

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

SACHA BRAUN CHAVES

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
RECOBERTAS POR BICAMADA DE ÁCIDO LÁURICO: ESTUDOS *IN VITRO*
E *IN VIVO***

Brasília – DF

2008

SACHA BRAUN CHAVES

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
RECOBERTAS POR BICAMADA DE ÁCIDO LÁURICO: ESTUDOS *IN VITRO*
E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia animal, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, como requisito ao Doutorado em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília – DF

2008

Sacha Braun Chaves

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
RECOBERTAS POR BICAMADA DE ÁCIDO LÁURICO: ESTUDOS *IN VITRO*
E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia animal, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, como requisito ao Doutorado em Biologia Animal.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr.

Universidade

Prof. Dr.

Universidade

Prof. Dr.

Universidade

Prof. Dr.

Universidade

Brasília, _____ de _____ de 2008.

À Deus, essa misteriosa fonte de vida!

Aos meus pais, José e Maria! É uma honra compartilhar seu material genético!

À minha esposa Lane, por ser meu farol em dias tempestuosos e meu sol nos belos dias.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pela orientação, amizade e paciência. Chefe, eu sei que sou difícil mesmo!

A professora do Laboratório de Genética, Dra. Zulmira Guerrero Lacava Marques, pelo incentivo, convívio e amizade.

A minha esposa, Lane, que sempre me apoiou nos piores momentos. Você foi o achado da minha vida.

Aos professores Sebastião e Emília, não só pela oportunidade de trabalho como também pela orientação.

Ao grande Erich, o grande trabalhador nesta jornada. Muito deste trabalho foi mérito do seu esforço.

A professora Sônia do laboratório de microscopia eletrônica da UnB, pela utilização dos microscópios de luz e eletrônico de transmissão.

Aos professores Osni e Fernando, do laboratório de ressonância da UFG, pela utilização do equipamento. Obrigado professores pela paciência conosco.

Aos colegas do grupo do laboratório: Carol, Grazi, Jack, JP, Maitê, Mônica, Nat, Paty, Shélida e Tatá, pelo agradabilíssimo ambiente de trabalho que vocês proporcionam. Com vocês aí fica tudo mais fácil

Ao grande Djalma, sempre prestativo quando pôde.

As colegas do grupo do laboratório de Genética: Neda, Flávia, Danielle, Júlia, Camila e Luciana, pelo apoio constante, convívio e amizade.

Aos amigos que mesmo distantes comemoram comigo cada conquista.

Aos meus Pais, que sempre souberam me guiar na jornada da vida

À minha sobrinha, Maria Eduarda, cujo nascimento mostrou como a vida pode ser perfeita.

A CAPES, FINATEC e Rede NANOBIOTEC pelo auxílio para a realização desta pesquisa.

E a todos que, de uma forma ou de outra, participaram para que este projeto fosse realizado.

RESUMO

Nanomateriais, devido a suas peculiares propriedades físicas, são promissores agentes de utilização biomédica. Nanopartículas magnéticas (NPM) recobertas por dupla camada de ácido láurico (AL-NPM) foram testados tiveram sua citotoxicidade avaliada *in vitro* em células mesangiais (CHMI), fibroblastos (FHN) e macrófagos peritoneais, exibindo diminuição na viabilidade celular apenas em macrófagos, quando tratados com altas doses de AL-NPM. Testes *in vivo* demonstraram a presença de NPM em baço, pulmão e fígado de camundongos machos swiss submetidos a injeções endovenosas de AL-NPM. Os órgãos não apresentaram alterações morfológicas graves. Análise em microscopia de luz e eletrônica de transmissão mostram um grande acúmulo de NPM em pulmão de animais em tempos iniciais (5 e 30 minutos), enquanto que baço e fígado exibiram grandes concentrações apenas nos tempos mais tardios (1 dia e 1 mês). O teste do micronúcleo em eritrócitos jovens recolhidos da medula óssea demonstra que AL-NPM não são genotóxicos, mas demonstram leve genotoxicidade. Animais experimentais submetidos à atração magnética por um campo externo demonstram NPM no tecido do cérebro, sem causar alterações adversas no órgão. O FM contendo AL-NPM mostrando um promissor material a ser usado em aplicações biomédicas, uma vez que demonstrou baixa toxicidade em células e tecidos, ausência de genotoxicidade e capacidade de sofrer atração magnética por um campo externo.

Palavras-chaves: Nanomateriais, nanopartículas magnéticas, flúido magnético, campo magnético, biocompatibilidade, biodistribuição, ácido láurico.

ABSTRACT

Nanomaterials, due to its unique physical properties, are promising agents for biomedical use. Magnetic nanoparticles (MNP) covered with double layer of lauric acid (LA-MNP) were tested had their cytotoxicity evaluated in vitro mesangial cells (CHMI), fibroblasts (FHN) and peritoneal macrophages, showing decrease in cell viability only in macrophages, when treated with high doses of LA-MNP. In vivo tests showed the presence of MNP in spleen, lungs and liver of male mice swiss undergoing intravenous injections of LA-MNP, all in magnetic resonance and microscopy analyses. No morphological changes were noted in organs . Analysis by light and transmission electron microscopy show a large accumulation of MNP in lung of animals in early times (5 to 30 minutes), while spleen and liver showed high concentrations only in later times (1 day and 1 month). The micronucleus test of a young red blood cells collected from bone marrow shows that LA-MNP are not genotoxic, but showed mild citotoxicity. Animals undergoing experimental magnetic attraction with a external field show LA-MNP in the brain tissue, without causing changes in organs. The FM containing LA-MNP showing a promising material for use in biomedical applications, since it has low toxicity to cells and tissues, lack of genotoxicity, and ability to suffer magnetic attraction by an external field.

Keywords: Nanomaterials, magnetic nanoparticles, flúido magnetic, magnetic field, bio compatibility, biodistribution, lauric acid.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Nanomateriais	18
1.2	Nanopartículas	20
1.3	Revestimento das nanopartículas magnéticas	21
1.4	Aplicações biológicas dos Fluidos Magnéticos	23
1.5	Testes Biológicos	28
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivos gerais	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
3.1	Fluido magnético	34
3.2	Testes in vitro	36
3.2.1	Tipos celulares.....	36
3.2.2	Grupos experimentais.....	36
3.2.3	Reagentes	38
3.2.4	Procedimentos para cultura de células	38
3.2.5	Teste do MTT	39
3.2.6	Testes estatísticos	39
3.3	Testes in vivo - Biodistribuição por Ressonância Magnética.....	40
3.3.1	Animais experimentais.....	40
3.3.2	Grupos experimentais.....	40
3.3.3	Métodos.....	41

3.4	Testes in vivo - Biodistribuição por microscopia de Luz e Eletrônica ..	41
3.4.1	Grupos experimentais.....	41
3.4.2	Microscopia de Luz.....	42
3.4.3	Microscopia eletrônica de Transmissão.....	46
3.4.4	Micronúcleo	50
3.4.5	Campo magnético.....	51
4	RESULTADOS	55
4.1	In vitro – MTT	56
4.2	In Vivo	58
4.2.1	Ressonância Magnética	58
4.2.2	Morfologia - Microscopia de Luz e Microscopia eletrônica de Transmissão	60
4.2.3	Micronúcleo	79
4.2.4	Campo magnético.....	80
5	DISCUSSÃO.....	84
6	Conclusão.....	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8	APÊNDICE	108
8.1	Síntese de AL-NPM.....	109
8.1.1	Síntese da Magnetita (Fe_3O_4).....	109
8.1.2	Síntese da Maguemita (γ - Fe_2O_3).....	109
8.1.3	Preparação das partículas de maguemita funcionalizadas com monocamada de laurato	110
8.1.4	Preparação das partículas de maguemita funcionalizadas com bicamada de laurato. (AL - NMP)	110
8.1.5	Modelo de AL-MNP	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: Principais características físico-químicas da amostra de FM-AL ..	35
Tabela 3-2: Diâmetro hidrodinâmico de AL-NPM quando misturados em meio de cultura.....	35
Tabela 3-3: Listagem dos grupos experimentais em cultura de célula e respectivas siglas	37
Tabela 3-4: Listagem dos tempos experimentais e respectivas siglas	42
Tabela 3-5: Listagem dos grupos experimentais com campo magnético e respectivos tratamentos.	54
Tabela 4-1: Presença de ferro em quantidades mensuráveis pelo equipamento de ressonância magnética. Presença (+) ou ausência (-) de ferro.....	59
Tabela 4-2 - Efeitos do tratamento de camundongos com AL-NPM na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos. As células foram coletadas após o tratamento de 12h (G4), 24h (G5), 1 semana (G6) e 1 mês (G7).	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 - Esquema geral dos constituintes de um FM	21
Figura 1-2 - Ressonância magnética do crânio de voluntários antes (a1 e a2) e depois (b1 e b2) da injeção de FM. Em todas as figuras o linfonodo (ponta da seta) pode ser observado. Note que em b1 todo o linfonodo absorve as NPM, exibindo um contraste diferente de a1. Compare com b2, cujo linfonodo exibe as regiões com câncer que não absorvem as NPM, mantendo o contraste de a2. (Reproduzido de Russell, et al., 2007)	26

Figura 3-1 - Fotomicrografia de um esfregaço de fluido magnético contendo nanopartículas magnética recoberta por dupla camada de ácido láurico em uma tela de microscopia eletrônica recoberta por Formvar.	34
Figura 3-2 - Modelos esquemáticos da molécula de ácido láurico	112
Figura 3-3 - Figuras ilustrativas do arranjo molecular encontrado em AL-MNP com monocamada de ácido láurico (A) e bicamada (B).	112
Figura 3-4 - Desenho esquemático do planejamento do experimento usando células da linhagem de fibroblasto humano.	38
Figura 3-5 - Foto do sistema de campo magnético usando uma bobina de Helmholtz.	52
Figura 3-6 - Foto mostrando o posicionamento de um animal no centro da bobina de Helmholtz.....	53
Figura 4-1 - Fotomicrografia de poços de cultura de macrófagos peritoneais de MAC-CON e MAC-03. As NPM (setas) podem ser notadas dentro das células ou em aglomerados externos na forma de massas de cor marrom.	56
Figura 4-2 - Viabilidade celular de células mesangiais (CHMI) em A e fibroblastos (FIBR) em B, quando tratados por 24 horas com concentrações alternadas de AL-NPM. Resultados comparados com o teste t de <i>Student</i> , $P \leq 0,05$	57
Figura 4-3 - Viabilidade celular de macrófagos peritoneais (MAC) quando tratados por 24 horas com concentrações alternadas de AL-NPM. Resultados comparados com o teste t de <i>Student</i> . (* = valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) do grupo controle MAC-CON).....	58
Figura 4-4 - Espectros de ressonância magnética de amostras de fígado e pulmão G24h.....	59
Figura 4-5 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Em A e B grupo controle e em C, D E e F grupo experimental 5 minutos. Aglomerados de NPM (setas) podem ser observados distribuídos no tecido pulmonar. Coloração por H&E. Vaso sanguíneo (VS), álveolo (A) e septo alveolar (SA).....	61
Figura 4-6 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Em A e B grupo experimental 30 minutos, C e D grupo experimental 2 horas e em E e F grupo experimental 12 horas. As NPM podem ser observadas na forma de aglomerados marrons ou azuis (setas). O	

parênquima do tecido exibe um espessamento decrescente a partir de A (*). Note a menor quantidade de partícula no parênquima do tecido a partir da foto C. Coloração por H&E (C e E) e Perls (A,B,D e F).....	62
Figura 4-7 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Em A G5, B G6, C, D, E e F G7. As NPM, na forma de aglomerados marrons (coloração por H&E) ou azuis (coloração de Perls), estão apontadas por setas. Note a menor quantidade de partícula no parênquima do tecido em relação à prancha anterior. Coloração por H&E (C e F) e Perls (A,B,D e E).	64
Figura 4-8 - Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos do grupo G3 vistas no microscópio de luz (A) e eletrônico de transmissão (B, C e D). Em B, detalhe de NPM dentro de vasos sanguíneos (VS) localizados no septo alveolar. Em C temos uma ampliação semelhante a área mostrada em A, mostrando a presença de NPM na parênquima do tecido (setas) entre dois pneumócitos do tipo I (P1). Em D, uma ampliação da área mostrada na foto anterior, mostrando detalhes das NPM.	65
Figura 4-9 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos. O grupo G1 (5 minutos) pode ser observado em A, B, C, e D. Existe uma marcação para Ferro (setas) pelo método de pelrs na polpa vermelha (PV) do órgão, ausente na polpa branca (PB). Note que uma marcação semelhante é notada nos animais do grupo controle (E e F). Coloração por H&E (A e C) e Perls (B, D, E e F).	67
Figura 4-10 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos corados pelo método de Perls. O grupo G2 (30 minutos) pode ser observado em A e B; G3 (2 horas) em C, G4 (12 horas) em D; G5 (1 dia) em E e F. Existe uma marcação para Ferro (setas) pelo método de Pelrs na polpa vermelha (PV) do órgão que aumenta na seqüência de fotos. Note a marcação de Ferro (*) dentro da polpa branca (PB) em E e F.....	68
Figura 4-11 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos corados pelo método de Perls do grupo G6 (1 semana). Existe uma forte marcação para Ferro (azul) na polpa vermelha (PV) do. Note também a marcação de Ferro (seta) dentro da polpa branca (PB) em F.	69
Figura 4-12 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos corados por H&E (C) e pelo método de Perls (A, B e D) do grupo G7(1 mês).	

