and 72 h after preparation. The as-prepared ION@ChS sample was stable during the whole inspection time window (72 h). In contrast, the DMEM-dispersed ION@ChS sample was visually stable up to 48 h.

Morphology and diameter distribution of the ION@ChS sample were assessed by TEM. Fig. 1 shows the particle diameter histogram (vertical columns) and a typical TEM image (see inset). The TEM micrograph reveals mostly spherical nanoparticles with diameter distribution well-fitted by a log-normal distribution function (solid blue line), providing a mean particle diameter of  $D_{TEM} = 8.2 \pm 0.1$  nm and polydispersity index of  $\sigma = 0.11 \pm 0.01$  for the s-ION@ChS sample. From recorded TEM images (not shown) of the s-ION sample (control sample) the attained values of  $D_{TEM}$  and  $\sigma$  were  $7.0 \pm 0.1$  nm and  $0.27 \pm 0.01$ , respectively.



**Fig. 1.** Particle diameter distribution (vertical columns) curve-fitted with a log-normal distribution function (solid blue line) of the ION@ChS sample. The inset shows a typical TEM image (scale bar equals to 50 nm).

Fig. 2 displays the Raman spectrum of the s-ION@ChS sample at laser intensity of 0.25 mW. Lower laser power was used to avoid sample degradation under optical excitation [45]. Raman modes were identified in Fig. 2 (dashed blue lines) based on data available in the literature for the characteristic vibrational modes of the cubic spinel  $O_h^7$  (Fd3m space group:  $T_{2g}^1$  at  $193\text{ cm}^{-1}$ ,  $E_g$  at  $306\text{ cm}^{-1}$ ,  $T_{2g}^2$  in the range of  $450\text{-}490\text{ cm}^{-1}$ ,  $T_{2g}^3$  at  $538\text{ cm}^{-1}$ , and  $A_{1g}$  at  $668\text{ cm}^{-1}$ ), describing normal modes of magnetite Fe–O tetrahedron and bands around  $350$ ,  $500$  and  $700\text{ cm}^{-1}$  assigned to bulk maghemite [46]. The Raman fitting procedure employed Lorentzian-like components (dashed blue lines in Fig. 2) and reveals the presence of structures at  $326$ ,  $535$  and  $668\text{ cm}^{-1}$  (s-ION@ChS sample), which were assigned to magnetite vibrational modes. Moreover, small bands associated with maghemite phase can also be identified at  $371$ ,  $501$  and  $709\text{ cm}^{-1}$  (s-ION@ChS), which thus suggests that the IONs were partially oxidized and, therefore, they should be considered a mixture of magnetite and maghemite phases. The oxidation of IONs is expected once no care was taken to control oxygen during sample preparation.



**Fig. 2.** Raman spectrum (open symbols) of the s-ION@ChS sample with Ar<sup>+</sup> laser intensity set at 0.25 mW. Deconvoluted components are shown in dashed blue lines.

In order to confirm the presence of ChS and investigate the way it is likely attached onto the IONs' surface, FT-IR analyses of the ChS and ION@ChS samples were performed. Peaks in the FT-IR spectrum of the ChS sample observed in Fig. 3 were assigned according to the literature [47, 48]. For example, axial SO<sub>3</sub> stretching is found at 858 and 730 cm<sup>-1</sup>, while the shoulder centered at 987 cm<sup>-1</sup> is assigned to C–O–S stretching of the sulfate group present in carbon 4 of GalNAc [48]. The symmetrical and asymmetrical S=O stretching of sulfate group bonds are observed at 1065 and 1253 cm<sup>-1</sup>, respectively [47, 48]. Moreover, the symmetrical and asymmetrical stretching of the C–O–C bond are observed at 1035 cm<sup>-1</sup> [47] and 1124 cm<sup>-1</sup> [48], respectively. The vibrations regarding the carboxylate group are observed at 1418 and 1652 cm<sup>-1</sup>, being the former assigned to the symmetrical stretching [47] and the latter to the asymmetrical stretching [48]. The in-plane amide bending mode can be observed as a shoulder centered around 1568 cm<sup>-1</sup>[48]. The FT-IR spectrum of the s-ION@ChS sample (Fig. 3) is composed by the main bands found in the ChS sample, thus confirming the presence of ChS onto the IONs' surface. Moreover, the spectrum of the s-ION@ChS sample shows a systematic red-shift of most of the bands as well the intensity decrease of the symmetrical C=O stretching mode, which strongly suggests the interaction of the ChS molecule with the ION's surface via this functional group (Table 1). In particular, the remarkable band-shift of both the carboxylate asymmetrical stretching ( $\Delta\tilde{\nu}_a(\text{COO}^-) = -18 \text{ cm}^{-1}$ ) and the sulfate ( $\Delta\tilde{\nu}_s(\text{S=O}) = -11 \text{ cm}^{-1}$  and  $\Delta\tilde{\nu}_a(\text{S=O}) = +10 \text{ cm}^{-1}$ ) is possibly due to coordination of these two groups to iron(II) at the ION's surface [49]. Furthermore, the wide band at 580 cm<sup>-1</sup> is attributed to the Fe-O bond from the magnetite phase [50, 51].

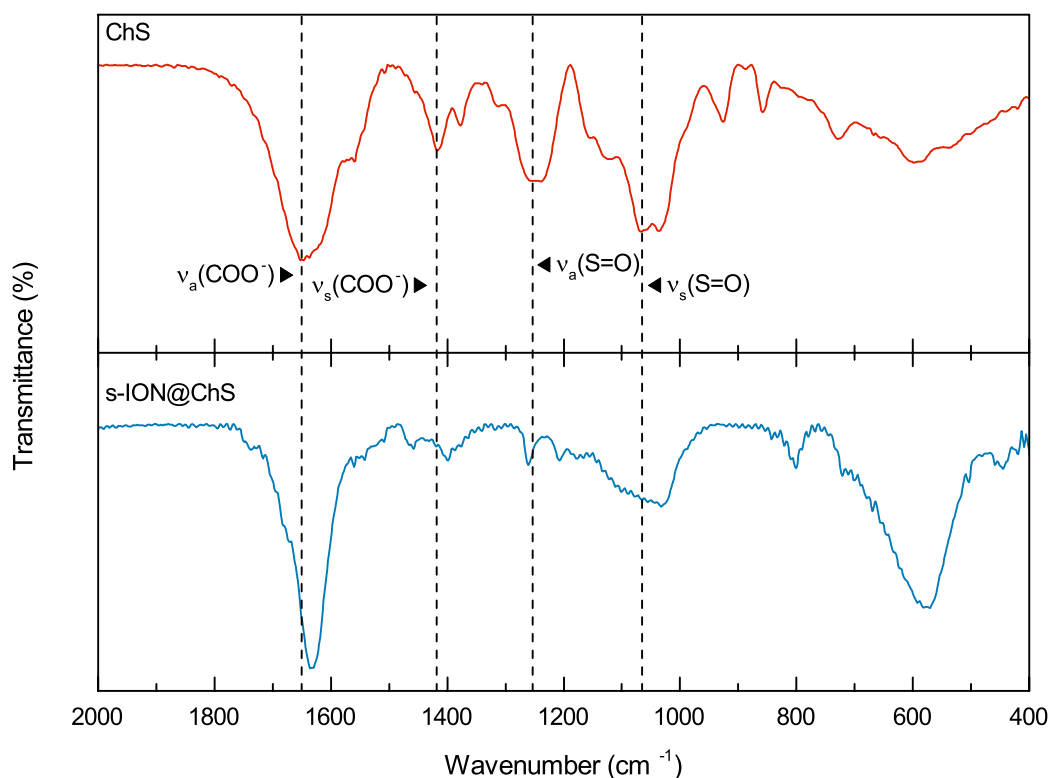
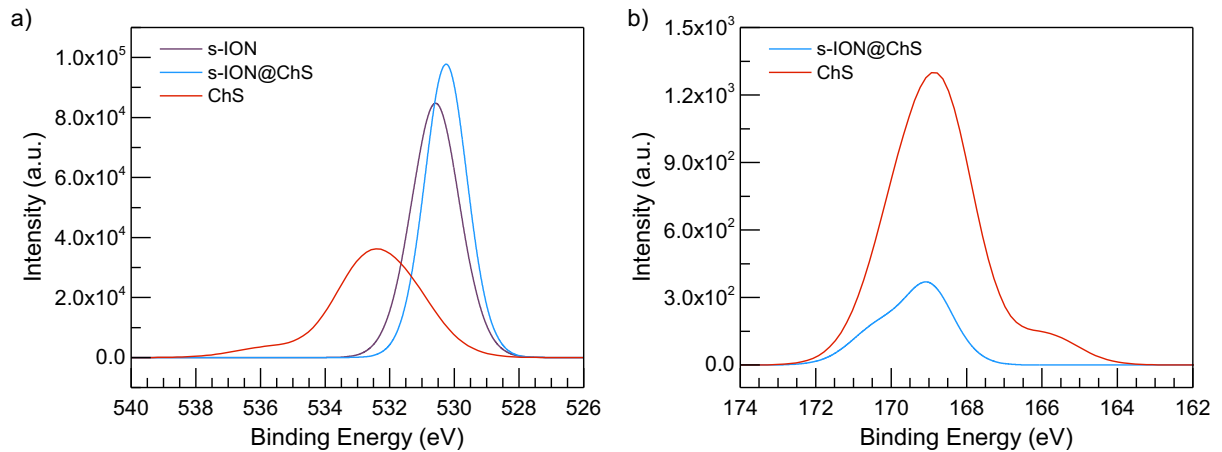


Fig. 3. FT-IR spectra of the ChS (upper panel) and s-ION@ChS (lower panel) samples. Vertical lines are guides for observation of peak positions based on ChS.

Table 1 – Selected FT-IR peaks (Fig. 3) of the ChS and s-ION@ChS samples with their respective assignments and peakshifts.

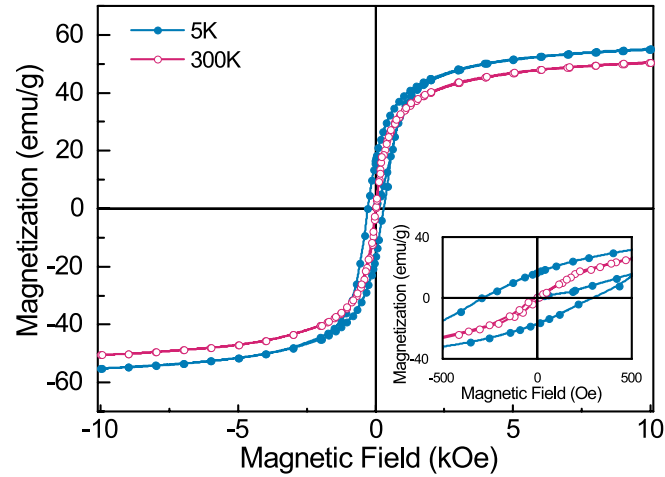
Sample	ChS	s-ION@ChS	
Assignment	$\tilde{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	$\tilde{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	$\Delta\tilde{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )
$\nu_{ax}(\text{SO}_3^-)$	730	714	-16
	858	806	-52
$\nu_s(\text{S}=\text{O})$	1079	1068	-11
$\nu_a(\text{S}=\text{O})$	1248	1258	+10
$\nu_s(\text{COO}^-)$	1418	1399	-19
$\nu_a(\text{COO}^-)$	1650	1632	-18

XPS analyses in the O(1s) and S(2p) regions were performed to further investigate the interaction between ChS and the IONs' surface (Fig. 4a). The Fe-O peak in both s-ION and s-ION@ChS samples is observed around 530 eV. Analysis of the S(2p) region (Fig. 4b), however, shows a metallic Fe(SO<sub>4</sub>) peak in the s-ION@ChS sample (169 eV). Moreover, in the C(1s) region, peaks assigned to C-O and C=O show a small shift to higher energy, when comparing the s-ION@ChS sample with the ChS molecule (data not shown). The presence of these peaks corroborates the FT-IR data and indicates coordination of the ChS sulfate group onto the ION's surface iron.



**Fig. 4.** XPS spectra in the (a) O(1s) region for the s-ION, s-ION@ChS and ChS samples and (b) S(2p) region in the s-ION@ChS and ChS samples.

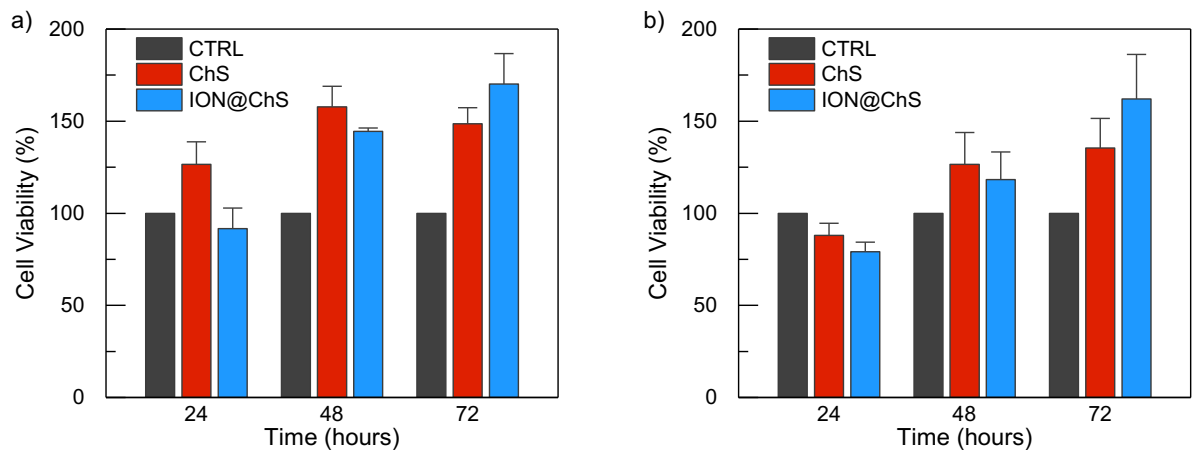
The magnetic behavior (magnetization versus applied field) of the s-ION@ChS sample was measured in the field range of  $\pm 10$  kOe, at 5 K and 300 K, as shown in Fig. 5. The inset of Fig. 5 shows the zoomed hysteresis loops in the  $\pm 0.5$  kOe window registered at 5 K and 300 K. It is worth noticing from the inset of Fig. 5 that the s-ION@ChS sample exhibits neither remnant magnetization (MR) nor coercivity (HC) at 300 K, as expected for IONs in the assessed size range (DTEM =  $8.2 \pm 0.1$  nm). The saturation magnetization (MS) was estimated by plotting the magnetization versus the reciprocal of the applied field [52]. The obtained values for MS were 58 emu/g (5 K) and 53 emu/g (300 K). Both MS values are smaller than that reported value for bulk maghemite at 4 K (MS = 85 emu/g), however, are greater than for superparamagnetic IONs of similar size coated with dextran [53, 54]. The decrease of the saturation magnetization is expected for nanosized magnetic materials, likely due to surface spin canting and disorder associated with broken bonds and frustration of long-range exchange interaction due to the lack of translational symmetry [55, 56].



**Fig. 5.** Magnetization versus magnetic field curve of s-ION@ChS at 5 K and 300 K. The inset shows a magnified window of the  $M \times H$  curves in the  $\pm 0.5$  kOe range, showing the superparamagnetic behavior at 300 K.

### 3.2 Cell viability test

The cell viability measured at 24, 48, and 72 h after incubation of cells with only PBS (control), pure ChS and colloidal ION@ChS at different ChS concentrations (0.0250 % and 0.0125 % (w/v)) are displayed in Fig. 6a and Fig. 6b, respectively. Despite no statistical significance ( $p < 0.05$ ) when compared with the control group, no cytotoxic effects were observed from the performed assay.



**Fig. 6.** Cell viability assay after 24, 48 and 72 h of treatment with ChS in concentration of (a) 0.0125% (w/v) and (b) 0.0250% (w/v).

## 4 CONCLUSION

We have shown the successful one-pot synthesis of biocompatible nanocarriers with room-temperature superparamagnetic properties comprising an iron oxide nanoparticle (ION) core, with mean diameter around 8 nm (diameter dispersity around 0.1), surface-functionalized with chondroitin sulfate (ChS). According to different spectroscopy techniques (FT-IR, Raman, and XPS) and complemented with zeta potential and dynamic light scattering measurements, the ION@ChS colloidal sample shows superior colloidal stability in physiological media. We claim that this is due the coordination of ChS onto the IONs' surface, which was possible while introducing the ChS molecule during alkaline coprecipitation of the iron (II and III) ions. Additionally, the ION@ChS exhibits typical room-temperature superparamagnetic behavior, showing neither hysteresis nor remanence, with relatively high saturation magnetization of 53 emu/g at 300 K (and 58 emu/g at 5 K). Moreover, in vitro assay shows that the ION@ChSs have no cytotoxic effect. In conclusion, the ION@ChS colloidal sample produced under the present synthetic route is highly promising for future biomedical applications as for instance in site-specific delivery of ChS in tissues and as a contrast agent in magnetic resonance imaging.

## Acknowledgments

The financial support from the Brazilian agencies MCT-CNPq, FINEP, FAP-DF, FINATEC and CAPES is gratefully acknowledged. Support from the FP7-PEOPLE-HIGRAPHEN project (612704) is also acknowledged. We are grateful to Dr. M. J. Araújo Sales, Instituto de Química - Universidade de Brasília, for her support with TGA measurements. Also, Dr. O. R. Pires Júnior, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, is acknowledged for his support with sample lyophilization.

## References

1. Yoo D, Lee J-H, Shin T-H, Cheon J. Theranostic magnetic nanoparticles. *Accounts of chemical research*. 2011;44(10):863-74.

2. Bonder MJ, Huang Y, Hadjipanayism GC. Magnetic Nanoparticles. In: Sellmyer DJ, Skomski R, editors. *Advanced Magnetic Nanostructures*. New York, NY: Springer; 2006. p. 183-206.
3. Trahms L. Biomedical applications of magnetic nanoparticles. In: Odenbach S, editor. *Colloidal Magnetic Fluids*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009. p. 328-58.
4. Soler MAG, Paterno LG. 6 - Magnetic Nanomaterials. In: Da Róz AL, Ferreira M, de Lima Leite F, Oliveira ON, editors. *Nanostructures: William Andrew Publishing*; 2017. p. 147-86.
5. Vassiliou JK, Mehrotra V, Russell MW, Giannelis EP, McMichael R, Shull R, et al. Magnetic and optical properties of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocrystals. *Journal of applied physics*. 1993;73(10):5109-16.
6. Guo X, Wu Z, Li W, Wang Z, Li Q, Kong F, et al. Appropriate Size of Magnetic Nanoparticles for Various Bioapplications in Cancer Diagnostics and Therapy. *ACS applied materials & interfaces*. 2016;8(5):3092-106.
7. Begin-Colin S, Felder-Flesch D. Strategies for functionalisation of magnetic nanoparticles for biological targets. In: Thanh NTK, editor. *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor & Francis Group; 2012. p. 151-91.
8. Soler MAG, Lima ECD, Nunes ES, Silva FLR, Oliveira AC, Azevedo RB, et al. Spectroscopic Study of Maghemite Nanoparticles Surface-Grafted with DMSA. *J Phys Chem A*. 2011;115(6):1003-8.
9. Galli M, Guerrini A, Cauteruccio S, Thakare P, Dova D, Orsini F, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized by peptide nucleic acids. *RSC Advances*. 2017;7(25):15500-12.
10. Ling D, Lee N, Hyeon T. Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications. *Accounts of chemical research*. 2015;48(5):1276-85.
11. Viali WR, Alcantara GB, Sartoratto PPC, Soler MAG, Mosiniewicz-Szablewska E, Andrzejewski B, et al. Investigation of the Molecular Surface Coating on the Stability of Insulating Magnetic Oils. *J Phys Chem C*. 2010;114(1):179-88.
12. Philip J, Laskar JM. Optical properties and applications of ferrofluids—a review. *Journal of nanofluids*. 2012;1(1):3-20.
13. Marradi M, Chiodo F, Garcia I, Penadés S. Glyconanoparticles as multifunctional and multimodal carbohydrate systems. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(11):4728-45.
14. Gao Z, Ma T, Zhao E, Docter D, Yang W, Stauber RH, et al. Small is smarter: nano MRI contrast agents—advantages and recent achievements. *Small*. 2016;12(5):556-76.
15. Wang J, Zhang B, Wang L, Wang M, Gao F. One-pot synthesis of water-soluble superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their MRI contrast effects in the mouse brains. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;48:416-23.
16. Mallick N, Anwar M, Asfer M, Mehdi SH, Rizvi MMA, Panda AK, et al. Chondroitin sulfate-capped super-paramagnetic iron oxide nanoparticles as potential carriers of doxorubicin hydrochloride. *Carbohydr Polym*. 2016;151:546-56.
17. Pankhurst Q, Thanh N, Jones S, Dobson J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2009;42(22):224001.
18. Hadjipanayis CG, Machaidze R, Kaluzova M, Wang L, Schuette AJ, Chen H, et al. EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. *Cancer research*. 2010;70(15):6303-12.



19. Korrapati PS, Karthikeyan K, Satish A, Krishnaswamy VR, Venugopal JR, Ramakrishna S. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;67:747-65.
20. Jalil WBF, Pentón-Madrigal A, Mello A, Carneiro FA, Soares RM, Baptista LS, et al. Low toxicity superparamagnetic magnetite nanoparticles: One-pot facile green synthesis for biological applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;78:457-66.
21. Wang F, Li X, Li W, Bai H, Gao Y, Ma J, et al. Dextran coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a near-infrared laser-driven photothermal agent for efficient ablation of cancer cells in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;90:46-56.
22. Yang R-M, Fu C-P, Li N-N, Wang L, Xu X-D, Yang D-Y, et al. Glycosaminoglycan-targeted iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of liver carcinoma. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;45:556-63.
23. Bishnoi M, Jain A, Hurkat P, Jain SK. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. *Glycoconjugate journal*. 2016;33(5):693-705.
24. Fajardo AR, Guerry A, Britta EA, Nakamura CV, Muniz EC, Borsali R, et al. Sulfated glycosaminoglycan-based block copolymer: preparation of biocompatible chondroitin sulfate-b-poly (lactic acid) micelles. *Biomacromolecules*. 2014;15(7):2691-700.
25. da Cunha AL, de Oliveira LG, Maia LF, de Oliveira LFC, Michelacci YM, de Aguiar JAK. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate: Structural analysis and identification of contaminants in different commercial preparations. *Carbohyd Polym*. 2015;134:300-8.
26. Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013;1830(10):4719-33.
27. Reginster J-Y, Gillot V, Bruyere O, Henrotin Y. Evidence of nutraceutical effectiveness in the treatment of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2000;2(6):472-7.
28. du Souich P, García AG, Vergés J, Montell E. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(8a):1451-63.
29. Kubo M, Ando K, Mimura T, Matsusue Y, Mori K. Chondroitin sulfate for the treatment of hip and knee osteoarthritis: current status and future trends. *Life sciences*. 2009;85(13):477-83.
30. Muzzarelli RA, Greco F, Busilacchi A, Sollazzo V, Gigante A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohyd Polym*. 2012;89(3):723-39.
31. Lee C-T, Kung P-H, Lee Y-D. Preparation of poly (vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. *Carbohyd Polym*. 2005;61(3):348-54.
32. Cheng K-M, Hung Y-W, Chen C-C, Liu C-C, Young J-J. Green synthesis of chondroitin sulfate-capped silver nanoparticles: characterization and surface modification. *Carbohyd Polym*. 2014;110:195-202.
33. Cho H-J, Oh J, Choo M-K, Ha J-I, Park Y, Maeng H-J. Chondroitin sulfate-capped gold nanoparticles for the oral delivery of insulin. *International journal of biological macromolecules*. 2014;63:15-20.
34. Aoyagi M, Sato H, Yagi K, Fukuda N, Nishimoto S. Redox reactions of nitrite ions on the surface of colloidal magnetite particles coated with chondroitin sulfate. *Colloid & Polymer Science*. 2001;279(1):46-52.
35. Guilherme MR, Reis AV, Alves BRV, Kunita MH, Rubira AF, Tambourgi EB. Smart hollow microspheres of chondroitin sulfate conjugates and magnetite nanoparticles for magnetic vector. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010;352(1):107-13.

36. Tóth IY, Illés E, Szekeres M, Tombácz E. Preparation and characterization of chondroitin-sulfate-A-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications. *J Magn Magn Mater.* 2015;380:168-74.
37. Liu M, Du H, Khan AR, Ji J, Yu A, Zhai G. Redox/enzyme sensitive chondroitin sulfate-based self-assembled nanoparticles loading docetaxel for the inhibition of metastasis and growth of melanoma. *Carbohydr Polym.* 2018;184:82-93.
38. Khalid I, Ahmad M, Usman Minhas M, Barkat K. Synthesis and evaluation of chondroitin sulfate based hydrogels of loxoprofen with adjustable properties as controlled release carriers. *Carbohydr Polym.* 2018;181:1169-79.
39. Kang YS, Risbud S, Rabolt JF, Stroeve P. Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Particles. *Chemistry of Materials.* 1996;8(9):2209-11.
40. Santos JGM, Souza JR, Letti CJ, Soler MAG, Morais PC, Pereira-da-Silva MA, et al. Iron Oxide Nanostructured Electrodes for Detection of Copper(II) Ions. *J Nanosci Nanotechno.* 2014;14(9):6614-23.
41. Letti CJ, Paterno LG, Pereira-da-Silva MA, Morais PC, Soler MAG. The role of polymer films on the oxidation of magnetite nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry.* 2017;246:57-64.
42. Qu F, Morais PC. An oxide semiconductor nanoparticle in an aqueous medium: A surface charge density investigation. *The Journal of Physical Chemistry B.* 2000;104(22):5232-6.
43. Pereira LO, Longo JP, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol.* 2012;57(8):1079-85.
44. Bacri J-C, Perzynski R, Salin D, Cabuil V, Massart R. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. *J Magn Magn Mater.* 1990;85(1-3):27-32.
45. da Silva SW, Melo TFO, Soler MAG, Lima ECD, da Silva AF, Morais PC. Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: A Raman spectroscopy investigation. *Ieee T Magn.* 2003;39(5):2645-7.
46. Soler MG, Qu F. Raman Spectroscopy of Iron Oxide Nanoparticles. In: Kumar CSR, editor. *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization: Springer Berlin Heidelberg*; 2012. p. 379-416.
47. Mainreck N, Brézillon S, Sockalingum GD, Maquart F-X, Manfait M, Wegrowski Y. Rapid characterization of glycosaminoglycans using a combined approach by infrared and Raman microspectroscopies. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2011;100(2):441-50.
48. Almodovar J, Place LW, Gogolski J, Erickson K, Kipper MJ. Layer-by-layer assembly of polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers: a spectroscopic study of hydrophilicity, composition, and ion pairing. *Biomacromolecules.* 2011;12(7):2755-65.
49. Deacon GB, Phillips RJ. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylate complexes and the type of carboxylate coordination. *Coordination Chemistry Reviews.* 1980;33(3):227-50.
50. Eloiza SN, Emilia CDL, Maria AGS, Fabio RLS, Ricardo BA, Paulo CM. Evidence of iron (III) reduction in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles due to meso-2,3-dimercaptosuccinic acid functionalization. *Materials Research Express.* 2014;1(1):016107.
51. Tulebayeva DZ, Kozlovskiy AL, Korolkov IV, Gorin YG, Kazantsev AV, Abylgazina L, et al. Modification of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with carboranes. *Materials Research Express.* 2018;5(10):105011.
52. Franklin AD, Berkowitz AE. The Approach to Saturation in Dilute Ferromagnetics. *Physical Review.* 1953;89(6):1171.

53. Shaterabadi Z, Nabiyouni G, Soleymani M. High impact of in situ dextran coating on biocompatibility, stability and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;75:947-56.
54. Wei C, Xiaonan L, Wei W, Guangfu Y. Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanorings for protein adsorption and detection. *Materials Research Express*. 2018;5(12):125402.
55. Tung L, Kolesnichenko V, Caruntu D, Chou N, O'connor C, Spinu L. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles. *J Appl Phys*. 2003;93(10):7486-8.
56. Shafi KV, Gedanken A, Prozorov R. Sonochemical preparation and characterization of nanosized amorphous Co–Ni alloy powders. *Journal of Materials Chemistry*. 1998;8(3):769-73.

## 4.2 Nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com glucosamina

As nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com glucosamina foram sintetizadas por meio de um procedimento passo-a-passo envolvendo o uso de ácido cítrico e a conjugação da glucosamina por meio da reação de EDC/NHS. Primeiramente, as nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por meio do método de coprecipitação em meio alcalino. Em seguida, o ácido cítrico foi adsorvido na superfície das nanopartículas por meio da adição sob agitação de uma solução de ácido cítrico em pH 5,5. Este fluido foi submetido à reação de EDC/NHS para a ativação dos grupos carboxilato na superfície das nanopartículas. Por último, a adição de glucosamina ao fluido proporcionou a ancoragem dessa às nanopartículas. A funcionalização com glucosamina foi possível pela adsorção do ácido cítrico na superfície das nanopartículas, resultando em um fluido magnético estável em condições fisiológicas (pH 7,2) e nanopartículas revestidas com grupos carboxílicos disponíveis para a ancoragem da glucosamina em uma segunda etapa pela reação de EDC/NHS, formando uma amida entre o carboxilato e a amina primária da glucosamina. As espectroscopias Raman e no infravermelho proporcionaram dados para afirmar que houve a ancoragem da glucosamina por meio da amida com o citrato, que, por sua vez, encontra-se coordenado de forma monodentada à superfície da nanopartícula. O carregamento de glucosamina, obtido por termogravimetria, foi de cerca de 1,4 mmol de glucosamina por grama de ION, o que é compatível com outras vias sintéticas disponíveis na literatura e suficiente para assegurar a biocompatibilidade com células humanas saudáveis. Ainda, foi constatado o comportamento superparamagnético em temperatura ambiente. Embora a captação celular de glucosamina livre seja maior que a observada nas nanopartículas funcionalizadas, para estas, a ligação amida entre a glucosamina e o citrato na superfície da nanopartícula tem que ser quebrada após a interiorização para liberar as moléculas de glucosamina e gradualmente aumentar seus níveis no citoplasma. Portanto, as nanopartículas funcionalizadas com glucosamina possuem uma certa modulação de liberação de glucosamina, o que as tornam uma potencial plataforma nanocarreadora de glucosamina.

## \Synthesis of stable and biocompatible glucosamine-iron oxide superparamagnetic nanocolloids

Luis M. R. Rivera<sup>a,b</sup>, Julhyana G. Machado<sup>a,b</sup>, Mohan Chandra Mathpal<sup>a</sup>, Natalia L. Chaves<sup>b</sup>,  
Sônia N. Bão<sup>b</sup>, Ricardo B. Azevedo<sup>b</sup>, Leonardo G. Paterno<sup>c</sup>, Maria A. G. Soler<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil

\*Corresponding author. E-mail: [soler@unb.br](mailto:soler@unb.br)

### Abstract

Herein, we report a step-by-step synthetic route capable of producing superparamagnetic, stable and biocompatible nanocolloids, composed by iron oxide nanoparticles (ION, ~6 nm) surface-functionalized with glucosamine (ION-GLU) dispersed in physiological media (pH 7.2). The route consists first on the preparation of ION by aqueous alkaline coprecipitation of 1:2, Fe(II)/Fe(III) followed by surface treatment with citric acid, activation of acidic groups via carbodiimide intermediary and further amidation using GLU as the amine reactant. All the steps were monitored by FT-IR and Raman spectroscopies by which the identity of each molecular moiety could be solidly confirmed. The morphology, colloidal stability and superparamagnetic behavior were properly addressed by transmission electron microscopy, dynamic light scattering, zeta potential and room temperature magnetization measurements. Cell viability tests performed with human dental pulp tissue cells suggest that ION-GLU nanocolloids are biocompatible and non-toxic for two different concentrations and several hours of incubation (up to 72h). Moreover, optical microscopy shows that ION-GLU adsorb at the cells walls and also transpose them, reaching cytoplasm and nucleus as well. All findings point out the promising use of ION-GLU as biocompatible nanocarriers for GLU delivery in articulation diseases.