Note a marcação para Ferro (setas) na polpa vermelha (PV) e na polpa branca (PB).	70
Figura 4-13 - Fotomicrografia de cortes de baço de camundongos do grupo G6 vistas no microscópio de luz (A) e eletrônico de transmissão (B, C e D). Em B temos uma ampliação semelhante à área correspondente a polpa branca de A (PB), mostrando a presença de leucócitos no parênquima do tecido (Leu). Em C, uma ampliação da área contornada em B, mostrando detalhes da presença de NPM (setas) nos espaços extracelulares (E) e no citoplasma das células (Ctp). Em D temos uma ampliação semelhante a polpa vermelha de A (PV), mostrando NPM nos sinusóides (S) e no citoplasma das células (Ctp).	71
Figura 4-14 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos. O grupo GC (controle) pode ser observado em A, B e C; G1 (5 minutos) em D; G2 (30 minutos) em E e F. A unidade funcional do fígado está contornado em A, com uma veia central (VC) no centro e vasos do espaço porta (EP) na periferia. Os capilares sinusóides (S) estão paralelos a cordões de hepatócitos (H). Células de Kupffer (K) podem ser notados na luz dos sinusóides. A presença de NPM (seta) pode ser percebida a partir da foto D. Coloração por H&E (A e C) e Perls (B, D, E e F).	73
Figura 4-15 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos. O grupo G3 (2 horas) pode ser observado em A e B; G4 (12 horas) em C; G5 (1 dia) em D, E e F. As NPM podem ser percebidas na forma de aglomerados marrons (H&E) e azuis (Perls) dentro de células de Kupffer (setas) ou infiltrados inflamatórios (*). Coloração por H&E (A, B, C e F) e Perls (D e E).	75
Figura 4-16 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos. O grupo G6 (1 semana) pode ser observado em A e B; G7 (1 mês) em C, D, E e F. As NPM (setas) podem ser percebidas na forma de aglomerados marrons (H&E) e azuis (Perls) dentro de células de Kupffer ou no conjuntivo associado a vasos (setas). Coloração por H&E (F) e Perls (A, B, C, D e E).	77
Figura 4-17 - Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos do grupo G6 (1 semana) observados ao microscópio eletrônico de transmissão. Em A é possível observar um hepatócito com pequenos aglomerados de NPM (setas) no seu citoplasma. Em B, uma ampliação da área semelhante mostrando	

detalhes das NPM. Em C e D uma célula de Kupffer é mostrada contendo numerosos aglomerados de NPM (setas) no seu citoplasma.	78
Figura 4-18 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Animais submetidos ao campo magnético direcionado para o tórax (A, B, C e D) exibiram grandes aglomerados de NPM (setas) marrons (coloração por H&E) ou azuis (coloração de Perls) em vasos de médio calibre. Compare com as fotos de animais sem tratamento com campo, G1 (E) e G2 (F). Coloração por H&E (C, D e E) e Perls (A, B, C, D e E).	81
Figura 4-19 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos corados pelo método de Perls. Animais injetados e sem tratamento TRAT03 não apresentam NPM no cerebelo (A) e cérebro (B). Animais do grupo TRAT01 (C, D, E e F). Em A, corte histológico de seção do cerebelo, e em B seção seguinte quando desprezado 50 µm. Em C corte histológico de seção de cérebro, e em B seção seguinte quando desprezado 50µm. Grande aglomerados de NPM (setas) pode ser percebido na substância branca dos órgãos. Compare com as fotos de animais sem tratamento com campo (cerebelo em E e cérebro em F). SB = substância cinza, CM = camada molecular, CG = camada granular, SB = substância branca.....	83
Figura 5-1 - Figuras esquemáticas mostrando o campo magnético gerado no experimento (A) e o modelo proposto (B).	93

ABREVIações

AL-NPM – Nanopartículas magnéticas revestidas por dupla camada de ácido láurico

CHMI - Célula mesangial de rim humano

D_h – Diâmetro hidrodinâmico

D-MEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSA - Ácido 2,3 dimercaptosuccinico

DMSO - Dimethyl sulfoxide

ENC - Eritrócitos normocromáticos

EPC - Eritrócitos policromáticos

FHN - Linhagem de fibroblastos normais humanos

FM - Fluido magnético

IQUEGO – Instituto de química do Goiás

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

ML - Microscopia de luz

MN - Micronúcleo

MTT - 3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

NPM - Nanopartículas magnéticas

RF - Ressonância Ferromagnética

RM - Ressonância magnética

SFB – Soro fetal bovino

T - Tesla

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanomateriais

Nanomateriais são comumente descritos como compostos que possuem menos de 1 micrômetro em um de seus eixos. Embora não haja consenso entre os autores, muitos consideram que materiais de dimensões entre 100 a 1 nm se adequam melhor a esta definição (Liu e Thomas 2007). O interesse crescente por esta área decorre sobretudo do fato de que materiais em escala nanométrica apresentam características novas que possibilitam o seu emprego em diversas aplicações (PARK 2007). Essas novas propriedades dos nanomateriais devem-se a dois fatores principais: O efeito quântico e o efeito de superfície. O efeito quântico é aquele que irá determinar o comportamento dos átomos e dos elétrons e, quando em dimensões nanométricas, manifesta-se de maneira mais evidente. Quanto menor for o tamanho do material, mais importantes são os efeitos de superfície, devido ao aumento da razão entre o número de átomos que estão em sua superfície em relação àqueles dispersos por seu volume, o que provoca um aumento significativo na sua reatividade (SCHULTE, WILEY e SONS 2005, PARK 2007, Roach, et al. 2007).

Materiais reduzidos para a escala nanométrica (micro escala) exibem características muito diferentes daqueles nas dimensões microscópicas (macro escala) permitindo assim uma vasta gama de novas aplicações. Como exemplo destas novas propriedades obtidas na escala nanométrica, temos substâncias opacas que se tornam transparentes, como no caso do cobre; alguns materiais inertes que se tornam catalíticos, como a platina e o ouro; certos materiais estáveis tornam-se combustíveis, como o alumínio; e algumas substâncias sólidas tornam-se líquidas à temperatura ambiente, como também ocorre com o ouro (SCHULTE, WILEY e SONS 2005).

Os Nanomateriais são empregados para diversas aplicações no campo industrial (HONG e YI 2007, SCHULTE, WILEY e SONS 2005, PARK 2007) como *abrasivos*, pois apresentam eficácia superior em aplicações abrasivas e polimento quando adequadamente dispersos. A dimensão das partículas ultrafinas e de distribuição de produtos adequadamente dispersos é praticamente inigualável por quaisquer outras disponíveis e como resultado, uma redução significativa do tamanho de defeitos superficiais em comparação com os convencionais materiais abrasivos; *catalisadores*, Nanomateriais possuem grande superfície de contato, como o dióxido de Titânio e o paládio; nos *cosméticos*, os nanomateriais proporcionam alta atenuação UV, sem a utilização de produtos químicos, e proporcionam transparência à luz visível quando necessário, e pode ser uniformemente disperso em uma ampla gama de produtos cosméticos; Nos *dispositivos eletrônicos* os nanomateriais podem fornecer produtos de condução elétricas mais eficientes. As *propriedades magnéticas* das nanopartículas são utilizadas para novas aplicações, utilizando principalmente o óxido de ferro; Os nanomateriais podem ser usados como *pigmentos e vernizes* por proporcionarem uma alta atenuação da radiação UV, proporcionam transparência quando desejado e podem ser uniformemente disperso em uma ampla gama de materiais fornecendo cores mais vivas que resistem melhor à deterioração; As nanopartículas podem ser utilizadas na produção de peças de *cerâmica* (FRIEBE, et al. 2007). Atualmente, nanomateriais são utilizados também nas ciências biomédicas, como por exemplo, biosensores (Wang 2005), vacinas de longa duração (SAI, SWARTZ e JEFFREY 2006).

São comumente consideradas duas classes principais de nanomateriais: os fulerenos, formados por compostos alótropos de carbono, como os nanotubos de carbono e os “buckyballs”; e as nanopartículas.

1.2 Nanopartículas

As nanopartículas são materiais nanoestruturados com diâmetro médio variando de 100 a 1 nm (BULTE e KRAITCHMAN 2004). Estes produtos são de interesse para pesquisa, uma vez que nesta escala de tamanho novas propriedades podem ser observadas, tais como confinamento quântico em semicondutores e superparamagnetismo em materiais magnéticos (Roach, et al. 2007). Sendo assim, as nanopartículas apresentam propriedades especiais em mecânica, óptica, eletrônica, química e bioquímica quando em nanoescala e, portanto, fundamentais para a criação de nanoestruturas.

São exemplos de nanopartículas os nanoestruturados, como as nanoesferas, os pontos quânticos (quantum dots) e as nanorredes (BALLOU, et al. 2004, XIANG, et al. 2006, YAMAMOTO, et al. 2005), e as nanopartículas metálicas (NPM).

As NPM são definidas como monodomínios magnéticos isoladas com tamanho variando entre 1 a 50 nm e revestidas por coberturas protetoras (VEKAS, BICA e AVDEEV 2007). Tipicamente, utilizam-se partículas com o núcleo metálico imersos em um líquido dispersante, no sistema chamado de

fluido magnético (FM), como exemplificado na Figura 1-1 (BAKUZIS, MORAIS e PELEGRENI 1999).

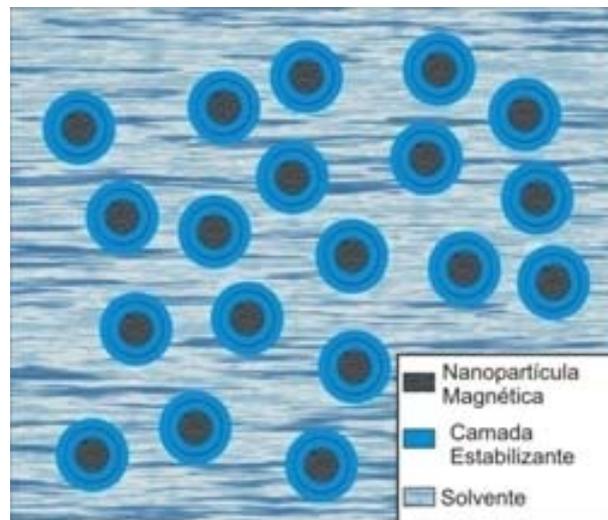


Figura 1-1 - Esquema geral dos constituintes de um FM

Quando consideramos o emprego de NPM para as biociências, dois fatores devem ser levados em consideração: a natureza química da partícula e a cobertura

1.3 Revestimento das nanopartículas magnéticas

O revestimento das NPM sempre foi motivo de estudos, já que é um fator determinante tanto pela estabilidade do FM, bem como as interações das partículas com o organismo (Racuciu, et al. 2007, Kim, et al. 2006).

As NPM tendem a formar naturalmente aglomerados na solução dispersante, especialmente se permanecerem em repouso por um grande período, levando a dois fenômenos: a floculação (pequenos agregados de NPM) ou coagulação (agregações mais densas). Uma das funções da camada

estabilizante é justamente evitar essa aglomeração, prolongando a estabilidade das NPM por um período maior de tempo (SHAW 1975).