**Keywords:** iron oxide nanoparticle, functionalization, glucosamine, magnetic fluid, superparamagnetism.

## 1 INTRODUCTION

Glucosamine (GLU) is a glycosaminoglycan and key for the synthesis of hyaluronic acid and chondroitin sulfate, which, together with the collagen fibers, are the main compounds of the cartilage extracellular matrix (ECM) and the synovial fluid [1-3]. It has been used in therapy, as it normalizes the metabolism of the cartilage and inhibits glycosaminoglycan degradation. Furthermore, it displays an important anti-inflammatory action, suppressing inflammatory cells, cytokines, and molecules, such as the p38 MAPK, involved in the activation of inflammatory mediators. GLU also stimulates the synthesis of proteoglycans by chondrocytes, inhibits the action of catabolic enzymes and reduces IL-1 $\beta$  levels in synovial fluid [4]. Due to these pharmaceutical properties, GLU has been used to the treatment of osteoarthritis (OA) [5]. OA is a chronic, progressive and degenerative joint disease that is particularly common in weight bearing joints and is considered a public health problem [5, 6].

The articulate cartilage has the function of absorbing impacts, minimizing stress in the subchondral bones and reducing the friction between them. It is able to undergo deformation and to return to its original state and also presents a low rate of metabolic activity. Nonetheless, it has none or a very small number of blood vessels, which hamper further drug absorption and reduces the efficacy of OA treatments. Even so, chondroitin sulfate and GLU are usually prescribed by oral administration, showing low biodistribution and poor access to the target tissue (cartilage) [7,8]. Studies have shown that about 10 % of the GLU administered intravenously were found in its free form in the plasma and were rapidly metabolized by the liver and excreted in the urine. The remaining 90% were found in the plasma proteins and approximately 8 hours after were diffused through the kidneys and liver [9]. Different nanomaterials can be engineered to complex or conjugate with GLU in order to improve its availability in biological media. In particular, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (ION) display unique properties for this task, such as biocompatibility, controllable surface chemistry and specificity, and response to an external magnetic field [10-13]. Moreover, ION can be conjugated with proteins, nucleotides, glycosaminoglycans, peptides, vitamins, antibiotics, antibodies, fluorescence dyes, genes, chemotherapy drugs [14-19]; or acting as functional building blocks in bottom up assemblies [20-26] enabling them to a large range of applications [27-32]. Nanocomposites comprising iron oxide nanoparticles functionalized with glucosamine (ION-GLU) should form a robust platform for the delivery of GLU since ION are

chemical and mechanical stable and the superparamagnetic response can be used for delivery of GLU for example. The main challenge in this study should be the proper attachment of GLU to the ION surface. The present contribution addresses this issue by proposing a synthetic route for the preparation of ION-GLU nanocolloids displaying high stability, biocompatibility and superparamagnetic behavior. ION were first synthesized by the simple co-precipitation method and subsequently conjugated with glucosamine chloride (GLU) via the crosslinking reaction with N-hydroxysuccinimide (NHS)/1-ethyl-3-[3dimethylaminopropyl] carboxidiimide (ECD) (NHS/EDC). The functionalization of ION with GLU is supported by Raman and Fourier transform infrared spectroscopies, dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and thermogravimetric analysis. Transmission electron microscopy images and magnetic measurements were also performed. The biocompatibility and cellular internalization of ION-GLU were confirmed by *in vitro* cytotoxicity assay and light microscopy imaging performed with human dental pulp fibroblast cells.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

Iron(II) chloride tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), perchloric acid ( $\text{HClO}_4$ ), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), citric acid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) and glucosamine hydrochloride (GLU) were purchased from Sigma Aldrich (Missouri, USA) and used directly without further processing. Cellulose membrane dialyses were acquired from InLab (São Paulo, Brazil), while 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filters were obtained from KASVI (Paraná, Brazil). The water used in all the experimental procedures was of ultrapure type (resistivity: 18  $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) and supplied by Milli-Pore Milli-Q water purification system.

### 2.2 Synthesis of ION-GLU nanocolloids

ION were synthesized by the co-precipitation method following a protocol reported in the literature with minor modifications [26]. Initially, a 50 mL mixed solution of Fe(II)/Fe(III) at 1:2 mol ratio was prepared in ultrapure water assisted by simple magnetic stirring. This solution was then added, drop-wise, into a beaker containing 100 mL of NaOH 0.5 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 12) under intense magnetic stirring and room temperature (25°C). The dark precipitates of iron oxides were seen since from the very first drops. The reaction mixture remained under magnetic stirring for more 30 minutes. Stirring was stopped afterwards, and the precipitate of magnetite nanoparticles was separated by decantation assisted by a magnet. The supernatant was removed and nanoparticles underwent two sequences of washing with ultrapure water and decantation as described above. Part of the nanoparticles was dispersed in perchloric acid solution at pH 3.0, producing a stable ionic magnetic fluid named ION and used as a control sample. This nanocolloid is positively-charged because of protonation of oxyhydroxy ION surface groups at acidic pH [33]. The remaining ION aliquot was dispersed by magnetic stirring (1 h) in 20 mL of a 50 mM (pH 5.5) citric acid solution in order to functionalize them with citrate groups. This suspension was then dialyzed against deionized water overnight to remove the free citrate. The resulting magnetic fluid was named as ION-CIT. Both ION and ION-CIT nanocolloids were stored at 4 °C. The concentrations of nanocolloids (in  $\text{g L}^{-1}$  of ION) were determined by gravimetric analysis.



GLU was conjugated to ION-CIT by EDC/NHS cross-linking chemistry following the methodology reported by Veerapadian et al. [34] for silver nanoparticles, with minor modifications. In a 150 mL beaker, 50 mL of ION-CIT were mixed with NHS (50 mmol) and EDC (200 mmol), both previously dissolved in a 50 mL pH 7.2 10 mmol L<sup>-1</sup> PBS and 0.2 g L<sup>-1</sup> Tween 20 solution. The mixture pH was stabilized on 7.2 and left under magnetic stirring for 1 h. To this magnetic fluid, 5 mL of GLU (10 mmol L<sup>-1</sup>, also in PBS/Tween 20 as described before) were added at once and the mixture left under constant magnetic stirring for 3 hours. The product, ION-GLU nanocolloid, was then dialyzed for 24 hours against ultrapure water. An aliquot of each nanocolloid sample (ION, ION-CIT and ION-GLU) was lyophilized for 6 hours in a SpeedVac Concentrator (SPD121P, with refrigerated vapor trap, RVT400, Savant) to produce solid samples.

### 2.3 Characterization of glucosamine and synthesized nanoparticles

The structural features of GLU (powder form) and dried ION, ION-CIT and ION-GLU samples were first characterized by Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Raman spectroscopy, as well as by thermogravimetric analysis (TGA). The FT-IR spectra were recorded with a Vertex 70 FTIR spectrometer (Bruker Corporation, USA) in transmission mode, in the range 500-1800 cm<sup>-1</sup>, resolution 4 cm<sup>-1</sup> and 32 scans. Samples were measured dispersed in KBr pellets. Raman spectroscopy was performed with a micro-Raman configuration in a triple spectrometer (T64000, Horiba Scientific, Japan) using the argon ion laser of wavelength 514.5 nm (Innova 90C, Coherent Inc., USA). Spectra were recorded in the range 150-1800 cm<sup>-1</sup> at room temperature. The detection was taken in a backscattering geometry mode with a spectral resolution of about ±0.5 cm<sup>-1</sup> with total accumulation time of 1200 seconds. A 50x objective lens was employed to focus the laser beam on a sample's spot, about 1.5 μm in diameter. The laser intensity was fixed in 0.25 mW in order to avoid any possible sample degradation due to laser annealing [35, 36]. Thermogravimetric analysis (TGA) curves were registered with DTG-60H (Shimadzu Corporation, Japan) system from 25 to 500 °C with a heating rate of 10 °C/min in N<sub>2</sub> atmosphere with a flux rate of 30 mL/min in a aluminum sample holder.

The morphology and mean diameter of the nanoparticles in the nanocolloid samples were first determined by TEM using a JEOL JEM-1011 TEM microscope operated at 80 keV. The hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) and (zeta)  $\zeta$  potential were further determined by dynamic

light scattering (DLS) and electrophoretic mobility, respectively, in a Zetasizer Nano Z90 (Malvern Instruments, UK).

Magnetization measurements were performed on dried ION-GLU sample with the Physical Property Measurement System (PPMS) Model 6000 from Quantum Design (California, USA). The magnetization versus magnetic field curve was recorded by ramping the field from 0 to 90 kOe at 300 K. The non-magnetic mass (citrate and glucosamine) determined from TGA data was subtracted from the total mass of the samples for calculation of the magnetization.

#### 2.4 Cell uptake and viability tests

Human connective tissue cells harvested from dental pulp of normal teeth were maintained in primary culture [37]. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Life Technologies, USA) and 100 U/mL penicillin plus 100 µg/mL streptomycin (Gibco Life Technologies Inc., USA) in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 80% humidity at 37 °C. The uptake of ION-GLU by the cells was observed using Prussian blue staining. Cells were cultured in 24-well plates for 24 hours in a 10x10<sup>3</sup> cells/well density, then, the adherent cells were incubated for 24 h with the sample with a 0.250 mg/mL GLU concentration. After incubation, cells were washed with PBS and transferred to a new 24-well plate and cultured for 24h. Next, the cells were washed with PBS, fixed with acetone for 10 min at room temperature, washed again with PBS and then stained with a freshly prepared 2% Prussian blue solution in a 1 mol/L HCl solution for 10 min at room temperature, resulting in formation of a deep blue color typical of Prussian blue assay. After staining, the cells were washed, and their nuclei stained with nuclear fast red solution. Finally, the cells were washed once more and visualized with the Axioscop II microscope equipped with a 40× objective lens coupled to an Axio Cam HRm camera used to record the images. Images were processed with the ZEN Lite 64 bit ultimate software (Carl Zeiss, Germany). The cytotoxicity assay was conducted with cells seeded at 3×10<sup>3</sup> cells/well in flat-bottomed 96-well plates for 24 h. The medium was renewed and GLU or ION-GLU was added at 0.125 mg/mL and 0.250 mg/mL GLU concentrations. Plates were incubated at 37 °C for 24, 48, and 72 h. Then, residual solutions were removed following by PBS rinsing and culture medium reestablishment. Cytotoxicity was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were

maintained with DMEM and MTT (5 mg/mL, dissolved in 10 mmol/L PBS), and incubated at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator for 2 hours. The resulting solution was carefully removed and 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in order to solubilize the as-produced violet formazan crystals. The solution's absorbance at 595 nm was measured in a 96-well spectrophotometer microplate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA). The recorded data was normalized to the control data (cells without treatment).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Structural features of nanocolloids

The Raman spectra recorded for ION, ION-CIT and ION-GLU are shown in Figure 7a. The curve fitting was accomplished with Lorentzian-like lines. The Raman signatures of iron oxides are, in general, found in the range from 150 to 800  $\text{cm}^{-1}$ . In sample ION, the peaks around 333, 505 and 693  $\text{cm}^{-1}$  are attributed, respectively to the  $E_g$ ,  $T_{2g}^2$ , and  $A_{1g}$  vibrational modes of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). The spectra of post-functionalized samples, ION-CIT and ION-GLU, also show the same signature. The spectrum of ION-GLU, in addition to the magnetite phase, also contains some maghemite phase ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), as indicated by the presence of a peak at 712  $\text{cm}^{-1}$ . Maghemite, as an oxidized form of magnetite, can be naturally formed by air oxidation.

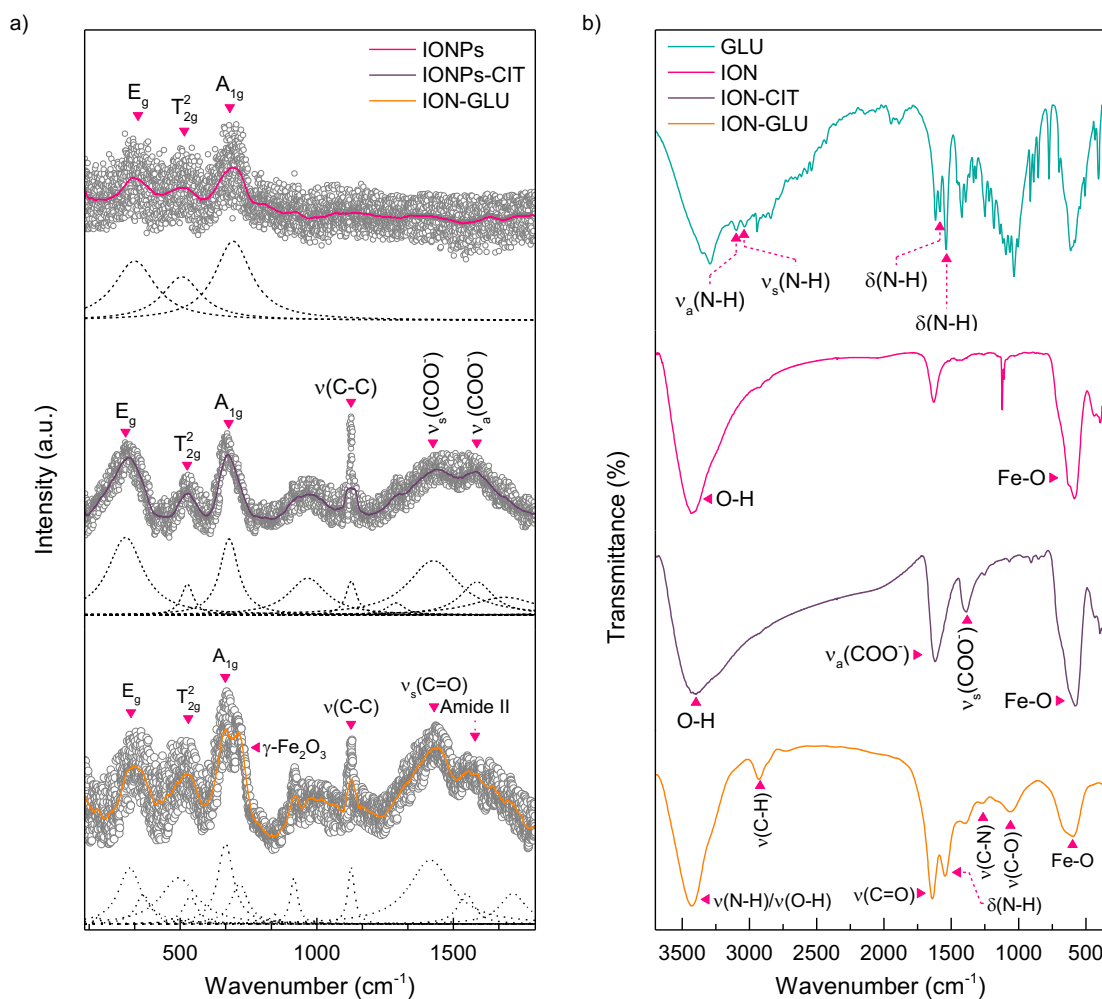


Figure 7 – Raman spectra (a) of ION, ION-CIT and ION-GLU, and FT-IR spectra (b) of GLU, ION, ION-CIT and ION-GLU. Spectra were normalized to enhance visual inspection.

The second range investigated (Fig. 1), above 1000 cm<sup>-1</sup>, is regarded to the functional moieties attached to the ION core. While the spectrum of ION in this range does not show any peak, as expected, the spectrum of ION-CIT shows a doublet signal peaking at 1423 cm<sup>-1</sup> and 1587 cm<sup>-1</sup>, which is ascribed to the symmetric and asymmetric stretching modes of the carboxylic groups from citrate. The peak at 1126 cm<sup>-1</sup> is ascribed to C-C stretching vibrations in aliphatic structures and it is present in both functionalized ION (ION-CIT and ION-GLU). For ION-GLU only, the Raman spectrum shows the characteristic amide bands; the C=O stretching at 1422 cm<sup>-1</sup> and the N-H bending at 1542 cm<sup>-1</sup>. All these data are collected in Table 2.

Table 2 – Main Raman and FT-IR bands observed in samples ION, GLU, ION-CIT and ION-GLU.

Band	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )						
	Raman			FT-IR			
	ION	ION-CIT	ION-GLU	GLU	ION	ION-CIT	ION-GLU
E <sub>g</sub>	333	302	312	-	-	-	-
T <sub>2g</sub>	505	527	505	-	-	-	-
A <sub>1g</sub>	693	681	667	-	-	-	-
γ-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	712	-	-	-	-
v(Fe-O)	-	-	-	-	595	586	588
v(C-O)	-	-	-	-	-	-	1056
v(C-N)	-	-	-	-	-	-	1262
δ(N-H)	-	-	1542	1539, 1589	-	-	1529
v(C-C)	-	1126	1124	-	-	-	-
v <sub>s</sub> (COO <sup>-</sup> )	-	1423	-	-	-	1382	-
v <sub>a</sub> (COO <sup>-</sup> )	-	1587	-	-	-	1620	-
v(C=O)	-	-	1422	-	-	-	1634
v(C-H)	-	-	-	-	-	-	2929
v(N-H)	-	-	-	3043, 3099	-	-	3426
v(O-H)	-	-	-	-	3340	3399 – 2000	3426

The FT-IR spectra supplied in Figure 7b corroborate further the step-by-step functionalization of ION with citrate and GLU. The assignment of main bands for GLU was supported by data from literature [38, 39] and are provided in Table 2. The spectrum of GLU shows the main FT-IR bands, in special the ones from the amine group. The bands at 1589 cm<sup>-1</sup> and 1539 cm<sup>-1</sup> are attributed to the two N-H bends of the primary amine [34,38-41]. Moreover, the asymmetric and symmetric stretching vibrations of N-H are observed at 3099 cm<sup>-1</sup> and 3043 cm<sup>-1</sup>, respectively. FT-IR spectrum of ION shows typical Fe-O bond vibrations below 800 cm<sup>-1</sup>. On the other hand, the band at 1120 cm<sup>-1</sup> arises from the antisymmetric stretching of Cl-O from perchlorate native of the perchloric acid used to stabilize the nanoparticles [42,43]. Moreover, O-H vibration from nanoparticles' surface is observed at 3430 cm<sup>-1</sup> [42].

As the main observations in the FT-IR spectra (Fig. 1b), one sees the Fe-O band (~580-590 cm<sup>-1</sup>) common to all ION-based samples. For ION, the band observed at 3430 cm<sup>-1</sup> is attributed to the -OH bending in iron oxyhydroxy groups found at the ION's surface and some physisorbed water molecules [42]. The spectrum of ION-CIT also shows the C=O asymmetric and symmetric stretching modes (1620 cm<sup>-1</sup> and 1382 cm<sup>-1</sup>, respectively) due to the attachment of citrate groups. The energy difference between these two vibration modes is 238 cm<sup>-1</sup>, which suggests that citrate groups are in monodentate coordination to Fe ions at the ION's surface [44]. Also, the O-H stretching is represented by a broad band peaking at 3426 cm<sup>-1</sup>, which is typical of carboxylic acids. Therefore, part of the citrate carboxylic groups is in the acidic form

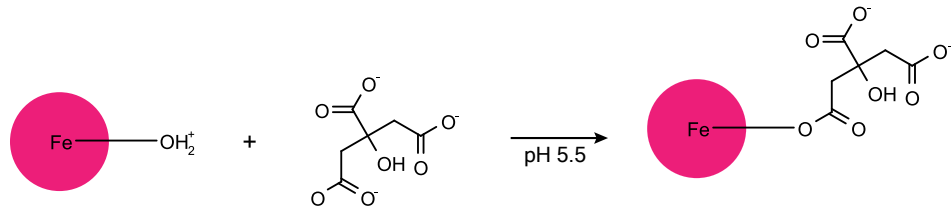
[41]. For the ION-GLU spectrum, the most important evidence of the attachment of GLU to ION is the presence of the amide linkage, given by the C=O stretching at  $1634\text{ cm}^{-1}$  (amide I band) and N-H bending at  $1529\text{ cm}^{-1}$  (amide II band). The structure of GLU is confirmed further by the C-O ( $1056\text{ cm}^{-1}$ ) and C-H ( $2929\text{ cm}^{-1}$ ) stretching in the GLU ring.

Figure 8 provides a schematic illustration for the step-by-step functionalization (via EDC/NHS chemistry) of ION to ION-CIT and ION-GLU. The chemical structure of each functionalized sample was ascribed from Raman and FT-IR spectra discussed earlier. In step 1, positively-charged iron oxide nanoparticles (sample ION) were reacted with citric acid to produce nanoparticles with available carboxylic groups (sample ION-CIT). Subsequently, ION-CIT was reacted with EDC and NHS (steps 2 and 3) to activate those carboxylic groups and thus conjugate with glucosamine (step 4). As we shall see, this procedure leads to stable nanocolloids consisting of iron oxide nanoparticles as nanocolloid, and citric acid and glucosamine as target biomolecules [34, 41].

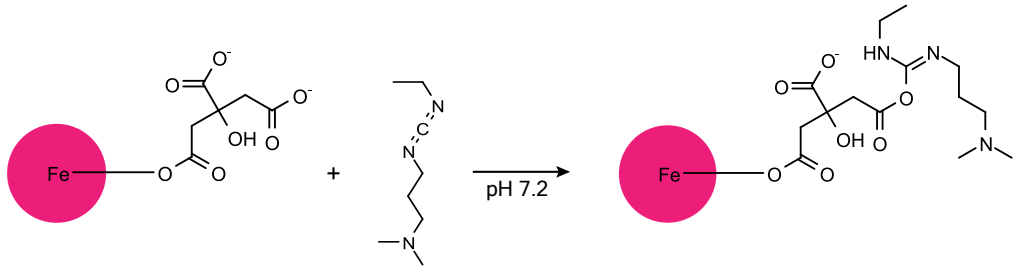
### 3.2 Morphology of the nanocolloids

The determined hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) of ION was  $50.8\text{ nm} \pm 0.9\text{ nm}$ . The  $D_H$  increased for ION-CIT ( $74.6 \pm 0.9\text{ nm}$ ) and a bit further for ION-GLU ( $81.8 \pm 0.8\text{ nm}$ ), which is expected for the attachment of citrate and GLU molecules. The useful range for intravenously administration of nanocolloids for drugs is 10-100 nm and, therefore, compatible with the sizes of ION-GLU [45, 46]. Figure 9 illustrates the zeta potential distributions for each nanocolloid sample. ION has a mean and positive zeta potential ( $+41.6 \pm 1.75\text{ mV}$ ), which is due to protonation of surface iron oxyhydroxy groups as discussed earlier. For ION-CIT, the negative zeta potential ( $-45.5 \pm 0.6\text{ mV}$ ) is imposed from the carboxylate groups of the citrate coating the ION's surface. Since the pH of this sample was 7.2 and the  $pK_a$  of each carboxylic acid in citric acid is 3.1, 4.8, and 6.4, all three carboxylic acids could be dissociated, except those connected to ION [47]. ION-GLU show a less negative zeta potential ( $-38.2 \pm 0.5\text{ mV}$ ), which is due to remaining carboxylate groups from citrate that did not react with GLU molecules during the functionalization step.

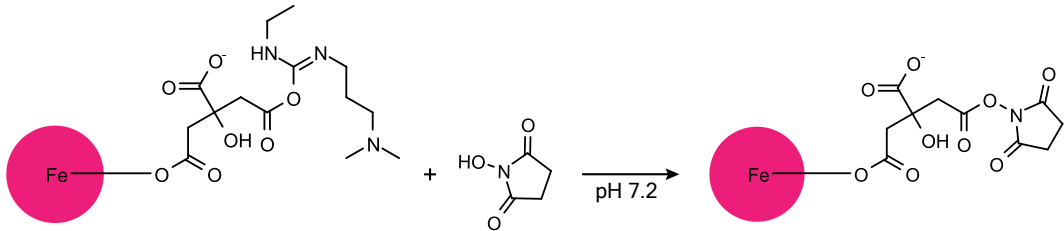
Step 1



Step 2



Step 3



Step 4

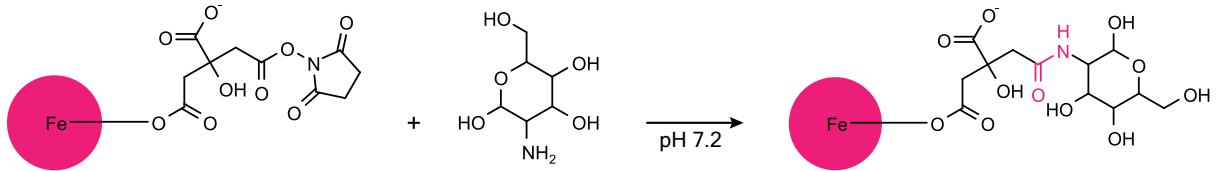


Figure 8 – Schematic illustration for the step-by-step functionalization process of ION to produce ION-CIT and ION-GLU samples.



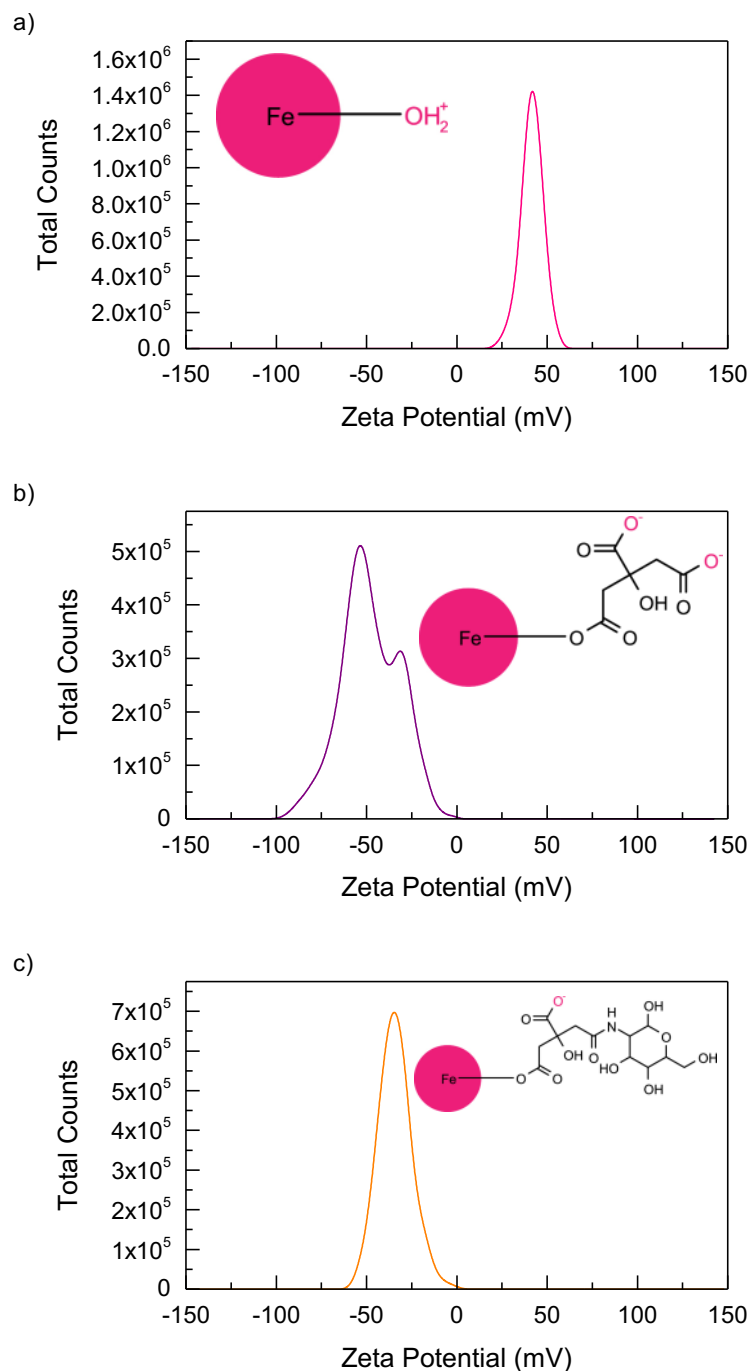


Figure 9 – Zeta potential distributions for ION (a), ION-CIT (b), and ION-GLU (c) samples along with their chemical structure highlighting the ionized groups responsible for the measured zeta potentials.

To evaluate the morphology and core size, TEM was performed only for ION-GLU and the results are shown in Figure 10. The TEM micrograph (Figure 10a) shows approximately spherical nanoparticles, whose size distribution (Figure 10b) is centered at  $\sim 6$  nm with the class interval determined as in the available literature [48]. The log-normal fitting gives the mean diameter ( $D_{\text{MET}}$ ) equally to  $6.3 \pm 0.15$  nm with  $\sigma = 0.30 \pm 0.03$ .

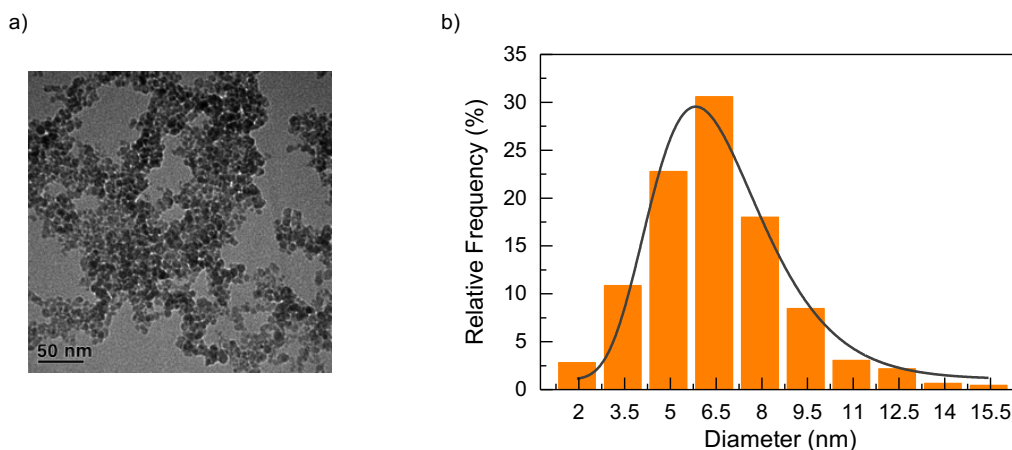


Figure 10– (a) TEM micrograph of ION-GLU and (b) nanoparticle diameter histogram (vertical bars) fitted with a log-normal distribution function (solid black line).

### 3.3 Thermogravimetric analysis

TGA curves of ION-CIT and ION-GLU samples were obtained in order to estimate the concentration of CIT and GLU and also to corroborate further the step-by-step functionalization route proposed herein. As seen in Figure 11, GLU and citric acid decompose within a single step, which is around 200 °C for both. The ION TG curve shows it is very stable, with a single mass loss of 3.79%, attributed to the desorption of water molecules. Finally, the TG curves for ION-CIT and ION-GLU clearly show the release of water (near 100 °C) and more two subsequent events at 200 °C and 300 °C, which are attributed to degradation of citrate and GLU. The thermal stability of ION-CIT and ION-GLU is sufficiently high to perform practical therapies, including magnetic hyperthermia, in which the generated heat normally does not exceed 45 °C [49]. After a quantitative analysis of the TGA curves (please refer to Table A1), it could be estimated the weight percentual composition of the nanocolloids. The values found were: 11.65% of citrate/citric acid in ION-CIT and 7.87% of citric/acid and 24.55% of GLU in ION-GLU. The amount of GLU in ION-GLU is equivalent to 1.37 mmol of GLU per gram of ION. For comparison, Srinivasan and Huang achieved 1.67 mmol for an iron oxide nanoparticles coated with glucosamine sample prepared by a different procedure [15]. Moreover, as cell uptake and viability tests demand for aqueous samples, the concentration of CIT and GLU in ION-GLU sample was determined by gravimetry. The concentration found is 3.17 mg/mL. As the weight percentage of CIT and GLU in the nanocolloids are 7.87% and 24.55%, respectively, with the ION-GLU concentration determined before the concentration of

CIT and GLU in the nanocolloid can be also estimated. It was found 0.25 mg/mL of CIT and 0.78 mg/mL of GLU.

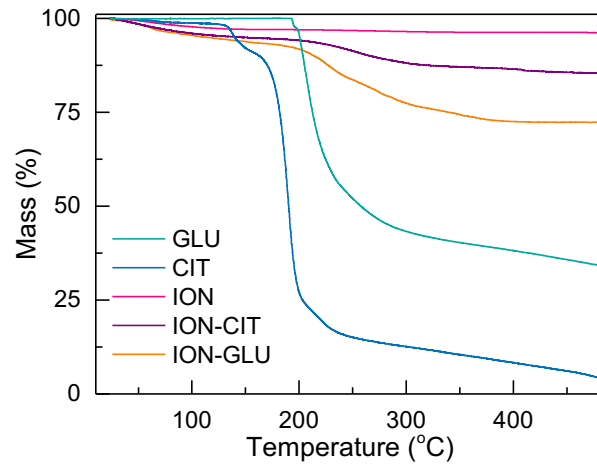


Figure 11 – TGA curves of GLU, citric acid, ION, ION-CIT, and ION-GLU as indicated. Curves registered in N<sub>2</sub> atmosphere.