Além de permitir um melhor equilíbrio das NPM no meio empregado, a cobertura executa um importante papel no reconhecimento da partícula pelo sistema de defesa do organismo. Cada sistema NPM-cobertura possuem uma resposta diferente ao organismo. No grupo de Nanobiotecnologia (Cnano) já foram estudados diversos tipos de FM contendo NPM com diversas coberturas estabilizantes. As NPM recobertas por citrato foram objeto de estudo por Lacava e colaboradores (Lacava, et al. 1999), que relataram uma maciça resposta imune no parênquima de baço de camundongos submetidos a injeções endovenosa de Citrato-FM. Já a cobertura de dextran mostrou-se biocompatível, sem resposta imune aparente no mesmo órgão, também em camundongos submetidos a tratamento similar. Em trabalhos posteriores, NPM recoberta por dextran foi observado no tecido hepático de camundongos injetados endovenosamente por até 6 meses após a injeção, sem causar efeitos visíveis (Lacava, et al. 2004). NPM recobertas por ácido poliaspártico (Sadeghiani, et al. 2005) foram observas em fígado, baço e pulmão, sem que estes órgãos exibissem alterações morfológicas. Nos estudos com a cobertura de DMSA (ácido 2,3 dimercaptosuccinico) (Chaves, et al. 2005, Garcia, et al. 2005), uma pequena resposta inflamatória associada à partícula foi detectada, com regressão do quadro em tempos de até 90 dias.

É interessante também notar que a distribuição das NPM é alterada com o emprego de diferentes coberturas, o que demonstra a afinidade das NPM a determinado tipos celulares ou tecidos é obtido alternando a molécula de revestimento. A cobertura de dextran demonstrou um grande tempo de

retenção no sangue com conseguinte deposição no fígado e baço de camundongos (LACAVA, et al. 2002). Já o DMSA mostrou um rápido deslocamento de NPM do sangue para pulmão, em um tempo inicial, e para fígado e baço em uma situação mais tardia (CHAVES, et al. 2002).

O ácido láurico (AL) é outra possibilidade de agente estabilizante. Consiste de um ácido graxo saturado de cadeia média possuindo 12 carbonos na sua estrutura. É amplamente utilizado na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica apresentando toxicidade apenas em doses altas (LIMA, et al. 2002). Diversos grupos utilizam o ácido láurico como agente estabilizante de NPM (VEKAS, BICA e AVDEEV 2007). Em um estudo recente (PRADHAN, et al. 2007), NPM de magnetitas recobertas por ácido láurico não exibiram citotoxicidade em culturas de fibroblasto de camundongos.

Quando consideramos a natureza química da NPM, os mais comumente utilizados são os derivados dos óxidos de ferro, como a magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematitas ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). NPM formados por níquel (HOU, et al. 2005), cobre (WU e CHEN 2004) e outros metais (SON, et al. 2007).

1.4 Aplicações biológicas dos Fluidos Magnéticos

O comportamento magnético dos FM (na verdade, de suas NPM) bem como a variedade de arranjos da camada estabilizante das partículas possibilita seu emprego em diversas áreas. Como foi citado anteriormente, a camada estabilizante é responsável também pela interação com os organismos. Essas interações podem estar relacionadas com o fenômeno de

evasão da resposta imunológica do organismo (como visto no capítulo anterior) ou a associação de agentes de interesse clínico (Roach, et al. 2007).

Nos FM, as NPM utilizadas normalmente são aquelas que exibem um forte paramagnetismo, que é um tipo de magnetismo característico de materiais fracamente atraídos por ímã. Muitos elementos e alguns compostos são paramagnéticos, como em compostos contendo ferro, paládio, platina e os elementos terras-raras. Esses elementos possuem camadas internas de elétrons que estão incompletas, causando desemparelhamento de elétrons e fazendo dos átomos um ímã permanente. Na ausência de um campo externo aplicado, as partículas são orientadas ao acaso, e assim o fluido não tem magnetização líquida. Ao se aplicar um campo magnético ao sistema, as partículas paramagnéticas tendem a se alinhar as linhas de campo e conseqüentemente reforçam um campo magnético aplicado (Jackson 1999).

Aproveitando-se das características magnéticas das NPM, quatro aplicações clínicas são possíveis: 1) A separação magnética; 2) O direcionamento magnético; 3) Contraste de imagem; 4) Hipertermia..

A separação de moléculas ou células, na chamada magnetoafereze é uma técnica na qual NPM se ligam a determinadas biomoléculas, como proteínas e DNA, e a diferentes tipos celulares, todos contidos em um soluto. Com o objetivo de isolar um composto molecular específico ou tipo celular em uma solução heterogênia, podemos formular NPM com afinidades específicas. O subsequente tratamento da solução com as NPM proporcionam a ligação molécula/célula alvo. Esta solução pode agora ser submetida a uma campo

magnético externo, que irá reter as NPM e, conseqüentemente, as moléculas ou células ligadas. (Hoshino, Ohnishi e Yas 2007, Lin, et al. 2007).

Uma segunda função seria a utilização de magnetos externos para o direcionamento das NPM nas células e tecidos biológicos. A técnica visa o direcionamento e concentração de MPN, com o intuito de potencializar tratamentos e minimizar eventuais efeitos sistêmicos. Em um recente trabalho (SINCAI, et al. 2007), a técnica foi empregada para proporcionar o acúmulo de NPM de magnetita recobertos por dupla camada de ácido laurel em regiões de adenocarcinoma em animais. No trabalho de Mykhaylyk e colaboradores (Mykhaylyk, et al. 2007) é proposto o emprego de NPM ligados a fragmentos de DNA para terapia gênica (técnica chamada de *magnetofection*). Nesta técnica, fragmentos de DNA são inseridos dentro de células, com o objetivo de complementar informações gênicas (bases de nucleotídeos) que estejam defeituosas ou ausentes em células.

Para a atração magnética em tecidos, o campo magnético deve possuir uma força suficiente para retirar as partículas de dentro de vasos sanguíneos e conduzi-los a tecidos ou órgão específicos. Este direcionamento visa o acúmulo de NPM em sítios de interesse, como sistema nervoso central ou em zonas com câncer. Trabalhos recentes (Chertok, A. Moffatb, et al. 2008, Chertok, David, et al. 2007) demonstram que a aplicação de campo magnético aumenta consideravelmente o acúmulo de NPM no cérebro de camundongos quando submetidos a campo magnético externo.

As NPM podem ainda ser usadas também como agentes modificadores da relaxação na ressonância magnética de tecidos, potencializando o contraste

de imagens e possibilitando assim a localização de tumores em estágios precoces de desenvolvimento. Nos sistemas usualmente difundidos, as imagens dos órgãos (pré- tratamento) são comparadas às imagens de animais ou indivíduos submetidos a injeções de NPM (pós-tratamento). A Figura 1-2, retirada de (Russell e Anzai 2007) exemplifica essa aplicação.



Figura 1-2 - Ressonância magnética do crânio de voluntários antes (a1 e a2) e depois (b1 e b2) da injeção de FM. Em todas as figuras o linfonodo (ponta da seta) pode ser observado. Note que em b1 todo o linfonodo absorve as NPM, exibindo um contraste diferente de a1. Compare com b2, cujo linfonodo exibe as regiões com câncer que não absorvem as NPM, mantendo o contraste de a2. (Reproduzido de Russell, et al., 2007)

A técnica de agente de contraste de imagem normalmente é empregada em órgãos cuja capacidade de retenção de NPM já foi demonstrada, como fígado, e baço e linfonodo (BULTE e KRAITCHMAN 2004, Russell e Anzai 2007). Para órgãos aonde as partículas não possuem afinidade, está sendo empregado método de atração magnética com o objetivo acumular NPM em

novos sítios. Trabalhos recentes (Chertok, A. Moffatb, et al. 2008, Rivière, et al. 2007) demonstram o emprego destas duas técnicas em cérebros de animais experimentais.

Materiais comerciais pra visualização de fígado já existem, como Feridex® (Endorem) e Combidex® (Sinerem) (BULTE e KRAITCHMAN 2004). Atualmente as pesquisas se expandiram para vários órgãos, como linfonodos (Russell e Anzai 2007), pâncreas (Kelly, et al. 2007, Montet, Weissleder e Josephson 2006), próstata (Johannsen, et al. 2007), só para citar alguns exemplos.

Uma possível aplicação das NPM também associada a propriedades magnéticas é a hipertermia. Ela consiste no tratamento de massas tumorais associando células cancerígenas e partículas magnéticas. Toda a região de tratamento é então submetida um campo magnético alternado externo, que induz a vibração das NPM e conseqüentemente aumento de temperatura no tecido adjacente. O aumento de temperatura está acompanhado de lise das células tumorais (Kettering, et al. 2007). É possível ainda associar NPM a quimioterapia com o objetivo de intensificar os efeitos da magnetotermocitólise sobre o câncer e, ao mesmo tempo, diminuir a toxicidade sistêmica das drogas utilizadas.

Quando consideramos a cobertura das NPM, além de estabilizar os centros metálicos no meio fisiológico e mascarar sua presença do sistema imunitário dos organismos, elas podem também ser funcionalizadas, permitindo a ligação de agentes de interesse clínico para o tratamento de doenças (Lu, Salabas e Schüth 2007) ou detecção de biomoléculas ou células. Propostas de

detecção de patógenos (H. McNaughton, et al. 2007) e DNA (Saiyeda, et al. 2006), já foram propostas na literatura atual.

A cobertura das partículas pode ser ligada, também a fármacos ou outros agentes de tratamento, como radioisótopos (Kang, et al. 2007) e elementos foto sensibilizadores (Primo, et al. 2007). Para obtermos especificidade, podemos empregar magnetos externos (como mostrado anteriormente) e sua conseqüente condução específica ao sítio de interesse. Este direcionamento pode ser obtido também acrescentando à cobertura anticorpos específicos (Pankhurst 2006), permitindo assim a interação de células às NPM contendo o fármaco, minimizando efeitos sistêmicos.

1.5 Testes Biológicos

A utilização das NPM nas mais variadas aplicações biomédicas exige que sejam realizados testes toxicológicos preliminares, objetivando o conhecimento de seus efeitos biológicos antes de sua utilização em seres humanos (ANVISA, 2008). Inicialmente são realizados testes em culturas de células (testes *in vitro*) como por exemplo os viabilidade celular, destacando o teste do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e exclusão por azul de Tripán, bem como testes para avaliar a genotoxicidade, como no caso do teste do cometa.

Após os testes *in vitro*, é necessária a avaliação dos efeitos das partículas nos tecidos de animais experimentais. Entre estes testes se

encontram estudos histopatológicos, que visam à análise de efeitos adversos provocados pelas NPM, bem como os sítios de deposição destes elementos no organismo. Uma das técnicas usadas para esses estudos é a microscopia de luz (ML), que pode visualizar evidências de resposta do organismo à partículas, como, por exemplo, infiltrados de células inflamatórias, cicatrizes fibrosas e alterações histopatológicas. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) visa complementar esta observação através de seu maior poder de resolução, detalhando assim a relação de NPM com ultraestruturas celulares.

Outra técnica para o estudo dos FMs é a ressonância magnética (RM) que permite a detecção, com grande sensibilidade, das NPMs do FM (Lacava *et al*, 2001). A Ressonância Ferromagnética (RF) é uma das modalidades de RM para estudo dos FM, estando associada com as propriedades magnéticas dos spins dos elétrons das nanopartículas. O equipamento é constituído por uma fonte de microondas (normalmente em uma banda de 9GHz), uma cavidade ressonante na qual a amostra é introduzida, um detector de microondas e um campo magnético que possa ser variado em uma região de 0 a 1,5 Tesla. O espectro de RM é obtido pela monitoração da absorção de microondas enquanto o campo magnético é variado. A partir dos espectros de absorção obtidos pela RM é possível detectar a presença das partículas magnéticas presentes no sangue ou nos órgãos dos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Com base nas possíveis aplicações das nanopartículas magnéticas em sistemas biológicos, este trabalho visou primeiramente à análise dos efeitos de um novo FM contendo NPM revestidas por dupla camada de ácido láurico (AL-NPM) em células cultivadas (*in vitro*) e em camundongos machos submetidos a uma injeção endovenosa do FM.