### 3.4 Magnetic measurements

Figure 12 displays the field-dependent magnetization curve obtained at room temperature for the ION-GLU sample. It can be seen that the hysteresis loop has negligible coercivity and remnant magnetization at 300 K, which confirms the superparamagnetic behavior of the ION-GLU sample. Moreover, the saturation magnetization ( $M_s$ ) was evaluated by plotting the magnetization versus the reciprocal of the applied field, using the law of approach to saturation, resulting in a  $M_s$  of 59.32 emu/g [50]. This  $M_s$  is lower than that of bulk iron oxide (92 emu/g) [51]. This can be understood as the common feature of nano-sized particles, surface spin canting and disorder effect due to bond breaking [52-54].

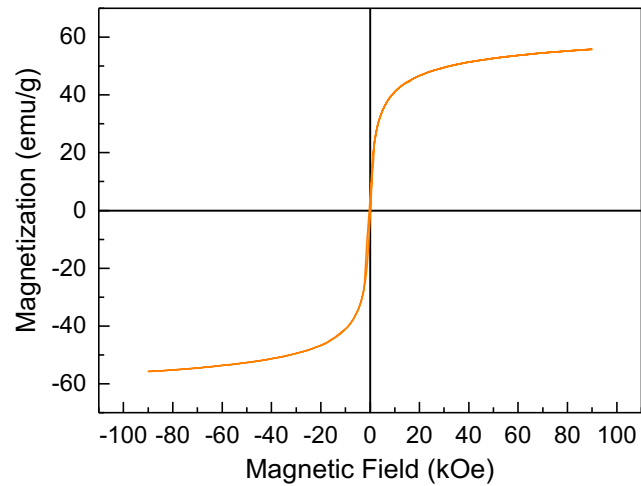


Figure 12 – Room-temperature magnetization curve of ION-GLU nanocolloid.

### 3.5 Cell uptake and viability tests

The ION-GLU uptake by human connective tissue cells was imaged by optical microscopy and a typical micrograph is provided in Figure 13. The micrograph shows ION-GLU nanocolloid agglomerated as blue clusters (highlighted by the arrows) inside the cells, thus, suggesting they transposed the cell's membrane towards its interior. In addition, some agglomerates are also found in the cytoplasm, near the nucleus and even inside of it.

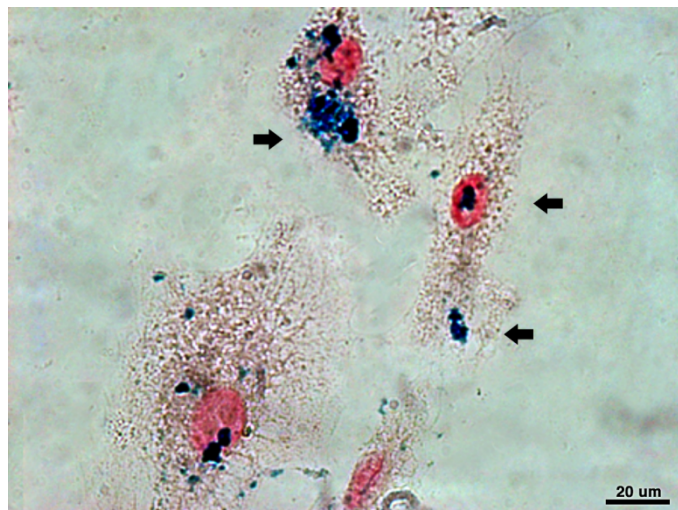


Figure 13 – Cell uptake image ION-GLU showing ION-GLU nanoparticles (blue clusters) agglomerated in the cytoplasm and nucleus (arrows).

Figure 14 presents the cell viability determined for cells incubated with DMEM only (control group, CTRL), free GLU and ION-GLU. Data were collected after 24, 48 and 72 hours of incubation and at two concentrations ( $0.125 \text{ g L}^{-1}$  and  $0.250 \text{ g L}^{-1}$ ) of GLU (free form and ION-GLU). It is observed in Figure 14a that for the lowest glucosamine concentration in the ION-GLU, the cell viability is twice that of the CTRL (about two times) after 48 h and 72 h of incubation. For the largest glucosamine concentration (Figure 14b), the behavior is nearly the same; the cell viability is twice greater for those incubated with ION-GLU in comparison to the CTRL. Meanwhile, the cell viability in the presence of free GLU is about three times greater than the control. In summary, at the largest GLU concentration, the cell viability for ION-GLU is lower than that seen for free GLU, but it is still sufficient high to confirm its low toxicity to health cells and anticipates its potential use as a biocompatible nanocolloid.

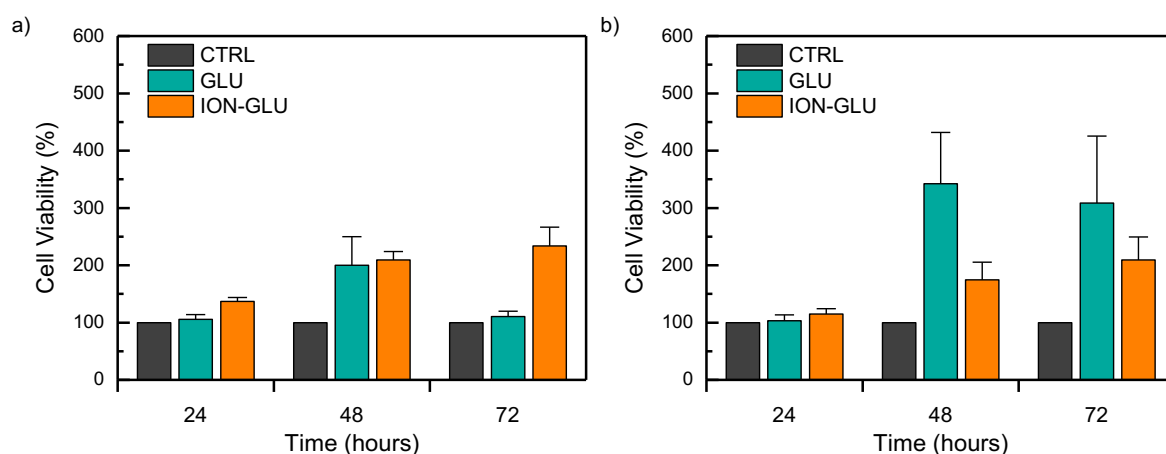


Figure 14– Cell viability test of the CTRL, GLU and ION-GLU groups with a glucosamine concentration of (a)  $0.125 \text{ g L}^{-1}$  and (b)  $0.250 \text{ g L}^{-1}$  for 24, 48 and 72 hours of treatment times.

From cell viability data, a mechanism of GLU incorporation by the fibroblast cells is proposed for the case of free GLU in the medium, and when conjugated to ION (ION-GLU). For free GLU, GLU molecules are more easily adsorbed at the cells' walls, facilitating further their interiorization. However, as this free glucosamine is consumed much faster, the cell viability starts to decrease as there is a lower stimulus [55]. For ION-GLU, the amide bond linkage between GLU and carboxylic groups from ION-CIT has to be broken after interiorization in order to release GLU molecules and gradually increase its levels in the cytoplasm during the time window studied, as depicted in Fig. 9.

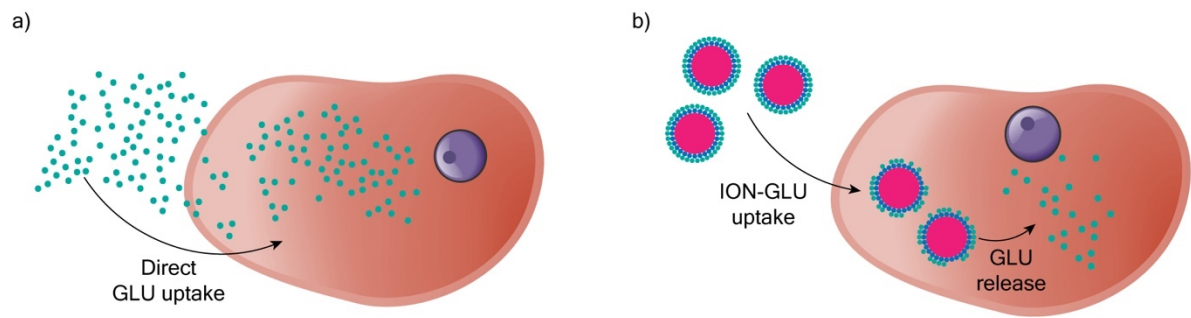


Figure 15 – Illustration of the proposed mechanism for the incorporation of glucosamine by the fibroblast cells in (a) free glucosamine (GLU) and (b) GLU conjugated with ION' surface (ION-GLU nanocolloid).

The results demonstrate that the cell viability at both GLU concentrations is higher than that of control group, suggesting the increase in cell proliferation due to changes in the fibroblast metabolic activity. In addition, they confirm the need for a successful functionalization of bare ION with non-toxic moieties for future biomedical applications.

## 4 CONCLUSIONS

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (~ 6 nm) functionalized with glucosamine (ION-GLU) could be synthesized via a step-by-step procedure involving citric acid and EDC/NHS chemistry. The success of the actual approach was only possible thanks to the functionalization of ION with citrate ions in the first step, which resulted in nanocolloids stable in physiological conditions (pH7.2) and dressed with carboxylic groups available for reacting with GLU in a second step and the activation of these carboxylic groups with EDC/NHS for the formation of amide linkages between ION-CIT and GLU. The loading was about 1.4 mmol of GLU per gram of ION, which is comparable to other synthetic routes available in the literature and sufficient high to ensure the biocompatibility of ION-GLU with healthy human cells (human dental pulp tissue). Although the cell uptake by free GLU is greater than that observed with ION-GLU, for ION-GLU, the amide bond linkage between GLU and ION-CIT has to be broken after interiorization in order to release GLU molecules and gradually increase its levels in the cytoplasm. Therefore, ION-GLU may induce the modulation of the GLU cell uptake, anticipating its suitability for GLU nanocarrier platform.

## Acknowledgments

The financial support from the Brazilian agencies MCT-CNPq, FINEP, FAP-DF, FINATEC and CAPES is gratefully acknowledged. We are grateful to Dr. M. J. Araújo Sales, Instituto de Química - Universidade de Brasília, for her support with TGA measurements. Also, Dr. O. R. Pires Júnior, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, is acknowledged for his support with sample lyophilization.

## Conflicts of interest:

The authors declare that there is no competing financial interest.

## References

- [1] DAHMER, S. & SCHILLER, R. M., **2008**. Glucosamine. *American Family Physician*, 78(4), pp.471-476.
- [2] HUSKISSON, E. C., **2008**. Glucosamine and Chondroitin for Osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*, 36(6), pp.1161-1179.
- [3] KIRKHAM, S. G. & SAMARASINGHE, R. K., **2009**. Review article: glucosamine. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 17(1), pp.72-76.
- [4] HUA, J., SAKAMOTO, K. & NAGAOKA, I., **2002**. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 71(4), pp.632-640.
- [5] MILLER, K. L. & CLEGG, D. O., **2011**. Glucosamine and chondroitin sulfate. *Rheumatic Disease Clinics*, 37(1), pp.103-118.
- [6] CREAMER, P. & HOCHBERG, M. C., **1997**. Osteoarthritis. *The Lancet*, 350(9076), pp.503-509.
- [7] JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **2008**. *Histologia Básica - Texto e Atlas*, Editora Guanabara Koogan.
- [8] JACKSON, C. G., PLAAS, A. H., SANDY, J. D., HUA, C., KIM-ROLANDS, S., BARNHILL, J. G., HARRIS, C. L. & CLEGG, D. O., **2010**. The human pharmacokinetics of oral ingestion of glucosamine and chondroitin sulfate taken separately or in combination. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(3), pp.297-302.
- [9] SETNIKAR, I., PACINI, M. & REVEL, L., **1991**. Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied in animal models. *Arzneimittel-Forschung*, 41(5), pp.542-545.
- [10] BEDANTA, S. & KLEEMANN, W. J., **2009**. Superparamagnetism. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 42, 013001.
- [11] SOLER, M. A. G. & PATERNO, L. G., **2017**. In: *Nanostructures*, edited by DA RÓZ, A. L., FERREIRA, M., DE LIMA LEITE, F. & OLIVEIRA, O. N. *William Andrew Publishing* pp.147-186
- [12] PHILIP, J. & LASKAR, J. M., **2012**. Optical properties and applications of ferrofluids—a review. *Journal of Nanofluids*, 1(1), pp.3-20.
- [13] VINODHA, G., CINDRELLA, L., SITHARA, V., PHILIP, John & SHIMA, P. D., **2018**. Synthesis, Characterization, Thermal Conductivity and Rheological Studies in Magnetite-Decorated Graphene Oxide Nanofluids. *Journal of Nanofluids*, 7(1), pp.11-20.
- [14] HU, Y., MIGNANI, S., MAJORAL, J.-P., SHEN, M. & SHI, X., **2018**. Construction of iron oxide nanoparticle-based hybrid platforms for tumor imaging and therapy. *Chemical Society Reviews*, 47(5), pp.1874-1900.



- [15] RANA, S., BARICK, K. & HASSAN, P. J. J. O. N., **2015**. Stimuli responsive carboxyl PEGylated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for therapeutic applications. *Journal of Nanofluids*, 4(4), pp.421-427.
- [16] SRINIVASAN, B. & HUANG, X., **2008**. Functionalization of magnetic nanoparticles with organic molecules: Loading level determination and evaluation of linker length effect on immobilization. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*, 20(3 - 4), pp.265-277.
- [17] VALERO, E., TAMBALO, S., MARZOLA, P., ORTEGA-MUNOZ, M., LÓPEZ-JARAMILLO, F. J., SANTOYO-GONZÁLEZ, F., DE DIOS LÓPEZ, J., DELGADO, J. J., CALVINO, J. J. & CUESTA, R., **2011**. Magnetic nanoparticles-templated assembly of protein subunits: a new platform for carbohydrate-based MRI nanoprobes. *Journal of the American Chemical Society*, 133(13), pp.4889-4895.
- [18] NARAYANAN, K., LIN, A. W., ZHENG, Y., ERATHODIYIL, N., WAN, A. C. & YING, J. Y., **2013**. Glucosamine - Conjugated Nanoparticles for the Separation of Insulin - Secreting Beta Cells. *Advanced healthcare materials*, 2(9), pp.1198-1203.
- [19] CARNEIRO, M. L., NUNES, E. S., PEIXOTO, R. C., OLIVEIRA, R. G., LOURENÇO, L. H., DA SILVA, I. C., SIMIONI, A. R., TEDESCO, A. C., DE SOUZA, A. R. & LACAVAL, Z. G., **2011**. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. *Journal of nanobiotechnology*, 9(1), pp.11.
- [20] PICHON, B. P., LOUET, P., FELIX, O., DRILLON, M., BEGIN-COLIN, S. & DECHER, G., **2011**. Magnetotunable hybrid films of stratified iron oxide nanoparticles assembled by the layer-by-layer technique. *Chemistry of Materials*, 23(16), pp.3668-3675.
- [21] ALCANTARA, G., PATERNO, L., FONSECA, F. J., MORAIS, P. & SOLER, M., **2011**. Morphology of cobalt ferrite nanoparticle-polyelectrolyte multilayered nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323(10), pp.1372-1377.
- [22] SOLER, M. A., **2018**. Layer-by-layer assembled iron oxide based polymeric nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 467, pp.37-48.
- [23] SOLER, M. A., PATERNO, L. G. & MORAIS, P. C., **2012**. Layer-by-layer assembly of magnetic nanostructures. *Journal of Nanofluids*, 1(2), pp.101-119.
- [24] PATERNO, L. G., SINNECKER, E. H. C. P., SOLER, M. A. G., SINNECKER, J. P., NOVAK, M. A. & MORAIS, P. C., **2012**. Tuning of Magnetic Dipolar Interactions of Maghemite Nanoparticles Embedded in Polyelectrolyte Layer-by-Layer Films. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(8), pp.6672-6678.
- [25] SOLER, M., PATERNO, L., SINNECKER, J., WEN, J., SINNECKER, E., NEUMANN, R., BAHIANA, M., NOVAK, M. & MORAIS, P., **2012**. Assembly of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/polyaniline nanofilms with tuned dipolar interaction. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(3), pp.653.
- [26] PATERNO, L. G., SOLER, M. A. G., SINNECKER, J. P., SINNECKER, E. H. C. P., BAO, S. N., LIMA, E. C. D. NOVAK, M. A. & MORAIS, P. C., **2010**. Magnetic Nanocomposites

fabricated via layer by layer approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10, pp. 2679–2685.

- [27] ZAIBUDEEN, A. & PHILIP, J., **2018**. Magnetic nanofluid based non-enzymatic sensor for urea detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, pp.720-728.
- [28] VIALI, W. R., ALCANTARA, G. B., SARTORATTO, P. P., SOLER, M. A., MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E., ANDRZEJEWSKI, B. & MORAIS, P. C., **2010**. Investigation of the molecular surface coating on the stability of insulating magnetic oils. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(1), pp.179-188.
- [29] MAHENDRAN, V. & PHILIP, J., **2014**. Non-enzymatic glucose detection using magnetic nanoemulsions. *Applied Physics Letters*, 105(12), pp.123110.
- [30] ALCANTARA, G. B., PATERNO, L. G., FONSECA, F. J., PEREIRA-DA-SILVA, M. A., MORAIS, P. C. & SOLER, M. A. G., **2013**. Layer-by-layer assembled cobalt ferrite nanoparticles for chemical sensing. *Journal of Nanofluids*, 2(3), pp.175-183.
- [31] LETTI, C. J., COSTA, K. A., GROSS, M. A., PATERNO, L. G., PEREIRA-DA-SILVA, M. A., MORAIS, P. C. & SOLER, M. A., **2017**. Synthesis, morphology and electrochemical applications of iron oxide based nanocomposites. *ADVANCES IN NANO RESEARCH*, 5(3), pp.215-230.
- [32] ALCANTARA, G. B., PATERNO, L. G., FONSECA, F. J., PEREIRA-DA-SILVA, M. A., MORAIS, P. C. & SOLER, M. A., **2013**. Dielectric properties of cobalt ferrite nanoparticles in ultrathin nanocomposite films. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(45), pp.19853-19861.
- [33] BACRI, J.-C., PERZYNSKI, R., SALIN, D., CABUIL, V. & MASSART, R., **1990**. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 85(1–3), pp.27-32.
- [34] VEERAPANDIAN, M., LIM, S. K., NAM, H. M., KUPPANNAN, G. & YUN, K. S., **2010**. Glucosamine-functionalized silver glyconanoparticles: characterization and antibacterial activity. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), pp.867-876.
- [35] SOLER, M. A. G. & FANYAO, Q., **2012**. In: *Raman Spectroscopy of Nanomaterials Characterization*, edited by KUMAR, C. S. S. R. Springerpp.379-416
- [36] DA SILVA, S. W., MELO, T. F. O., SOLER, M. A. G., LIMA, E. C. D., DA SILVA, A. F. & MORAIS, P. C., **2003**. Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: A Raman spectroscopy investigation. *Ieee Transactions on Magnetics*, 39(5), pp.2645-2647.
- [37] PEREIRA, L. O., LONGO, J. P. & AZEVEDO, R. B., **2012**. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol*, 57(8), pp.1079-1085.

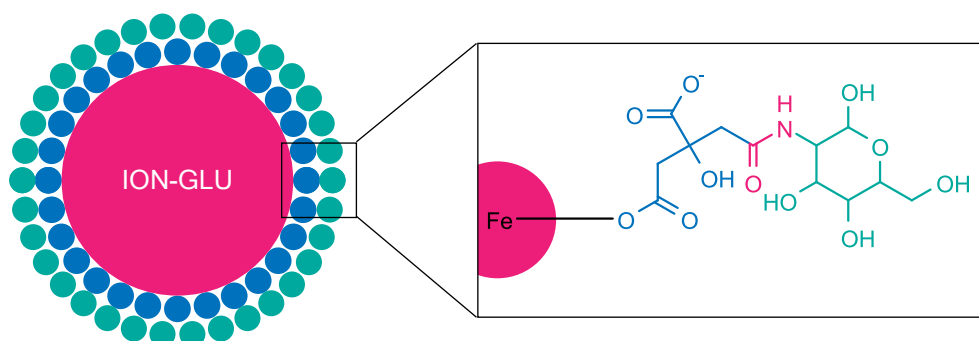
- [38] KAUSHIK, A., KHAN, R., SOLANKI, P. R., PANDEY, P., ALAM, J., AHMAD, S. & MALHOTRA, B., **2008**. Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor. *Biosensors and bioelectronics*, 24(4), pp.676-683.
- [39] YANG, H.-M., LEE, H. J., JANG, K.-S., PARK, C. W., YANG, H. W., DO HEO, W. & KIM, J.-D., **2009**. Poly (amino acid)-coated iron oxide nanoparticles as ultra-small magnetic resonance probes. *Journal of Materials Chemistry*, 19(26), pp.4566-4574.
- [40] YOO, D., LEE, C., SEO, B. & PIAO, Y., **2017**. One pot synthesis of amine-functionalized and angular-shaped superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR/fluorescence bimodal imaging application. *Rsc Advances*, 7(21), pp.12876-12885.
- [41] POMPEO, F. & RESASCO, D. E., **2002**. Water solubilization of single-walled carbon nanotubes by functionalization with glucosamine. *Nano Letters*, 2(4), pp.369-373.
- [42] DEGENHARDT, J. & MCQUILLAN, A. J., **1999**. In Situ ATR-FTIR Spectroscopic Study of Adsorption of Perchlorate, Sulfate, and Thiosulfate Ions onto Chromium(III) Oxide Hydroxide Thin Films. *Langmuir*, 15(13), pp.4595-4602.
- [43] LEWIS, D. L., ESTES, E. D. & HODGSON, D. J., **1975**. The infrared spectra of coordinated perchlorates. *Journal of Crystal and Molecular Structure*, 5(1), pp.67-74.
- [44] NAKAMOTO, K. in: Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, John Wiley & Sons, New York, **1986**, p. 232.
- [45] WU, W., WU, Z., YU, T., JIANG, C. & KIM, W.-S., **2015**. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and technology of advanced materials*, 16(2), pp.023501.
- [46] LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., ROBIC, C., VANDER ELST, L. & MULLER, R. N., **2008**. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*, 108(6), pp.2064-2110.
- [47] GOLDBERG, R. N., KISHORE, N. & LENNEN, R. M., **2002**. Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 31(2), pp.231-370.
- [48] STURGES, H. A., **1926**. The Choice of a Class Interval. *Journal of the American Statistical Association*, 21(153), pp.65-66.
- [49] SILVA, A. C., OLIVEIRA, T. R., MAMANI, J. B., MALHEIROS, S. M. F., MALAVOLTA, L., PAVON, L. F., SIBOV, T. T., AMARO, E., JR., TANNÚS, A., VIDOTO, E. L. G., MARTINS, M. J., SANTOS, R. S. & GAMARRA, L. F., **2011**. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *International journal of nanomedicine*, 6, pp.591-603.
- [50] FRANKLIN, A. D. & BERKOWITZ, A. E., **1953**. The Approach to Saturation in Dilute Ferromagnetics. *Physical Review*, 89(6), pp.1171-1171.

- [51] SHAFI, K. V. P. M., ULMAN, A., YAN, X. Z., YANG, N. L., ESTOURNES, C., WHITE, H. & RAFAILOVICH, M., **2001**. Sonochemical synthesis of functionalized amorphous iron oxide nanoparticles. *Langmuir*, 17(16), pp.5093-5097.
- [52] MIKHAYLOVA, M., KIM, D. K., BERRY, C. C., ZAGORODNI, A., TOPRAK, M., CURTIS, A. S. & MUHAMMED, M., **2004**. BSA immobilization on amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 16(12), pp.2344-2354.
- [53] PATERNO, L. G., M. A. G., FONSECA, F. J., SINNECKER, J. P., SINNECKER, E. H. C. P., LIMA, E. C. D., NOVAK, M. A. & MORAIS, P. C., **2009**. Layer-by-Layer Assembly of Bifunctional Nanofilms: Surface-Functionalized Maghemite Hosted in Polyaniline J. Phys. Chem. C 113, pp. 5087–5095.
- [54] ASLAM, M., SCHULTZ, E. A., SUN, T., MEADE, T. & DRAVID, V. P., **2007**. Synthesis of amine-stabilized aqueous colloidal iron oxide nanoparticles. *Crystal growth & design*, 7(3), pp.471-475.
- [55] YANG, L., CAO, Z., SAJJA, H. K., MAO, H., WANG, L., GENG, H., XU, H., JIANG, T., WOOD, W. C. & NIE, S., **2008**. Development of receptor targeted magnetic iron oxide nanoparticles for efficient drug delivery and tumor imaging. *Journal of biomedical nanotechnology*, 4(4), pp.439-449.

## Graphical Abstract

### Synthesis of stable and biocompatible glucosamine-iron oxide superparamagnetic nanocolloids

L. M. R. Rivera, J. G. Machado, M. C. Mathpal, N. L. Chaves, S. N. B ao, R. B. Azevedo, L. G. Paterno, M. A. G. Soler



Our study describes the successful synthesis of non toxic glucosamine coated ION nanocolloids to be applied for glucosamine nanocarrier. The ION core is coordinated with citric acid (blue), whereas the glucosamine (green) is bonded to the citrate via an amide bond (pink).

## Supporting Information

Table 1A - Thermal decomposition and concentration of samples GLU, ION, ION-CIT and ION-GLU.

Sample	Remnant Mass (%)	Mass Loss (%)	[ION] (w/w)	[CIT] (w/w)	[GLU] (w/w)
GLU	66.79	33.21	–	–	–
CIT	97.44	2.56	–	–	–
ION	3.79	96.21	–	–	–
ION-CIT	14.70	85.30	88.35	11.65	–
ION-GLU	26.62	73.38	67.58	7.87	24.55

### 4.3 Caracterização dos materiais

#### 4.3.1 Caracterização do sulfato de condroitina

A Figura 15 mostra o espectro no infravermelho obtido do sulfato de condroitina utilizado nos experimentos, cujas bandas observadas foram atribuídas com base em estudos da literatura.<sup>[10; 96-100]</sup>

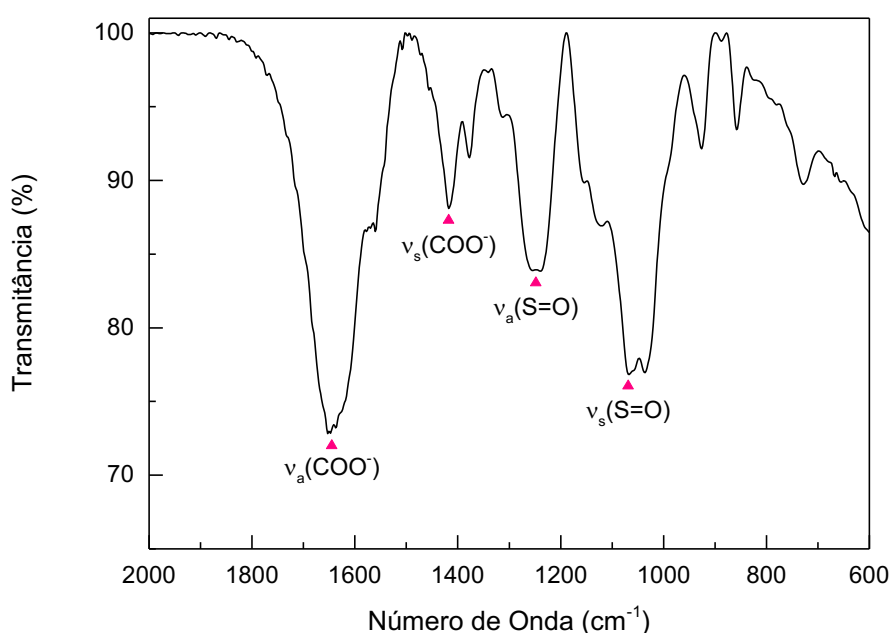


Figura 15 – Espectro infravermelho do 4-sulfato de condroitina obtido na região de 2000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  com as principais bandas vibracionais indicadas.

No espectro, é possível observar vários modos vibracionais atribuídos à estrutura e grupos funcionais do sulfato de condroitina. Por se encontrar na forma iônica, o carboxilato no carbono 5 do GluA apresenta duas bandas de estiramentos sendo o estiramento assimétrico em  $1645 \text{ cm}^{-1}$  e o simétrico em  $1417 \text{ cm}^{-1}$ . O estiramento assimétrico do carboxilato encontra-se sobreposto com o estiramento da carbonila da amida secundária do carbono 2 do GalNAc. Esta amida também apresenta o dobramento N-H em  $1562 \text{ cm}^{-1}$ . A metila presente na amida possui um dobramento identificado em  $1379 \text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $927 \text{ cm}^{-1}$  é proveniente do anel pirano tanto do GluA quanto do GalNAc,<sup>[101]</sup> enquanto que a banda em  $1122 \text{ cm}^{-1}$  é originária do estiramento do éter do anel. As ligações glicosídicas apresentam vibração em  $1037 \text{ cm}^{-1}$ . Por último, o grupo sulfonato apresenta várias vibrações identificadas em 729, 858, 1068 e

1248  $\text{cm}^{-1}$ . As duas primeiras vibrações são atribuídas à posição axial do grupo, esperado em uma sulfonação do carbono 4 do GalNAc. Já as outras duas vibrações provêm do estiramento simétrico e assimétrico da ligação S=O, respectivamente. As posições das principais bandas observadas no espectro e as suas respectivas atribuições estão indicadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Bandas vibracionais e respectivas atribuições observadas no sulfato de condroitina.

Atribuição	$\tilde{\nu}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
Posição axial do grupo $-\text{SO}_3^-$	729
Posição axial do grupo $-\text{SO}_3^-$	858
Estiramento do anel pirano	927
Ligação glicosídica	1037
$\nu_s(\text{S}=\text{O})$	1068
$\nu_a(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1122
$\nu_a(\text{S}=\text{O})$	1248
$\delta(\text{CH}_3)$	1379
$\nu_s(\text{COO}^-)$	1417
$\delta(\text{N}-\text{H})$	1562
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1637
$\nu_a(\text{COO}^-)$	1645

No processo de síntese dos complexos nanoestruturados, estes são submetidos à diálise para remoção de íons e moléculas excedentes. Ainda, para o estudo da cinética de liberação do fármaco é necessário utilizar uma membrana de diálise que permita a passagem do fármaco em estudo. Dessa forma, a massa molar do 4-sulfato de condroitina foi estimada pela relação entre a sua viscosidade intrínseca,  $[\eta]$ , e a massa molar viscosimétrica média,  $\overline{M}_v$ , relacionadas pela equação de Mark-Houwink-Sakurada:<sup>[102]</sup>

$$[\eta] = K \overline{M}_v^\alpha \quad (25)$$

onde K e  $\alpha$  são constantes para um determinado sistema de polímero, solvente e temperatura. O expoente  $\alpha$  depende da geometria do polímero e varia de 0,5 a 2,0.<sup>[103]</sup> Geralmente,  $0,5 \leq \alpha \leq 0,8$  é encontrado para conformações de cadeias flexíveis, enquanto que  $0,8 \leq \alpha \leq 1,0$  para macromoléculas rígidas.<sup>[102]</sup> A viscosidade intrínseca indica o ganho de viscosidade promovido por unidade de concentração do polímero onde não há interação com outras moléculas do polímero e é definida por:<sup>[103]</sup>

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (26)$$

onde  $c$  é a concentração do polímero na solução e  $\eta_{sp}$  é a viscosidade específica. A viscosidade específica, por sua vez, pode ser obtida por:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} \quad (27)$$

em que  $\eta$  é a viscosidade da solução em determinadas condições e  $\eta_0$  é a viscosidade da solução nas mesmas condições sem a presença do polímero, apenas o solvente. A viscosidade relativa,  $\eta_{rel}$ , determina o quanto a viscosidade da solução é maior do que a viscosidade do solvente puro.