Posteriormente, a habilidade destas partículas de sofrer influencia de um campo magnético externo quando injetados em camundongos também foi averiguada, bem como seus possíveis efeitos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do tratamento de FM contendo AL-NPM na viabilidade de células em culturas de fibroblasto, células mesangiais e macrófagos peritoneais;
- Analisar a distribuição de AL-NPM por ressonância ferromagnética, em baço, cérebro, estômago, fígado, língua, intestino delgado, pâncreas, pulmão e testículo, além de alíquotas de sangue de camundongos swiss machos;
- Analisar a distribuição e histopatologia de AL-NPM por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, em órgãos com sinal de ressonância magnética;

- Verificar os efeitos genotóxicos de Al-NPM em eritrócitos jovens de camundongos swiss machos através do método do micronúcleo;
- Verificar os efeitos e distribuição de Al-NPM em camundongos swiss machos submetidos a campo magnético externo contínuo.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Fluido magnético

Amostras de FM iônico contendo nanopartículas de maguemita (γ - Fe_3O_4) estabilizadas pelo recobrimento de uma dupla camada de ácido láurico em meio aquoso foram totalmente produzidas no laboratório de Química pela professora Doutora Emília Celma de Oliveira Lima. As amostras observadas na MET (Figura 3-1) confirmaram o diâmetro médio estimado por infravermelho.

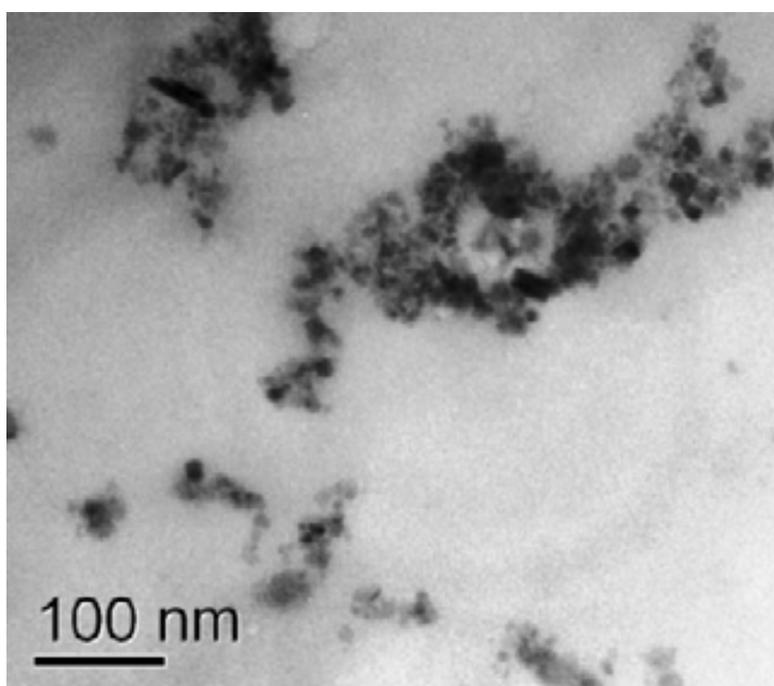


Figura 3-1 - Fotomicrografia de um esfregaço de fluido magnético contendo nanopartículas magnética recoberta por dupla camada de ácido láurico em uma tela de microscopia eletrônica recoberta por Formvar.

As características de AL-NPM podem ser consultadas na Tabela 3-1.

Tabela 3-1: Principais características físico-químicas da amostra de FM-AL

Número de partículas (partículas/cm³)	1,28 X10¹⁶
pH do meio aquoso	7
Concentração de Ferro (mg/ml)	25,2
Diâmetro médio – Difração por Raio-X (nm)	10,28
Diâmetro médio – Microscopia eletrônica de Transmissão (nm)	11,33

Testes laboratoriais com AL-NPM no laboratório de Química da UFG demonstram que a cobertura iônica tende a formar agregados em meio de cultura com concentração semelhante à fisiológica. A Tabela 3-2 mostra o diâmetro hidrodinâmico (D_h) da amostra de AL-NPM em meio de cultura.

Tabela 3-2: Diâmetro hidrodinâmico de AL-NPM quando misturados em meio de cultura.

Volume de Fluido magnético (μL) em 1500mL de Meio	D_h / nm
2,5	313
5,0	265
10,0	255
15,0	300
25,0	307
35,0	335
50,0	355

3.2 Testes *in vitro*

3.2.1 Tipos celulares

Foram utilizados três tipos celulares para os testes:

- a) Linhagem de fibroblastos humanos normais (FHN) utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rui Curi do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). É uma linhagem imortalizada que cresce de forma aderente ao substrato e apresenta morfologia fusiforme.
- b) Célula mesangial de rim humano (CHMI), cedidos pelo laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.
- c) Macrófagos retirados da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos fêmeas (IQUEGO) com 4 meses de idade.

3.2.2 Grupos experimentais

Para cada linhagem de célula, um experimento foi realizado em uma placa de cultura com 96 poços. A placa foi delimitada para conter quatro grupos tratados e um controle; cada grupo possuía 2 réplicas. Os grupos foram separados de acordo com a Tabela 3-3.

Tabela 3-3: Listagem dos grupos experimentais em cultura de célula e respectivas siglas

Grupo	Tratamento (em 200 µL de meio)	Tipo celular	Nomenclatura
Tratado	1,28 X10 ¹⁴ contendo 250µg de Ferro	Fibroblasto	FIBR01
		CHMI	CHMI01
		Macrófago	MAC01
Tratado	1,28 X10 ¹³ contendo 25µg de Ferro	Fibroblasto	FIBR02
		CHMI	CHMI02
		Macrófago	MAC02
Tratado	1,28 X10 ¹² contendo a 2,5µg de Ferro	Fibroblasto	FIBR03
		CHMI	CHMI03
		Macrófago	MAC03
Tratado	1,28 X10 ¹¹ contendo a 0,25µg de Ferro	Fibroblasto	FIBR04
		CHMI	CHMI04
		Macrófago	MAC04
Controle	-	Fibroblasto	FIBR-CON
		CHMI	CHMI-CON
		Macrófago	MAC-CON

Abaixo, na Figura 3-2 um exemplo do arranjo do experimento em uma placa de cultura com linhagem de fibroblasto é mostrado. O mesmo arranjo foi aplicado para cada grupo experimental.

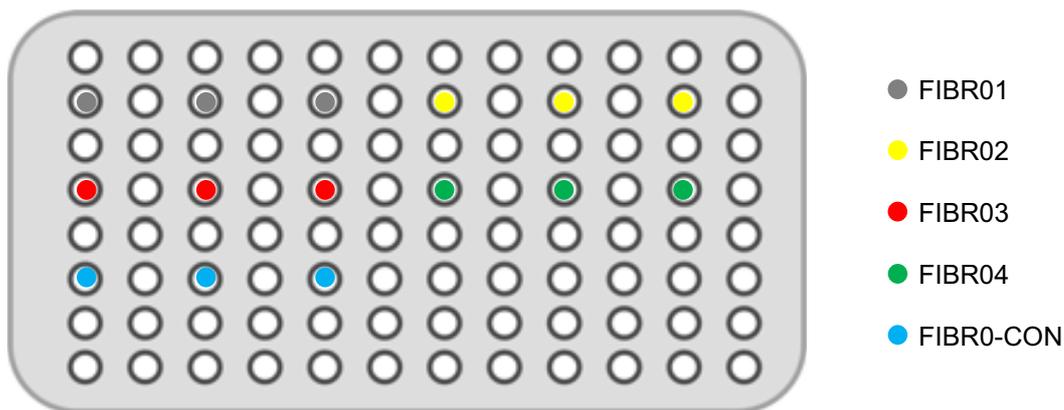


Figura 3-2 - Desenho esquemático de uma placa de cultura contendo 96 poços demonstrando o planejamento do experimento usando células da linhagem de fibroblasto humano.

3.2.3 Reagentes

- Antibiótico 1%
- DMSO (MERCK)
- Meio de cultura D-MEM (Sigma)
- Solução de MTT
- SFB 10% (MERCK)

3.2.4 Procedimentos para cultura de células

As culturas de células foram realizadas no laboratório de Morfologia (UnB). Cada linhagem foi mantida pelos procedimentos padrões de cuidado de cultura de células (Pörtner 2007) na estufa (37°C e 5% CO₂). Cada linhagem de células foi semeada em uma placa de 96 poços de acordo com a descrição a seguir: Para cada poço, foram semeadas 10⁴ células em 200 µL de meio de

cultura, aonde permaneceram por 24 horas para adesão celular na placa na estufa. Em seguida, o meio de cultura de cada poço foi substituído pelo meio de tratamento e a placa foi devolvida a estufa por 24 horas.

3.2.5 Teste do MTT

Após o tempo experimental, o meio de tratamento foi substituído pela solução de MTT na seguinte proporção: 15 μ L de solução estoque de MTT em 135 μ L de meio de cultura novo. A placa de cultura foi então incubada por 2,5 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Após o tempo de incubação na solução de MTT, o meio foi substituído por uma solução de 100 μ L de DMSO (necessária para dissolver os cristais formados na etapa anterior). A solução foi repetidamente homogeneizada com o auxílio de uma pipeta. A placa foi levada um a um leitor de Elisa e lido em um comprimento de onda de 595nm.

3.2.6 Testes estatísticos

A média dos valores e os desvios médios dos dados obtidos foram calculados, e as diferenças nas médias entre os experimentos foram investigados pelo teste t de *Student*. Diferenças de $P \leq 0,05$ foram consideradas como estatisticamente significativos.

3.3 Testes in vivo - Biodistribuição por Ressonância Magnética

3.3.1 Animais experimentais

Camundongos Swiss machos, com 90 dias de vida, obtidos da IQUEGO (GO, Brasil), foram mantidos no Biotério do Laboratório de Genética (GEM-IB-UnB), com temperatura controlada ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com fornecimento de água e ração à vontade.

3.3.2 Grupos experimentais

Os animais foram separados em três grupos:

- a) Dois grupos experimentais (GE) – Cada grupo continha **cinco** animais, que receberam uma injeção única, via endovenosa de 100 μl de FM-AL puro (2,52mg de Ferro em 100 μl). Os animais foram mortos após 24 horas (**G24h**) e 48 horas (**G48h**) da injeção
- b) Um grupo controle (**GC**) – Para cada grupo experimental citado acima, dois animais receberam uma injeção única com 100 μL de solução salina e foram mortos após cada tempo experimental referente.

Após a morte dos animais, os seguintes órgãos foram coletados: baço, cérebro, estômago, fígado, língua, intestino delgado, pâncreas, pulmão e

testículo, além de alíquotas de sangue. Os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80°C .

3.3.3 Métodos

Os órgãos congelados foram homogeneizados em água destilada e aproximadamente 1mL de cada homogenato foi armazenado em nitrogênio líquido. Para realizar as medidas de RM foi utilizado o aparelho em banda-X do laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (GO – Brasil) o qual detecta a presença de partículas magnéticas na faixa de 10^{11} até 10^{18} partículas/cm³.

3.4 Testes in vivo - Biodistribuição por microscopia de Luz e Eletrônica

3.4.1 Grupos experimentais

Os animais foram separados em oito grupos:

- a) Sete grupos experimentais (GE) – Cada grupo continha **cinco** animais, que receberam uma injeção única, via endovenosa de 100 μl de FM-AL puro ($1,28 \times 10^{15}$ contendo 2,52mg de Ferro em 100 μl). Os animais foram mortos após cada tempo experimental apontado na Tabela 3-4.

Tabela 3-4: Listagem dos tempos experimentais e respectivas siglas

Tempo Experimental	Nomenclatura
5 minutos	G1
30 minutos	G2
2 horas	G3
12 horas	G4
24 horas	G5
1 semana	G6
1 mês	G7

- b) Um grupo controle (GC) – Para cada grupo experimental citado acima, dois animais receberam uma injeção única com 100 μ L de solução salina e foram mortos após cada tempo experimental referente.