Para a obtenção da viscosidade intrínseca, no entanto, normalmente são utilizadas a viscosidade reduzida e a viscosidade inerente. O gráfico da viscosidade reduzida em função da concentração e o gráfico da viscosidade inerente, também em função da concentração, são normalmente retas e a intercepção dessas equivale à viscosidade intrínseca.<sup>[103]</sup>

A viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) indica o ganho de viscosidade promovido por unidade de concentração do polímero, sendo calculada pela razão da viscosidade específica pela concentração. Por outro lado, a viscosidade inerente ( $\eta_{inh}$ ) permite que tanto variações pequenas quanto variações muito grandes da viscosidade da solução, em relação à do solvente, possam ser expressas em um mesmo eixo. Esta viscosidade é definida por:

$$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_{rel})}{c} \quad (28)$$

Dessa forma, para a obtenção da massa molar viscosimétrica média do 4-sulfato de condroitina, foi obtido, inicialmente, a viscosidade de 5 soluções de 4-sulfato de condroitina em concentrações de 1 a 5 mg/mL em intervalos de 1 mg/mL. Como solvente, foi utilizado cloreto de sódio 0,2 M, uma vez que se encontram na literatura os dados de  $K$  e  $\alpha$  para esse sistema.<sup>[104]</sup> A viscosidade foi obtida pelo método de viscosimetria capilar num viscosímetro de Cannon-Fenske e os dados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados viscosimétricos das soluções de 4-sulfato de condroitina.



[ChS] (g/L)	Tempo (s)	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$\eta_{red}$ (dL/g)	$\eta_{inh}$ (dL/g)
0	422,82 ± 04,91	1,00000	0,00000		
1	465,35 ± 03,09	1,10059	0,10059	1,00587	0,95843
2	519,46 ± 05,49	1,22855	0,22855	1,14277	1,02919
3	574,25 ± 01,88	1,35815	0,35815	1,19383	1,02041
4	624,51 ± 15,00	1,47701	0,47701	1,19251	0,97504
5	685,38 ± 04,51	1,62097	0,62097	1,24195	0,96605

O ajuste linear da viscosidade específica e da viscosidade reduzida em função da concentração apresentaram intersecção em 0,99881 e 1,0015 (Figura 16).

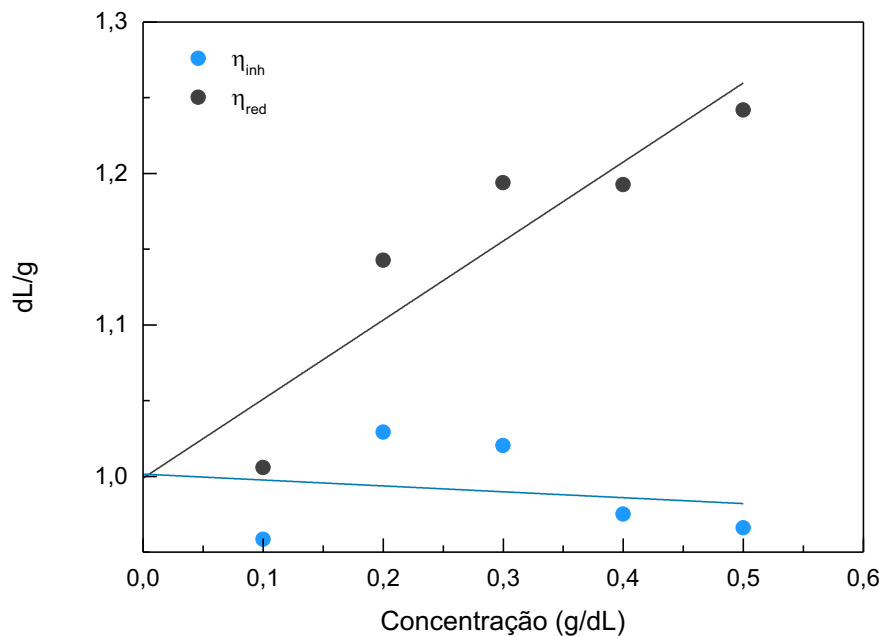


Figura 16 – Viscosidade específica e viscosidade reduzida em função da concentração.

Com base nos dados obtidos, obteve-se uma viscosidade intrínseca  $[\eta] = 1,00016 \pm 0,0019$  dL/g. Pela equação de Mark-Houwink-Sakurada, considerando  $K = 5 \times 10^{-6}$  dL · g<sup>-1</sup> e  $\alpha = 1,44$ , obteve-se a massa molecular viscosimétrica média de 44.677 g/mol equivalente a aproximadamente 45 kDa.<sup>[104]</sup> Este valor encontra-se de acordo com a literatura, em que se observa uma faixa de 10 a 45 kDa.

### 4.3.2 Caracterização da glucosamina

A Figura 17 mostra o espectro Raman obtido da glucosamina na região de 550 a 1550  $\text{cm}^{-1}$ . A identificação dos modos vibracionais foi realizada após o ajuste das bandas com funções lorentzianas. O espectro Raman da glucosamina pode ser dividido em três regiões, onde cada uma representa características distintas dessa molécula.<sup>[105]</sup> A região de vibrações até 900  $\text{cm}^{-1}$  é a anomérica, enquanto que a segunda região, de 950 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ , é a *fingerprint*, responsável pela identificação da glucosamina. A terceira região, de 1200 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ , compreende as deformações de  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{COH}$ .<sup>[105; 106]</sup>

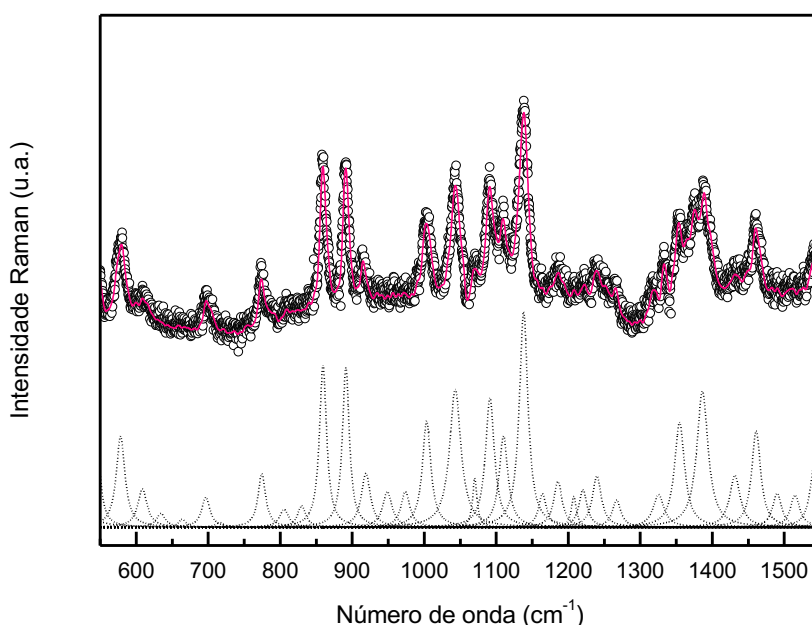


Figura 17 – Espectro Raman da glucosamina obtido na região de 550 a 1550  $\text{cm}^{-1}$ .

As bandas em 840  $\text{cm}^{-1}$  e 897  $\text{cm}^{-1}$  correspondem à conformação  $\alpha$  e  $\beta$  da glucosamina, respectivamente.<sup>[106]</sup> Na região de *fingerprint*, as bandas provêm de estiramentos C–O e C–C com uma significativa contribuição de deformações  $-\text{COH}$ .<sup>[105]</sup> As vibrações presentes nesta região são de difícil interpretação devido ao grande número de bandas atribuídas a essas ligações. Em particular, a banda em 1002  $\text{cm}^{-1}$  é característica da presença do grupo metileno na posição do carbono 6.<sup>[105; 107]</sup>

Na análise da região de deformações de  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{COH}$ , é possível identificar a presença de bandas em 1220 e 1260  $\text{cm}^{-1}$  devido à interação do grupo hidroxila, quando em posição axial,

com o grupo hidroximetil exocíclico no carbono 5 e o oxigênio presente no anel pirano, respectivamente.<sup>[105]</sup> Ainda, é possível observar uma banda em  $1460\text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração de  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{COH}$ .<sup>[106]</sup>

O espectro infravermelho da glucosamina (Figura 18) é muito similar ao da glucose uma vez que possuem uma estrutura extremamente semelhante, entretanto, a glucosamina deve apresentar bandas referentes à amina primária presente no seu carbono 2.<sup>[108]</sup> Esta amina primária apresenta duas bandas em  $3095$  e  $3041\text{ cm}^{-1}$ , referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação N-H, respectivamente,<sup>[60]</sup> assim como as bandas referentes ao seu dobramento em  $1585$  e  $1540\text{ cm}^{-1}$ .<sup>[108]</sup>

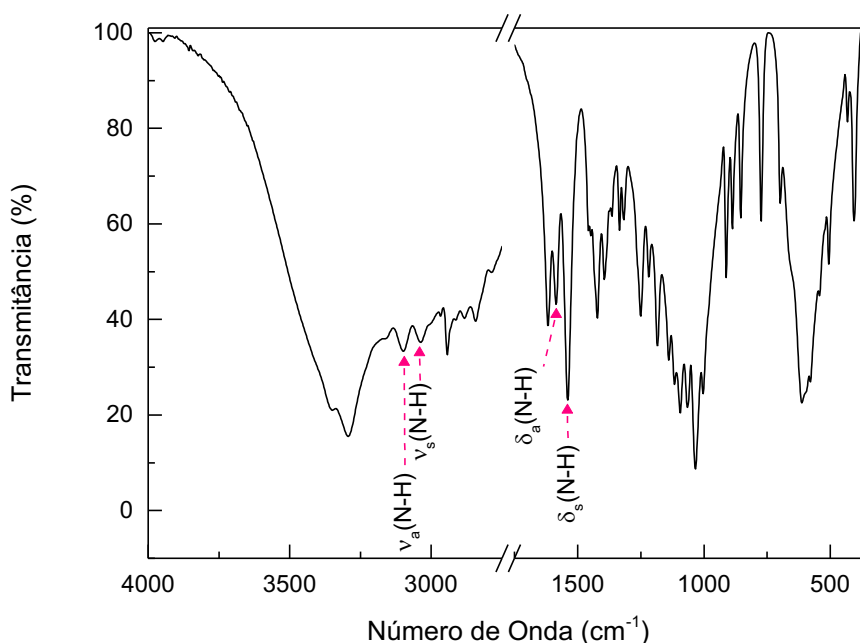


Figura 18 – Espectro infravermelho da glucosamina obtido na região de  $4000$  a  $2750\text{ cm}^{-1}$  e de  $1750$  a  $450\text{ cm}^{-1}$ . Em destaque, as bandas dos estiramentos e dobramentos da amina primária da glucosamina.

## 5 CONCLUSÃO

Dois complexos magnéticos nanoestruturados à base de óxido de ferro, funcionalizados com sulfato de condroitina (ION-ChS) ou glucosamina (ION-GLU), foram sintetizados com sucesso. Os diâmetros médios das nanopartículas (~ 8 nm e ~6 nm para ION-ChS e ION-GLU, respectivamente), obtidos a partir de imagens de microscopia eletrônica de transmissão, indicam que os nanomateriais são superparamagnéticos à temperatura ambiente, credenciando-os para aplicações biomédicas. Os nanocarreadores produzidos ION-ChS e ION-GLU apresentaram magnetização de saturação igual a 53 emu/g e 59 emu/g, respectivamente, compatível com os valores encontrados na literatura, para o método de síntese utilizado.

Por meio dos dados obtidos da análise termogravimétrica foi possível determinar o percentual mássico de ChS e GLU em cada complexo produzido (6,22% e 24,55%, respectivamente). Por outro lado, as técnicas espectroscópicas (Raman e infravermelho por transformada de Fourier), complementadas pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz e mobilidade eletroforética, permitiram monitorar o processo de funcionalização das nanopartículas com os glicosaminoglicanos. No caso dos nanocarreadores formados por nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com sulfato de condroitina, ocorre a coordenação entre o grupo carboxílico do glicosaminoglicano e o Fe da superfície da partícula. Por outro lado, para as nanopartículas funcionalizadas com glucosamina, inicialmente ocorre a coordenação monodentada do citrato (por meio dos seus grupos carboxílicos) com a superfície da nanopartícula e, em seguida, a conjugação com a glucosamina (por meio das reações intermediárias de EDC e NHS) formando uma amida entre a sua amina primária e o ácido carboxílico do ácido cítrico. A coordenação entre a superfície das nanopartículas e as moléculas alvo permite que os fluídos magnéticos sejam estáveis em meios biológicos, característica essencial para aplicação na área biomédica.

Os complexos nanoestruturados produzidos foram avaliados quanto à sua interiorização (*uptake*) e toxicidade em células de polpa dentária humana. Os experimentos de *uptake* celular comprovaram a interiorização das nanopartículas pelas células estudadas, alocando-se no citoplasma e próximo (ION-ChS) ou dentro (ION-GLU) do núcleo. Os resultados de viabilidade celular mostraram que os complexos nanoestruturados produzidos são altamente biocompatíveis, e que ocorre a modulação da biodisponibilidade dos

glicosaminoglicanos, tornando-os potenciais veiculadores de sulfato de condroitina ou glucosamina.

### **5.1 Perspectivas**

Em trabalhos futuros, é necessário avaliar o perfil de liberação dos glicosaminoglicanos transportados pelos complexos nanoestruturados, assim como o estudo da biodisponibilidade em sistemas *in vivo*. Ainda, deve-se estudar a sua influência em condrócitos, principalmente na produção da matriz extracelular cartilaginosa, podendo ser realizado por meio da análise da expressão gênica.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SOLER, M. A. G. et al. Superparamagnetic Iron Oxides. In: H.S.NALWA (Ed.). **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**: American Scientific Publishers, v.23, 2011. p.513-532.
- [2] PERÁN, M. et al. **Functionalized Nanostructures with Application in Regenerative Medicine**. International Journal of Molecular Sciences, v. 13, n. 3, p. 3847-3886, 2012.
- [3] HARABECH, M. E. A. **The effect of the magnetic nanoparticle's size dependence of the relaxation time constant on the specific loss power of magnetic nanoparticle hyperthermia**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 426, p. 206-210, 2017.
- [4] SOLER, M. A. G.; PATERNO, L. G. Nanomateriais Magnéticos. In: LEITE, F.; FERREIRA, M. e JR, O. N. O. (Ed.). **Nanociência e Nanotecnologia: Aplicações, Princípios e Nanoestruturas**. São Paulo: Elsevier, v.1, 2015. p.175-221.
- [5] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 11ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2008.
- [6] AOYAGI, M. et al. **Redox reactions of nitrite ions on the surface of colloidal magnetite particles coated with chondroitin sulfate**. Colloid & Polymer Science, v. 279, n. 1, p. 46-52, 2001.
- [7] GUILHERME, M. R. et al. **Smart hollow microspheres of chondroitin sulfate conjugates and magnetite nanoparticles for magnetic vector**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 352, n. 1, p. 107-113, 2010.
- [8] TÓTH, I. Y. et al. **Preparation and characterization of chondroitin - sulfate - A - coated magnetite nanoparticles for biomedical applications**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 380, p. 168-174, 2015.
- [9] VEERAPANDIAN, M.; YUN, K. **Synthesis of Silver Nanoclusters and Functionalization with Glucosamine for Glyconanoparticles**. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, v. 40, n. 1, p. 56-64, 2010.
- [10] MAINRECK, N. et al. **Rapid characterization of glycosaminoglycans using a combined approach by infrared and Raman microspectroscopies**. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100, n. 2, p. 441-450, 2011.
- [11] GROGAN, K. A.; CHANG, T. J.; SALK, R. S. **Update on viscosupplementation in the treatment of isteoarthritis of the foot and ankle**. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery, v. 26, n. 2, p. 199-204, 2009.
- [12] MATSUMOTO, Y. et al. **Development of a wound dressing composed of a hyaluronic acid sponge containing arginine**. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, v. 20, n. 7-8, p. 993-1004, 2009.