Para cada animal foram retirados baço, fígado e pulmão para o processamento em microscopias de luz e eletrônica de transmissão, além da coleta de medula óssea dos fêmures dos animais do grupo tratado (a partir de G4) e controle, para realização do teste do micronúcleo. Neste teste, um grupo controle positivo padrão (injeção de ciclofosfamida) foi utilizado como comparativo (GF).

3.4.2 Microscopia de Luz

3.4.2.1 Reagentes e materiais

- Ácido acético glacial (Reagen)
- Álcool absoluto (Zulu)
- Álcool etílico 95% (Vetec)
- Entellan (EMS)
- Eosina
- Ferrocianeto de potássio (Vetec)
- Formaldeído absoluto (Vetec)
- Glicerina (vetec)
- Hematoxilina
- Parafina (Vetec)
- Vermelho neutro
- Xileno (Vetec)

3.4.2.2 Soluções

- Fixador de microscopia de Luz: Davidson Modificado

2 partes de Formol puro
3 partes de Álcool 95%
3 partes de ácido acético glacial
1 parte de glicerina
3 partes de água destilada

- Corante – Método de Perls

a) Reagente de Perls

1g de Ferrocianeto de potássio

50mL de água destilada

25ml de ácido clorídrico 13%

b) Vermelho neutro rápido

1g vermelho neutro

100mL água destilada

3.4.2.3 Procedimentos

Coleta e Fixação: Após a morte dos animais, os órgãos foram cuidadosamente coletados com material cirúrgico apropriado e levados ao fixador de ML por 24 horas a 4°C;

Desidratação, diafanização e inclusão: As peças foram desidratados, a temperatura ambiente, com etanol em uma série de concentrações crescentes, a 70, 80 e 90%, durante 1 hora cada, e 3 vezes de 1 hora a 100%. Em seguida foram colocados em uma solução 1:1 de álcool e xilol por 1 hora, seguido por 3 banhos em xilol puro de 45 minutos cada. Para a inclusão, o material foi submetido a 3 banhos de parafina e mantidos em estufa a 59°C. Por último, o material foi montado em blocos de parafina e moldados por barras de Leuckhart ou formas de inclusão.

Corte: Após a solidificação dos blocos, foi utilizado um micrótomo Leica RM2125 para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Cada órgão foi cortado em sua totalidade, em cortes semi-seriados. Neste procedimento, para

cada corte aproveitado, outros dez em seqüência foram desprezados, totalizando um intervalo de aproximadamente 50µm entre os cortes aproveitados. Cada corte foi montado em lâminas de vidro e mantidas em estufa a 37°C, por no mínimo 4 horas, para melhor aderência dos cortes nas lâminas.

Coloração: As lâminas com cortes foram submetidas a um processo de hidratação, com banhos em 3 soluções de xilol (1 minuto cada), 3 soluções de álcool 100% (1 minuto cada), álcool 90%, 80% e 70% (1 minuto cada). Para a coloração por hemotoxilina e eosina (H&E), as lâminas foram colocadas em hemotoxilina por 1 minuto e posteriormente em eosina por 45 segundos (após breve banho em água corrente). Para a coloração pelo método de Perls, as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 minuto, depois coradas no reagente de Perls por 25 minutos, novamente lavadas em água destilada por 1 minuto; lavadas em água corrente por 1 minuto; coradas na solução vermelho rápido por 3 minutos; água corrente por 3 minutos.

Montagem: Depois da coloração por qualquer um dos métodos descritos, o material foi desidratado em uma concentração crescente de alcoóis 70%, 80%, 90%, 100% (3 vezes) e xilol puro (3 vezes). Após o último banho de xilol, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se Entellan®, e colocadas para secar na estufa, a 37°C, por 12 horas.

As Laminas foram analisadas e fotografadas em microscopios Axioskop da Zeiss pertencentes aos laboratórios de Morfologia e de Microscopia Eletrônica, ambos da UnB.

3.4.3 Microscopia eletrônica de Transmissão

3.4.3.1 Reagentes

- Acetona (Reagen)
- Acetado de Uranila (Sigma)
- Cacodilato de Sódio (Vetec)
- Citrato de chumbo (SEM)
- Glutaraldeído 25% (Sigma)
- Paraformaldeído (Vetec)
- Resina Spurr (EMS)
- Sacarose (Sigma)
- Tetróxido de Ósmio (Sigma)

3.4.3.2 Soluções

- Fixador de microscopia de eletrônica: Karnovisk Modificado

Para 100 ml de solução:

Reagente na solução	A partir do estoque
Paraformaldeído 2%	20ml de paraformaldeído. 10%
Glutaraldeído 2%	8ml de Glutaraldeído 25%
5% Sacarose	5g Sacarose
2mM CaCl ₂	2ml CaCl ₂ a 100mM
Completar com solução de Cacodilato de Sódio 0,1M	

- Preparo do Paraformaldeído 10% (100ml)

10g Paraformaldeído.

Completar para 100 ml com água destilada.

Aquecer a 60°C. Solução com aspecto leitoso.

Colocar NaOH 0,1M gota a gota até a solução ficar límpida.

Filtrar a solução em papel de filtro.

- Preparo do NaOH 0,1M

0,4g NaOH.

100 ml Água destilada.

- Preparo de Tampão Cacodilato de Sódio 0,2M

4,28g de Cacodilato de Sódio tri-hidratado (P.A. 214,03).

90 ml Água destilada.

Acertar pH entre 7 e 7,3.

Completar para 100ml com água destilada

- Preparo de CaCl_2 100mM

1,11g CaCl_2 .

Completar para 100ml com água destilada.

- Preparo de Tampão Cacodilato para misturar com ósmio

5mM de CaCl_2 (1ml de CaCl_2 100mM).

1,6% Ferricianeto de Potássio (0,32g em 20ml caco).

Completar para 20ml de Solução com Cacodilato 0,2M .

3.4.3.3 Procedimentos

Coleta e Fixação: Após a morte dos animais, fragmentos dos tecidos coletados para microscopia de luz foram cuidadosamente retirados com material cirúrgico apropriado e fragmentos em espécimes de aproximadamente mm. Os fragmentos cortados foram posteriormente levados ao fixador de MET por 24 horas a 4°C;

Pós-fixação e contrastação: Após a fixação, as peças foram lavados três vezes em tampão Cacodilato de sódio 1%; Em seguida, as peças foram levados a solução de Tetróxido de ósmio a 1% protegidos da luz e a temperatura ambiente por 2 horas. Após a conclusão desta etapa, as peças foram novamente lavadas três vezes em tampão Cacodilato de sódio 1%. Na

seqüência, as amostras foram colocados na solução de acetato de uranila a 2% por 24 horas a 4°C.

Desidratação: As peças foram lavadas três vezes em água destilada e posteriormente desidratadas, a temperatura ambiente, com acetona em uma série de concentrações crescentes, a 70, 80 e 90%, e três vezes de 100% durante 15 minutos cada. Em seguida, foram colocados sobre uma plataforma (em rotação) com uma solução 1:1 de acetona e resina Spurr por 6 horas; em seguida em uma solução 1:2 de acetona e resina Spurr (6 horas) e por fim em uma solução pura de resina Spurr (6 horas)

Montagem: Após o último banho em resina Spurr, as amostras foram incluídas em resina Spurr dentro de formas de silicone para a obtenção dos blocos. As formas foram mantidos a 58°C por 3 dias.

Corte e pós-contrastação: Após a polimerização dos blocos, foi utilizado um ultramicrótomo Reichert para obtenção de cortes de 85 nm de espessura com lâminas de vidro. Cada conjunto de cortes foi coletado em telas para microscopia. As telas foram secas e levadas para pós-contrastação em acetato de uranila a 5% (30 minutos) e em citrato de chumbo (10 minutos).

Os cortes foram analisados e fotografados em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL® 1011 operados a 80KV, pertencente ao laboratório de Microscopia Eletrônica (UnB).

3.4.4 Micronúcleo

A avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade será realizada por meio do teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos da medula óssea (Schmid 1975).

Os micronúcleos (MN) são pequenas inclusões de material nuclear dentro do eritrócito. Estas inclusões podem ser constituídas por cromossomos inteiros ou pedaços cromossômicos envoltos por membrana nuclear, podem ser formados espontaneamente ou pelos efeitos clastogênicos ou aneugênicos de determinados agentes. As substâncias clastogênicas provocam quebras nas moléculas de DNA e as aneugênicas são aquelas que provocam perdas cromossômicas devido à interferência na formação e ligação do fuso mitótico.

Durante o processo de maturação, os eritrócitos expulsam seus núcleos, e a presença de MN retidos no citoplasma é indicativo de dano genético. Portanto, o potencial genotóxico de um agente é medido pela sua capacidade em aumentar a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC - células jovens contendo ARN no citoplasma) em animais tratados, quando comparados ao controle sem tratamento (EPA 2004).

O teste do micronúcleo ainda permite avaliar a citotoxicidade na medula óssea por meio da análise do percentual de EPC (% EPC) entre o total de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (ENC - células maduras contendo hemoglobina no citoplasma) contados. A toxicidade é indicada por uma redução significativa na percentagem dos eritrócitos policromáticos. O %EPC foi calculado pela Equação 1:

$$\%EPC = \frac{EPC}{EPC + ENC} \times 100$$

Equação 1: Fórmula do cálculo da porcentagem de EPC

Para realização do teste, logo após os animais serem mortos por deslocamento cervical nos tempos determinados pela Tabela 3-4, os fêmures foram removidos e uma das epífises cortadas. Em seguida, a medula óssea foi coletada com 1 mL de SFB e transferida para um tubo Falcon de 15 mL. O material foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 558,9 ×g. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspendido em 300µL de SFB e uma gota deste homogeneizado foi distendida em lâmina de vidro. O material secou ao ar e em temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente foi fixado com Álcool Metílico P.A. e corado com Giemsa (Tolosa, et al. 2003) em tampão fosfato pH 6.8, na proporção 1:14, por 6 minutos. Foram analisados 4000 eritrócitos, 2000 policromáticos (EPC) e 2000 normocromático (ENC), em ML (1000×).

3.4.5 Campo magnético

3.4.5.1 Equipamento

Para avaliar o efeito de um campo magnético contínuo externo sobre a distribuição das nanopartículas nos animais, foi utilizado o equipamento emissor existente no laboratório de física experimental III da UnB. O equipamento consiste de uma bobina de Helmholtz ligado a uma fonte de

corrente contínua. O equipamento produz campo magnético uniforme em uma região central aos discos do equipamento (Figura 3-3).

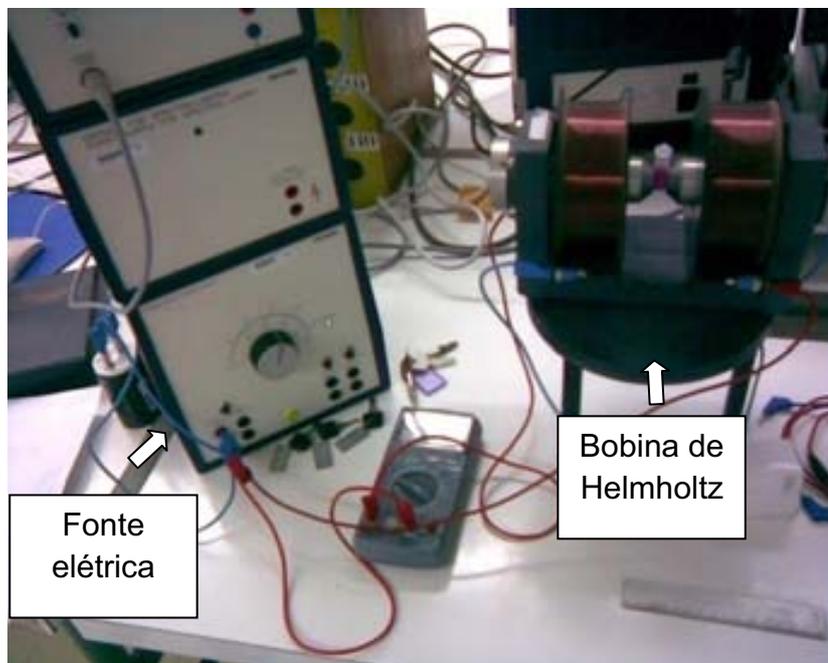


Figura 3-3 - Foto do sistema de campo magnético usando uma bobina de Helmholtz.

3.4.5.2 Testes *in vivo*

Para os testes em animais, o equipamento foi ajustado para gerar um campo contínuo de 0,327 T na sua parte central.

Cada animal foi anestesiado com uma injeção intraperitoenal de uma solução de Ketamina/Xilazina. O anestésico foi ajustado para que cada animal recebesse 1 μL de ketamina por peso (grama) de animal; e 0,1 μL de xilazina por peso (grama) de animal. Após um período de aproximadamente cinco minutos, os animais foram submetidos às injeções de tratamento indicado na Tabela 3-5. Imediatamente após a injeção, cada animal foi levado ao

equipamento para a indução magnética. Os animais foram posicionados no equipamento de modo que o campo magnético passa-se pelo tórax ou cabeça do animal. Na Figura 3-4 temos um exemplo de posicionamento para a cabeça.



Figura 3-4 - Foto mostrando o posicionamento de um animal no centro da bobina de Helmholtz.

Após o tempo de tratamento de 30 minutos, aonde os animais permaneceram imóveis, o equipamento foi desligado e imediatamente os animais foram mortos por deslocamento cervical; Dois órgãos (cérebro e pulmão) foram retirados e processados para microscopia de luz, cortados (cortes semi-seriados) e corados por H&E ou método de Perls.

Tabela 3-5: Listagem dos grupos experimentais com campo magnético e respectivos tratamentos.

Grupo	Tratamento por animal (em	Direcionamento	
	100µl de solução injetado)	do campo	Nomenclatura
Tratado	1,28 X10 ¹⁵ contendo 2,52mg de Ferro	Cabeça	Trat01
Tratado	1,28 X10 ¹⁵ contendo 2,52mg de Ferro	Tórax	Trat02
Tratado	1,28 X10 ¹⁵ contendo 2,52mg de Ferro	Sem campo	Trat03
Controle	Solução salina	Cabeça	Cont01
Controle	Solução salina	Tórax	Cont02

4 RESULTADOS

4.1 *In vitro* – MTT

Em todos os experimentos, foi possível visualizar precipitados de NPM nos meios de cultura após 24 horas de tratamento. As células não apresentaram alterações morfológicas em nenhum grupo experimental. Como exemplo, a Figura 4-1 mostra fotografias de poços de cultura de macrófagos do grupo macrófago controle (MAC-COM) (A) e macrófago tratado com 2,5 μ g de ferro (MAC-03) (B).

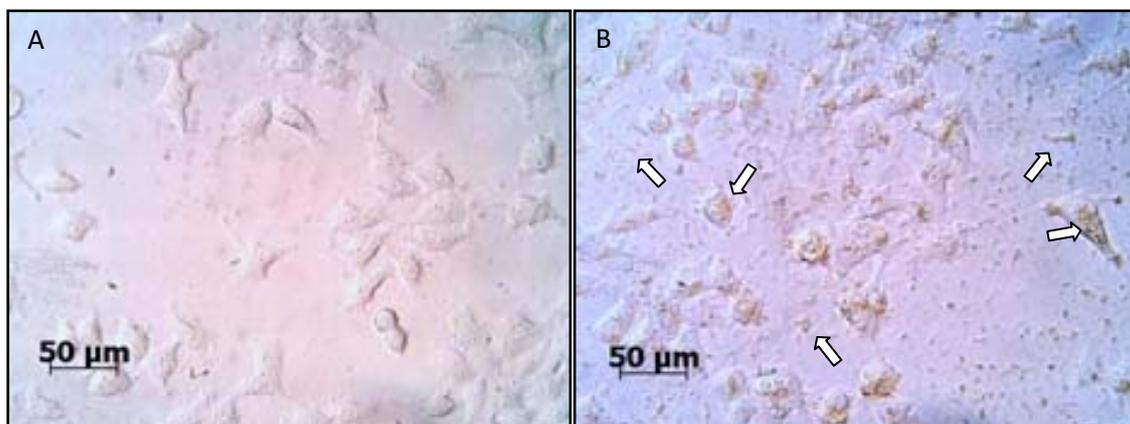


Figura 4-1 - Fotomicrografia de poços de cultura de macrófagos peritoneais de MAC-CON e MAC-03. As NPM (setas) podem ser notadas dentro das células ou em aglomerados externos na forma de massas de cor marrom.

Nos experimentos com células, as linhagens de células mesangiais humanas (CHMI) fibroblasto humanos (FIBR) não apresentaram diferença significativa na viabilidade celular pelo teste t de Student e mostrado na Figura 4-2.

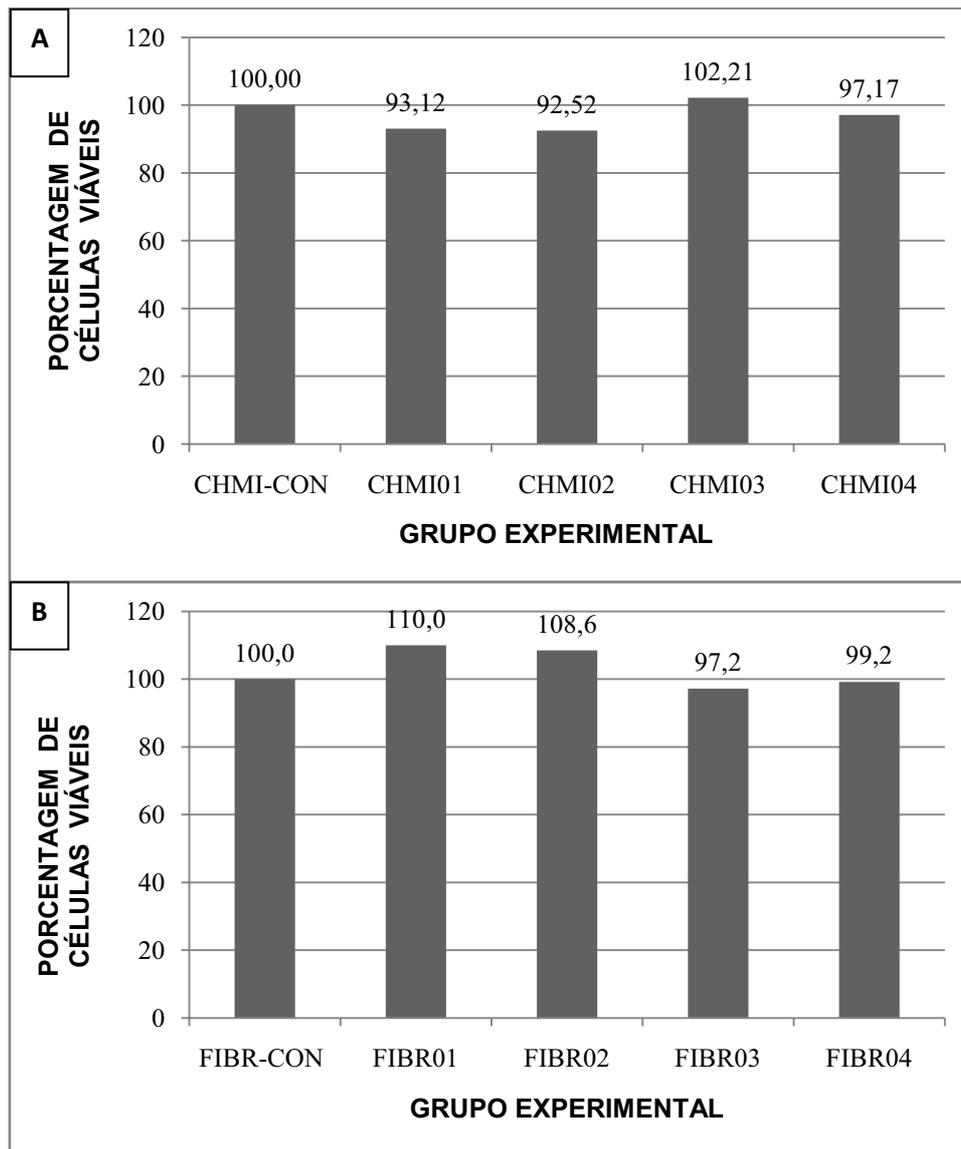


Figura 4-2 - Viabilidade celular de células mesangiais (CHMI) em A e fibroblastos (FIBR) em B, quando tratados por 24 horas em diferentes concentrações de AL-NPM. Resultados comparados com o teste t de *Student*, $P \leq 0,05$.

Nos experimentos com macrófagos peritoneais, os grupos que receberam as maiores quantidades de ferro (250 μ g em MAC01 e 25 μ g em MAC02) mostraram uma diferença significativa em relação ao grupo controle MAC-CON (Figura 4-3).

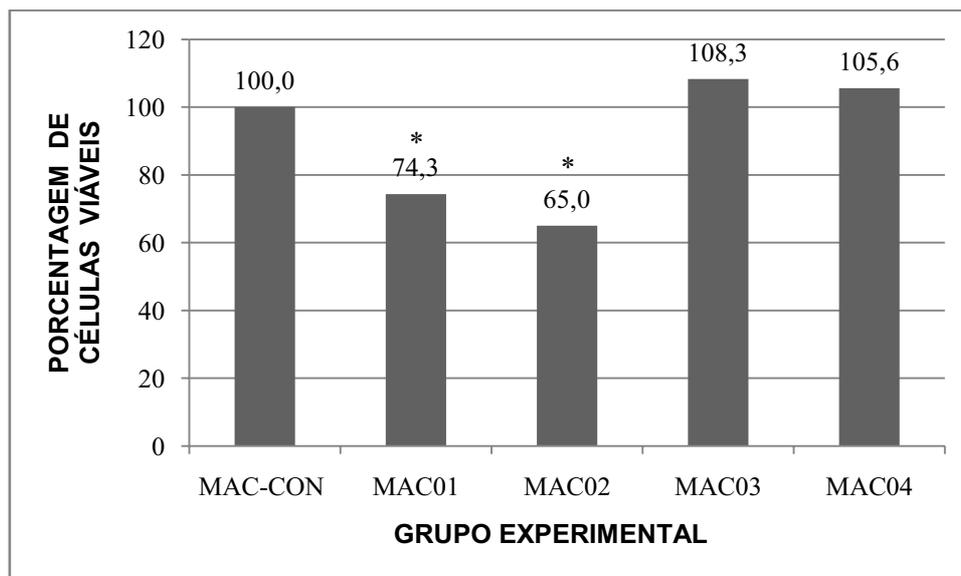


Figura 4-3 - Viabilidade celular de macrófagos peritoneais (MAC) quando tratados por 24 horas em diferentes concentrações de AL-NPM. Resultados comparados com o teste t de *Student*. (* = valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) do grupo controle MAC-CON).

4.2 *In Vivo*

4.2.1 Ressonância Magnética

Nas amostras de órgãos, foram detectadas quantidades mensuráveis de ferro em todos os dois tempos experimentais (G24h e G48h) em baço e fígado. As amostras de pulmão mostram presença de ferro apenas em G24h. Todas as amostras ditas com sinal para ferro exibiram Espectros de ressonância magnética característicos de NPM (Figura 4-4).

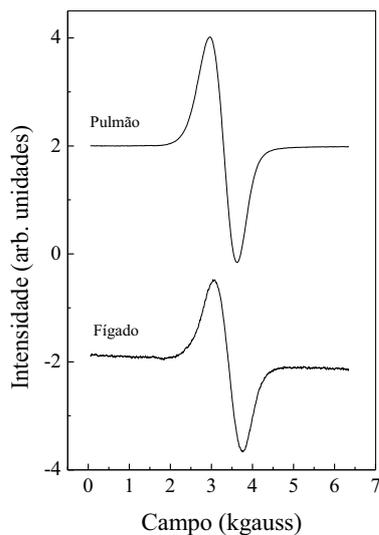


Figura 4-4 - Espectros de ressonância magnética de amostras de fígado e pulmão G24h.

Nos demais órgãos não foram detectados quantidades de ferro em nenhum tempo experimental. Os achados estão sumarizados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1: Presença de ferro em quantidades mensuráveis pelo equipamento de ressonância magnética. Presença (+) ou ausência (-) de ferro.