- [13] KREMER, M.; LANG, E.; BERGER, A. **Evaluation of dermal—epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra™ Artificial Skin)**. *British Journal of Plastic Surgery*, v. 53, n. 6, p. 459-465, 2000.
- [14] MILLER, K. L.; CLEGG, D. O. **Glucosamine and Chondroitin Sulfate**. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v. 37, n. 1, p. 103-+, 2011.
- [15] DECHANT, J. E. et al. **Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explant metabolism**. *Equine Veterinary Journal*, v. 37, n. 3, p. 227-231, 2005.
- [16] MUCCI, A.; SCHENETTI, L.; VOLPI, N. **<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin**. *Carbohydrate Polymers*, v. 41, n. 1, p. 37-45, 2000.
- [17] LARSSON, B.; NILSSON, M.; TJALVE, H. **The binding of inorganic and organic cations and H<sup>+</sup> to cartilage in vitro**. *Biochem Pharmacol*, v. 30, n. 21, p. 2963-70, 1981.
- [18] DAHMER, S.; SCHILLER, R. M. **Glucosamine**. *Am Fam Physician*, v. 78, n. 4, p. 471-6, 2008.
- [19] HUSKISSON, E. C. **Glucosamine and Chondroitin for Osteoarthritis**. *Journal of International Medical Research*, v. 36, n. 6, p. 1161-1179, 2008.
- [20] KIRKHAM, S. G.; SAMARASINGHE, R. K. **Review article: giucosamine**. *Journal of Orthopaedic Surgery*, v. 17, n. 1, p. 72-76, 2009.
- [21] CREAMER, P.; HOCHBERG, M. C. **Osteoarthritis**. *Lancet*, v. 350, n. 9076, p. 503-8, 1997.
- [22] HARLAN, R. S.; HAUT, R. C.; ORTH, M. W. **The Effect of Glucosamine and Chondroitin on Stressed Equine Cartilage Explants**. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 32, n. 1, p. 12-14, 2012.
- [23] BALI, J.-P.; COUSSE, H.; NEUZIL, E. **Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system**. *Seminars in arthritis and rheumatism*, v. 31, n. 1, p. 58-68, 2001.
- [24] HARDINGHAM, T. **Chondroitin sulfate and joint disease**. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 6, Supplement A, n. 0, p. 3-5, 1998.
- [25] HARDINGHAM, T. E.; FOSANG, A. J. **Proteoglycans: many forms and many functions**. *FASEB J*, v. 6, n. 3, p. 861-70, 1992.
- [26] TULLY, S. E.; RAWAT, M.; HSIEH-WILSON, L. C. **Discovery of a TNF- $\alpha$  Antagonist Using Chondroitin Sulfate Microarrays**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 24, p. 7740-7741, 2006.

- [27] LEGENDRE, F. et al. **Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1beta-stimulated chondrocytes--study in hypoxic alginate bead cultures.** *Osteoarthritis Cartilage*, v. 16, n. 1, p. 105-114, 2008.
- [28] CHEN, W.-C. et al. **Biological effects of oligosaccharide chondroitin sulfate C on human articular chondrocytes.** *Biomedical Engineering-Applications Basis Communications*, v. 23, n. 3, p. 245-252, 2011.
- [29] HUA, J.; SAKAMOTO, K.; NAGAOKA, I. **Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils.** *Journal of leukocyte biology*, v. 71, n. 4, p. 632-640, 2002.
- [30] FRISBIE, D. D. et al. **Assessment of Intravenous or intra-articular hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and N-acetyl-D-glucosamine (Polyglycan) in treatment of osteoarthritis using an equine experimental model.** *American Association of Equine Practitioners Annual Convention*, p. 61, 2009.
- [31] JACKSON, C. G. et al. **The human pharmacokinetics of oral ingestion of glucosamine and chondroitin sulfate taken separately or in combination.** *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 18, n. 3, p. 297-302, 2010.
- [32] SETNIKAR, I.; PACINI, M.; REVEL, L. **Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied in animal models.** *Arzneimittel-Forschung*, v. 41, n. 5, p. 542-545, 1991.
- [33] NAKAMURA, H. **Application of glucosamine on human disease—osteoarthritis.** *Carbohydrate Polymers*, v. 84, n. 2, p. 835-839, 2011.
- [34] WILSON, C. G. et al. **Glycosaminoglycan-functionalized gold nanorods: interactions with cardiac cells and type I collagen.** *Journal of Materials Chemistry*, v. 19, n. 35, p. 6332-6340, 2009.
- [35] VEERAPANDIAN, M. et al. **Glucosamine-functionalized silver glyconanoparticles: characterization and antibacterial activity.** *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 398, n. 2, p. 867-876, 2010.
- [36] JAIN, A. et al. **Targeting of diacerein loaded lipid nanoparticles to intra-articular cartilage using chondroitin sulfate as homing carrier for treatment of osteoarthritis in rats.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 10, n. 5, p. e1031-e1040,
- [37] ELMORE, W. C. **The Magnetization of Ferromagnetic Colloids.** *Physical Review*, v. 54, n. 12, p. 1092-1095, 1938.
- [38] BEAN, C. P.; LIVINGSTON, J. D. **Superparamagnetism.** *Journal of Applied Physics*, v. 30, n. 4, p. S120-S129, 1959.
- [39] CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 544pp.



- [40] KITTEL, C. **Theory of the Structure of Ferromagnetic Domains in Films and Small Particles**. *Physical Review*, v. 70, n. 11-1, p. 965-971, 1946.
- [41] SOLER, M. A. G. et al. **Superparamagnetic Iron Oxides**. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. H.S.NALWA: American Scientific Publishers. 23: 513-532 p. 2011.
- [42] NÉEL, L. **Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec application aux terres cuites**. *Annales de Géophysique*, v. 5, p. 99-136, 1949.
- [43] VERWEY, E.; HEILMANN, E. J. T. J. O. C. P. **Physical properties and cation arrangement of oxides with spinel structures I. Cation arrangement in spinels**. v. 15, n. 4, p. 174-180, 1947.
- [44] JENG, H. T.; GUO, G. Y. **First-principles investigations of the electronic structure and magnetocrystalline anisotropy in strained magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**. *Physical Review B*, v. 65, n. 9, 2002.
- [45] WILLARD, M. A. et al. **Chemically prepared magnetic nanoparticles**. *International Materials Reviews*, v. 49, n. 3-4, p. 125-170, 2004.
- [46] KHALAFALLA, S. E.; TEIMERS, G. W. **Magnetofluids and their Manufacture**. PATENT, U. S. United States of America 1973.
- [47] MASSART, R. **Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media**. *Ieee Transactions on Magnetics*, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981.
- [48] GUPTA, A. K.; GUPTA, M. **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications**. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.
- [49] RUSSEL, W. B.; SCHOWALTER, W. R.; SAVILLE, D. A. **Colloidal dispersions**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [50] ROSENSWEIG, R. E. **Ferrohydrodynamics**. New York: Dover Publications, 1985.
- [51] BACRI, J.-C. et al. **Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 85, n. 1-3, p. 27-32, 1990.
- [52] ALCÂNTARA, G. B. **Nanopartículas de Maguemita Complexadas com Ácido Oleico**. 2007. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Física). Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília.
- [53] SHAFI, K. V. P. M. et al. **Sonochemical synthesis of functionalized amorphous iron oxide nanoparticles**. *Langmuir*, v. 17, n. 16, p. 5093-5097, 2001.
- [54] SOLER, M. A. G. et al. **Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles**. *Surface Science*, v. 601, n. 18, p. 3921-3925, 2007.
- [55] LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C. Técnicas de preparação de nanopartículas magnéticas e fluídos magnéticos. In: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C. e MORAIS, P. C. (Ed.). **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações**. São Paulo: Artliber, 2006. p.83-99.

- [56] PATERNO, L. G. et al. **Magnetic Nanocomposites Fabricated via the Layer-by-Layer Approach**. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, n. 4, p. 2679-2685, 2010.
- [57] BECKER, A. L.; JOHNSTON, A. P. R.; CARUSO, F. **Layer-By-Layer-Assembled Capsules and Films for Therapeutic Delivery**. *Small*, v. 6, n. 17, 2010.
- [58] MU, B. et al. **Encapsulation of drug microparticles with self-assembled Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/alginate hybrid multilayers for targeted controlled release**. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 100B, n. 3, p. 825-831, 2012.
- [59] THÜNEMANN, A. F. et al. **Maghemite Nanoparticles Protectively Coated with Poly(ethylene imine) and Poly(ethylene oxide)-block-poly(glutamic acid)**. *Langmuir*, v. 22, n. 5, p. 2351-2357, 2006.
- [60] PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy**. 5th edition. Stamford, CT: Cengage Learning, 2015. 690p.
- [61] MILLER, F. A.; MAYO, D. W.; HANNAH, R. W. **Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra**. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2004. 567pp.
- [62] NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry**. John Wiley & Sons, 2008.
- [63] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th ed. John Wiley & Sons, 2005. 550pp.
- [64] FERRARO, J.; NAKAKMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002.
- [65] SHEBANOVA, O. N.; LAZOR, P. **Raman spectroscopic study of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): a new assignment for the vibrational spectrum**. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 174, n. 2, p. 424-430, 2003.
- [66] SOLER, M. A. G.; FANYAO, Q. **Raman Spectroscopy of Iron Oxide Nanoparticles**. In: KUMAR, C. S. S. R. (Ed.). **Raman Spectroscopy of Nanomaterials Characterization**. Berlin: Springer, 2012. p.379-416.
- [67] MORAIS, P. C. et al. **Raman study of ionic water-based copper and zinc ferrite magnetic fluids**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 201, p. 105-109, 1999.
- [68] MORAIS, P. C. et al. **Raman spectroscopy in magnetic fluids**. *Biomolecular Engineering*, v. 17, n. 2, p. 41-49, 2001.
- [69] MORAIS, P. C. et al. **Raman investigation of uncoated and coated magnetic fluids**. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 104, n. 13, p. 2894-2896, 2000.
- [70] MORAIS, P. C. et al. **Raman spectroscopy in oleoylsarcosine-coated magnetic fluids: A surface grafting investigation**. *Ieee Transactions on Magnetics*, v. 36, n. 5, p. 3712-3714, 2000.

- [71] JACINTHO, G. V. M. et al. **Structural Investigation of MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co) Magnetic Fluids**. Journal of Physical Chemistry C, v. 113, n. 18, p. 7684-7691, 2009.
- [72] SOLER, M. A. G. et al. **Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro Raman spectroscopy**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 272, p. 2357-2358, 2004.
- [73] SARTORATTO, P. P. C. et al. **Size-modulation of thermally-annealed nanosized cobalt ferrite particles**. In: YAMAGUCHI, H. (Ed.). **12th International Conference on Magnetic Fluids Icmf12**, v.9, 2010. p.10-14.
- [74] DA SILVA, S. W. et al. **Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: A Raman spectroscopy investigation**. Ieee Transactions on Magnetics, v. 39, n. 5, p. 2645-2647, 2003.
- [75] 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.
- [76] MELO, T. F. O. et al. **Investigation of surface passivation process on magnetic nanoparticles by Raman spectroscopy**. Surface Science, v. 600, n. 18, p. 3642-3645, 2006.
- [77] VIALI, W. R. et al. **Investigation of the Molecular Surface Coating on the Stability of Insulating Magnetic Oils**. Journal of Physical Chemistry C, v. 114, n. 1, p. 179-188, 2010.
- [78] SOLER, M. A. G. et al. **Spectroscopic Study of Maghemite Nanoparticles Surface-Grafted with DMSA**. Journal of Physical Chemistry A, v. 115, n. 6, p. 1003-1008, 2011.
- [79] PEDROZA, R. C. et al. **Raman study of nanoparticle-template interaction in a CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>-based nanocomposite prepared by sol-gel method**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 289, p. 139-141, 2005.
- [80] PATERNO, L. G. et al. **Tuning of Magnetic Dipolar Interactions of Maghemite Nanoparticles Embedded in Polyelectrolyte Layer-by-Layer Films**. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 12, n. 8, p. 6672-6678, 2012.
- [81] DA SILVA, S. W. et al. **Raman spectroscopy of cobalt ferrite nanocomposite in silica matrix prepared by sol-gel method**. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 352, n. 9-20, p. 1602-1606, 2006.
- [82] 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.
- [83] SANTANA, J. F. B. et al. **Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyldextran and blood cells using Raman spectroscopy**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 289, p. 452-454, 2005.
- [84] DE FARIA, D. L. A.; VENÂNCIO SILVA, S.; DE OLIVEIRA, M. T. **Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides**. Journal of Raman Spectroscopy, v. 28, n. 11, p. 873-878, 1997.

- [85] WHITE, W. B.; DEANGELIS, B. A. **Interpretation of the vibrational spectra of spinels.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, v. 23, n. 4, p. 985-995, 1967.
- [86] SRIVASTAVA, M. et al. **Synthesis of superparamagnetic bare Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanostructures and core/shell (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/alginate) nanocomposites.** *Carbohydrate Polymers*, v. 89, n. 3, p. 821-829, 2012.
- [87] CHAMRITSKI, I.; BURNS, G. **Infrared- and Raman-active phonons of magnetite, maghemite, and hematite: a computer simulation and spectroscopic study.** *Journal of Physical Chemistry B*, v. 109, n. 11, p. 4965-8, 2005.
- [88] DEACON, G.; PHILLIPS, R. **Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination.** *Coordination Chemistry Reviews*, v. 33, n. 3, p. 227-250, 1980.
- [89] NGO, A. T.; PILENI, M. P. **Nanoparticles of Cobalt Ferrite: Influence of the Applied Field on the Organization of the Nanocrystals on a Substrate and on Their Magnetic Properties.** *Advanced Materials*, v. 12, n. 4, p. 276-279, 2000.
- [90] STURGES, H. A. **The Choice of a Class Interval.** *Journal of the American Statistical Association*, v. 21, n. 153, p. 65-66, 1926.
- [91] BERNE, B. J.; PECORA, R. J. M., NY: DOVER PUBLICATIONS. **Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics.** 2000. v. 376,
- [92] COATS, A. W.; REDFERN, J. P. **Thermogravimetric analysis. A review.** *Analyst*, v. 88, n. 1053, p. 906-924, 1963.
- [93] SITTAMPALAM, G. S. et al. **Assay guidance manual.** 2004.
- [94] SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRÄULI, U. **Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 77, p. 383-393, 1963.
- [95] MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.
- [96] BANSIL, R.; YANNAS, I. V.; STANLEY, H. E. **Raman Spectroscopy: A structural probe of glycosaminoglycans.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 541, n. 4, p. 535-542, 1978.
- [97] ORR, S. F. **Infra-red spectroscopic studies of some polysaccharides.** *Biochim Biophys Acta*, v. 14, n. 2, p. 173-81, 1954.
- [98] MATHEWS, M. B. **Isomeric chondroitin sulphates.** *Nature*, v. 181, n. 4606, p. 421-2, 1958.

- [99] DANISHEFSKY, I.; BELLA, A., JR. **The sulfated mucopolysaccharides from human umbilical cord.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 241, n. 1, p. 143-6, 1966.
- [100] TERHO, T.; HARTIALA, K.; HAKKINEN, I. **Infrared spectroscopic investigations of a new acid mucopolysaccharide isolated from human gastric juice.** *Nature*, v. 211, n. 5045, p. 198-9, 1966.
- [101] KIRILLOVA, S. G.; ANDRIANOV, V. M.; ZHBANKOV, R. G. **Effect of the Pyranose Ring Conformation on the Vibrational Spectra of Sugar Epoxides.** *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 70, n. 3, p. 355-364, 2003.
- [102] MOREIRA, J. C. et al. **Determinação das constantes K e a da equação de Mark-Houwink de poli(p-acetóxiestireno).** *Polímeros*, v. 14, p. 80-82, 2004.
- [103] MASUELLI, M. A. **Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures.** *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, v. 2, n. 2, p. 37-43, 2014.
- [104] WASTESON, A. **Properties of fractionated chondroitin sulphate from ox nasal septa.** *Biochem J*, v. 122, n. 4, p. 477-85, 1971.
- [105] BELL, A. F.; HECHT, L.; BARRON, L. D. **Disaccharide Solution Stereochemistry from Vibrational Raman Optical Activity.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 116, n. 12, p. 5155-5161, 1994.
- [106] SHE, C. Y.; DINH, N. D.; TU, A. T. **Laser raman scattering of glucosamine N-acetylglucosamine, and glucuronic acid.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 372, n. 2, p. 345-357, 1974.
- [107] VASKO, P. D.; BLACKWELL, J.; KOENIG, J. L. **Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates.** *Carbohydrate Research*, v. 19, n. 3, p. 297-310, 1971.
- [108] FOOT, M.; MULHOLLAND, M. **Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, n. 3, p. 397-407, 2005.

## APÊNDICE 1 – ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO

Segue a lista dos três artigos em que houve contribuição técnico-científica durante o período do doutorado para o desenvolvimento desses:

FILHO J, S. et al. **Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) model.** Environmental Research, v. 134, p. 9-16, **2014**.

SILVEIRA, A. P. et al. **Physicochemical characteristics and antibacterial effects of silver nanoparticles produced using the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*.** Materials Chemistry and Physics, v. 216, p. 476-484, **2018**.

COSTA, Í. A. et al. **Photocatalytic Method for the Simultaneous Synthesis and Immobilization of Ag Nanoparticles onto Solid Substrates.** The Journal of Physical Chemistry C, v. 122, n. 42, p. 24110-24119, **2018**.