	Baço	Cérebro	Estômago	Fígado	Língua	Intestino delgado	Pâncreas	Pulmão	Sangue	Testículo
G24h	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
G48h	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

4.2.2 Morfologia - Microscopia de Luz e Microscopia eletrônica de Transmissão

Cortes histológicos de pulmão do grupo controle (GC) (Figura 4-5 A e B) mostram o tecido pulmonar com vasos sanguíneos, alvéolos e septos alveolares de espessura normal. No grupo G1 (5 minutos) (Figura 4-5 C, D, E e F), as NPM são visíveis no parênquima do tecido, na forma de aglomerados marrons. As partículas podem ser encontradas distribuídas de maneira uniforme em todo o corte, e em todos os cortes seriados. Em algumas regiões, o septo alveolar apresenta espessamento, sempre associado à presença de NPM (Figura 4-5 E e F). Os aglomerados estão presentes dentro de capilares ou dispersos no parênquima pulmonar. Este grupo foi o que mais apresentou aglomerados de NPM de todos os grupos estudados

No grupo G2 (30 minutos), nota-se uma menor quantidade de NPM ao longo dos cortes (Figura 4-6 A e B). Os aglomerados são menos comuns, e já é possível visualizar zonas livres de NPM. Nos cortes de animais de G3 (2 horas) (Figura 4-6 C e D), o parênquima do órgão agora se encontra com uma menor quantidade de aglomerados, que são menores e pouco freqüentes. O espessamento do parênquima ainda pode ser observado em diversas áreas. Nos cortes de animais de G4 (12 horas) (Figura 4-6 E e F), a quantidade de NPM é visualmente semelhante aquela exibida em G3. Grandes aglomerados são difíceis de serem encontrados ao longo dos cortes semi-seriados, com pouco espessamento de parênquima presente. Todos os grupos não exibiram sinais de infiltrados inflamatórios nos órgãos.

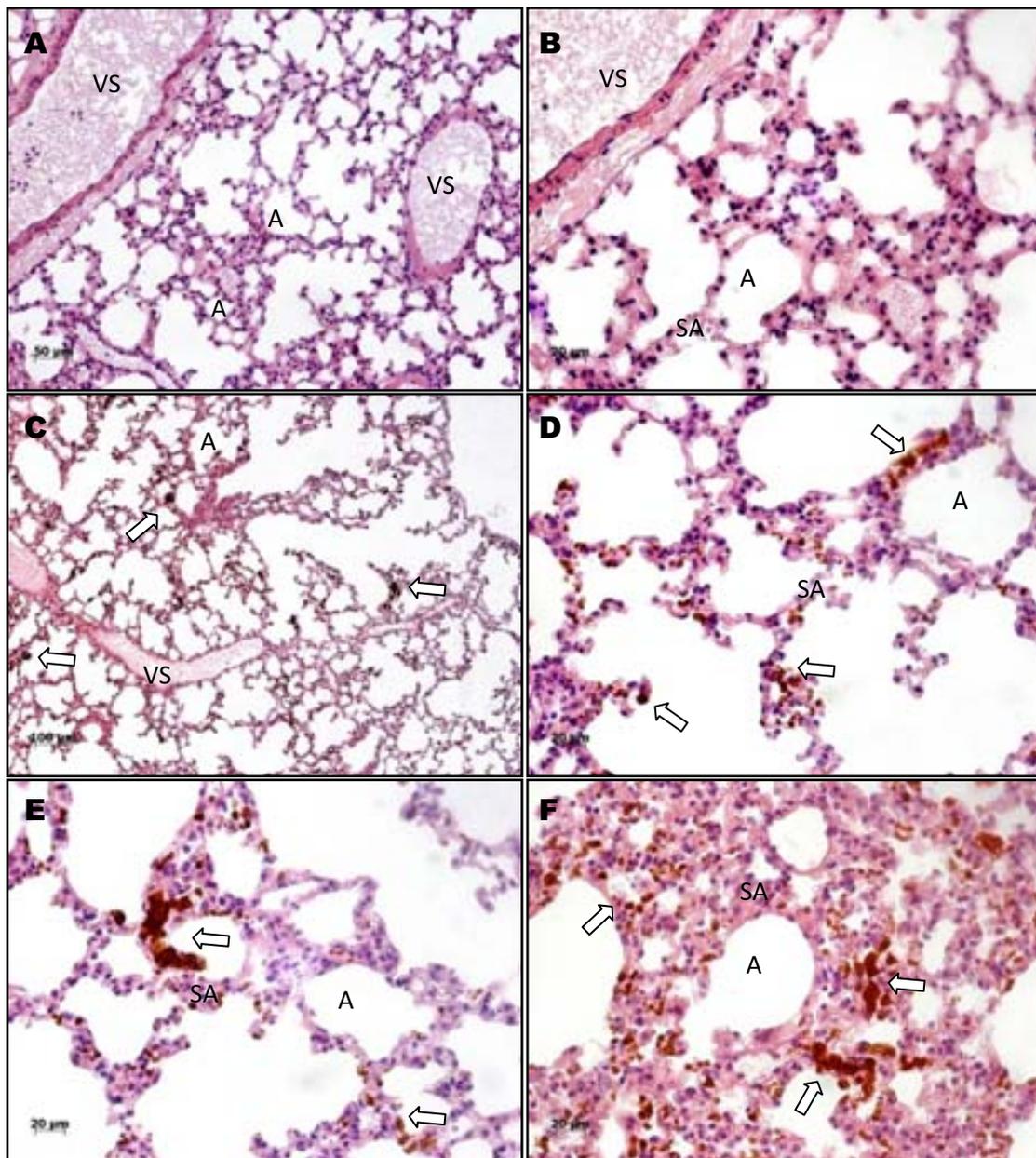


Figura 4-5 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Em A e B grupo controle e em C, D E e F grupo experimental 5 minutos. Aglomerados de NPM (setas) podem ser observados distribuídos no tecido pulmonar. Coloração por H&E. Vaso sanguíneo (VS), alveolo (A) e septo alveolar (SA).

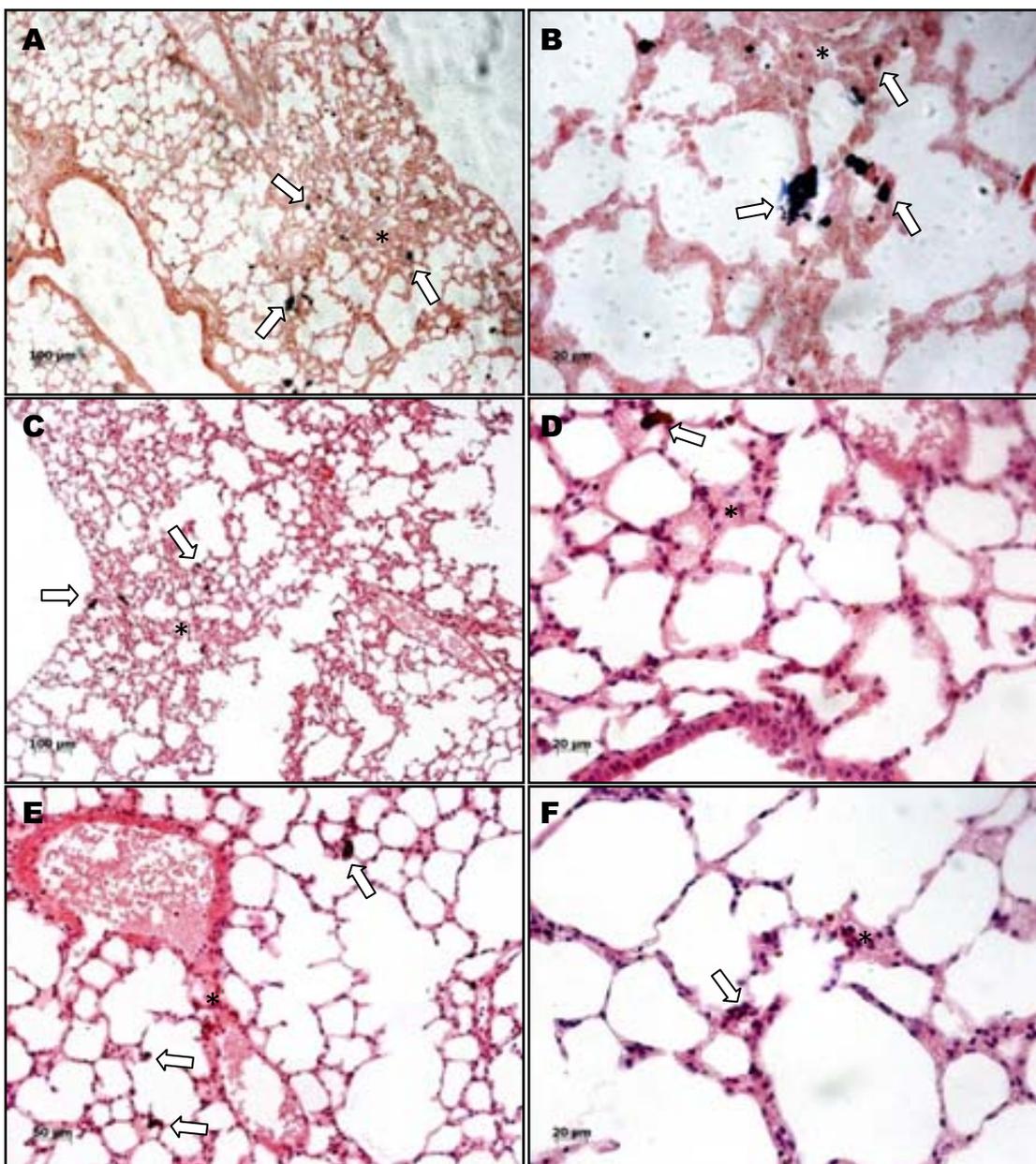


Figura 4-6 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Em A e B grupo experimental 30 minutos, C e D grupo experimental 2 horas e em E e F grupo experimental 12 horas. As NPM podem ser observadas na forma de aglomerados marrons ou azuis (setas). O parênquima do tecido exibe um espessamento decrescente a partir de A (*). Note a menor quantidade de partícula no parênquima do tecido a partir da foto C. Coloração por H&E (C e E) e Perls (A,B,D e F).

Corte histológicos dos grupos experimentais 24 horas (G5) e 1 semana (G6) mostram uma rápida eliminação de NPM do tecido pulmonar. Aglomerados de NPM ainda são mais numerosos em G5 (Figura 4-7 A e B), porém de quantidade ainda menor quando comparado ao grupo experimental 12 horas. Em G6 (Figura 4-7 C e D), e G7 (1 mês) (Figura 4-7 E e F) não apresentam diferenças nos pulmões de animais de ambos os grupos. Os órgãos exibem raros depósitos de NPM no parênquima do tecido. O espessamento do septo alveolar é pequeno, e pode ser percebido nos dois grupos associados ou não à NPM.

Os cortes de microscopia eletrônica de Transmissão (Figura 4-8), as NPM foram encontradas sempre no interior de capilares, no parênquima do septo alveolar (tecido conjuntivo), ou dentro de células fagocíticas.

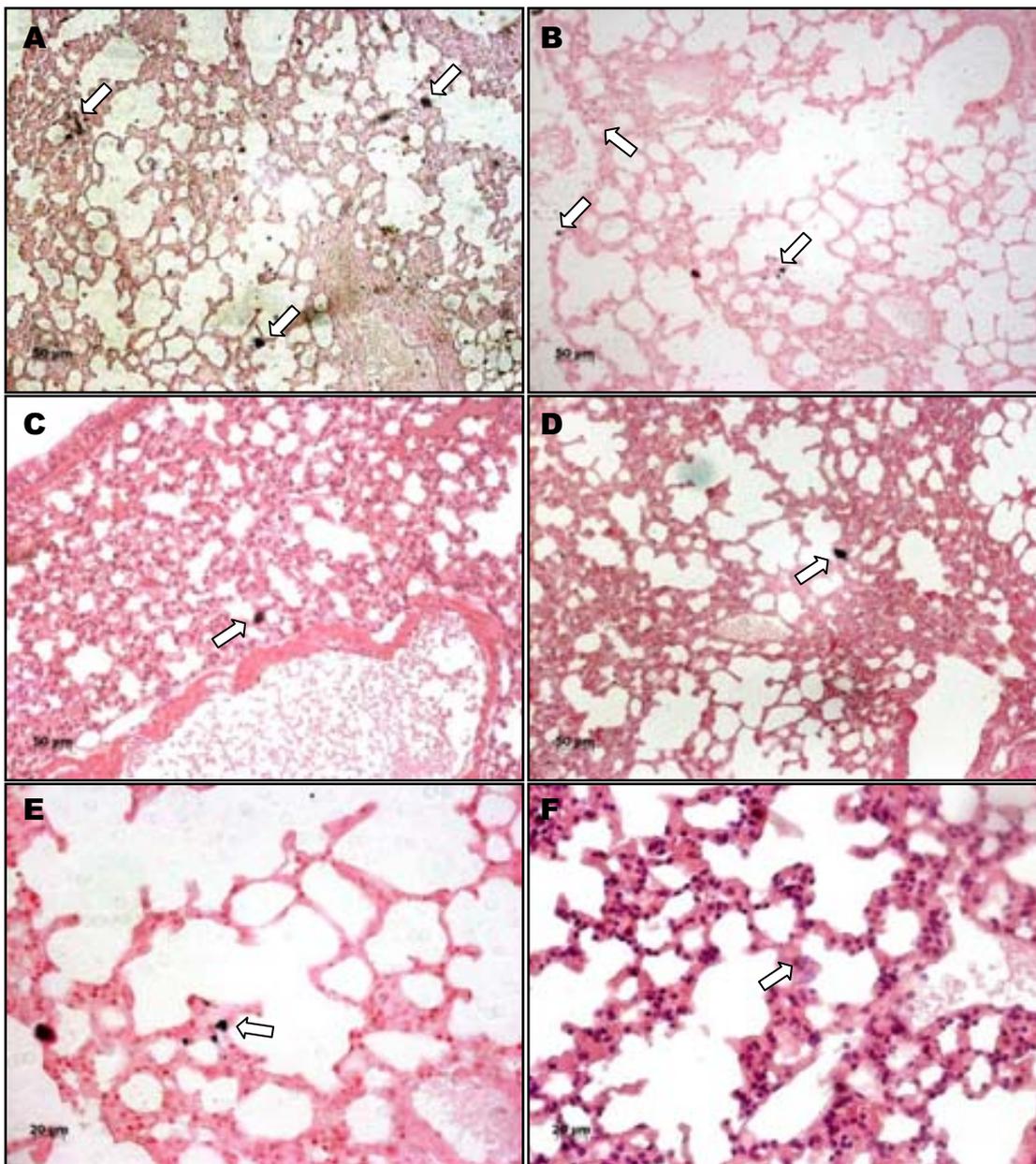


Figura 4-7 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Em A G5, B G6, C, D, E e F G7. As NPM, na forma de aglomerados marrons (coloração por H&E) ou azuis (coloração de Perls), estão apontadas por setas. Note a menor quantidade de partícula no parênquima do tecido em relação à prancha anterior. Coloração por H&E (C e F) e Perls (A,B,D e E).

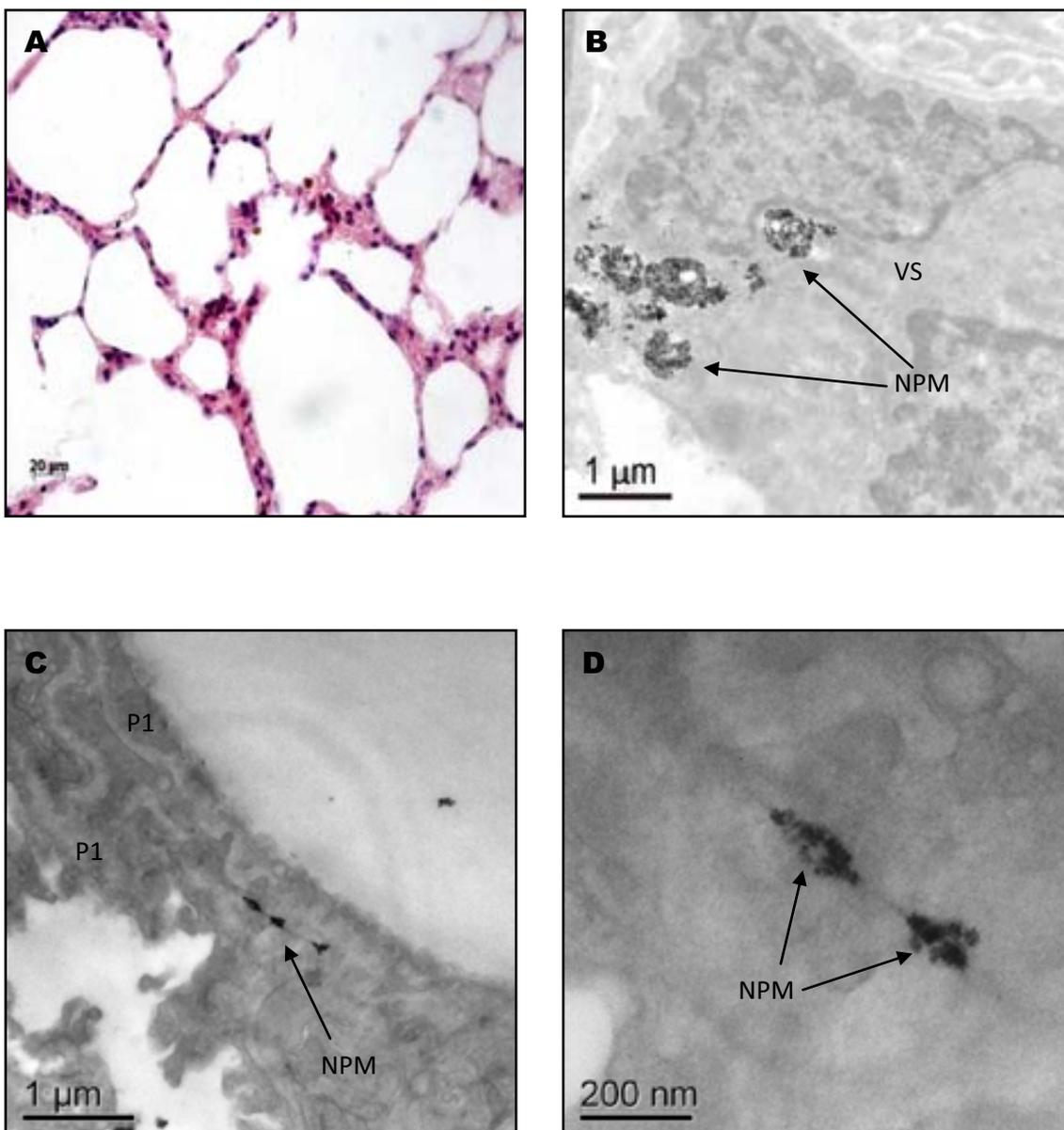


Figura 4-8 - Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos do grupo G3 vistas no microscópio de luz (A) e eletrônico de transmissão (B, C e D). Em B, detalhe de NPM dentro de vasos sanguíneos (VS) localizados no septo alveolar. Em C temos uma ampliação semelhante a área mostrada em A, mostrando a presença de NPM na parênquima do tecido (setas) entre dois pneumócitos do tipo I (P1). Em D, uma ampliação da área mostrada na foto anterior, mostrando detalhes das NPM.

Cortes histológicos de baço mostram o órgão dividido internamente em polpa branca e polpa vermelha, ambos preenchidos por células imunitárias (Figura 4-9) Uma leve marcação para ferro pelo método de Perls é notado na polpa vermelha dos grupos controle (GC) e experimental 5 minutos (G1). Ambos os grupos exibiram uma morfologia semelhante, não sendo possível a distinção entre o ferro endógeno e aquele referente às NPM.

Os Grupos G2 (30 minutos) e G3 (2 horas) (Figura 4-10 A e B) exibem a mesma morfologia de G1 e GC, ainda não sendo possível distinguir as NPM. O grupo G4 (12 horas) (Figura 4-10 C) exhibe um aumento na marcação de ferro pelo método de Perls na polpa vermelha. No grupo G5 (1 dia) (Figura 4-10 E e F) esta forte marcação também é notada na polpa vermelha, além de pequenos depósitos que passam a ser visíveis na periferia da polpa branca. Ambas as marcações parecem ocorrer nos espaços entre as células, atribuídos aos sinusíodes do órgão.

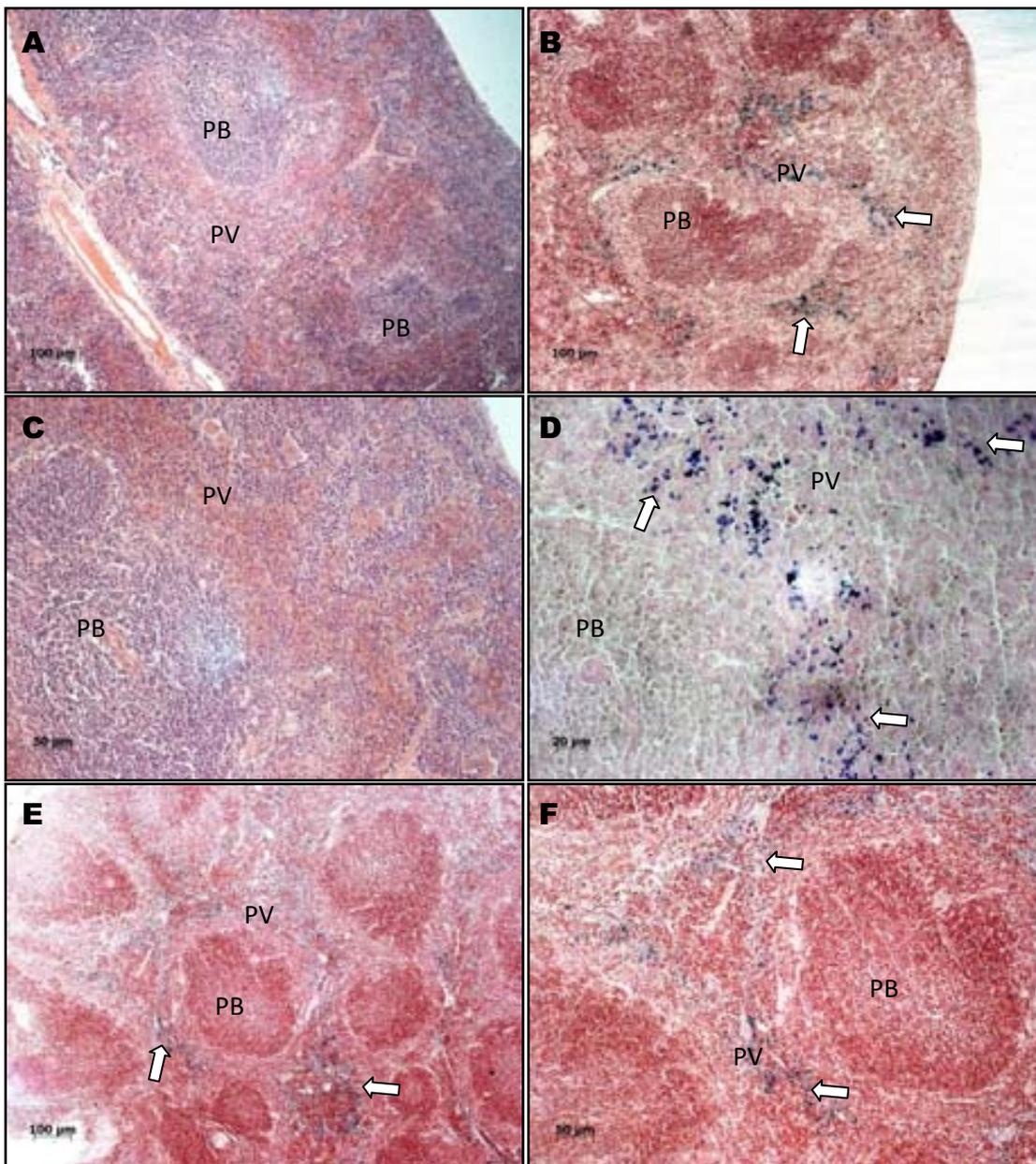


Figura 4-9 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos. O grupo G1 (5 minutos) pode ser observado em A, B, C, e D. Existe uma marcação para Ferro (setas) pelo método de pelrs na polpa vermelha (PV) do órgão, ausente na polpa branca (PB). Note que uma marcação semelhante é notada nos animais do grupo controle (E e F). Coloração por H&E (A e C) e Perls (B, D, E e F).

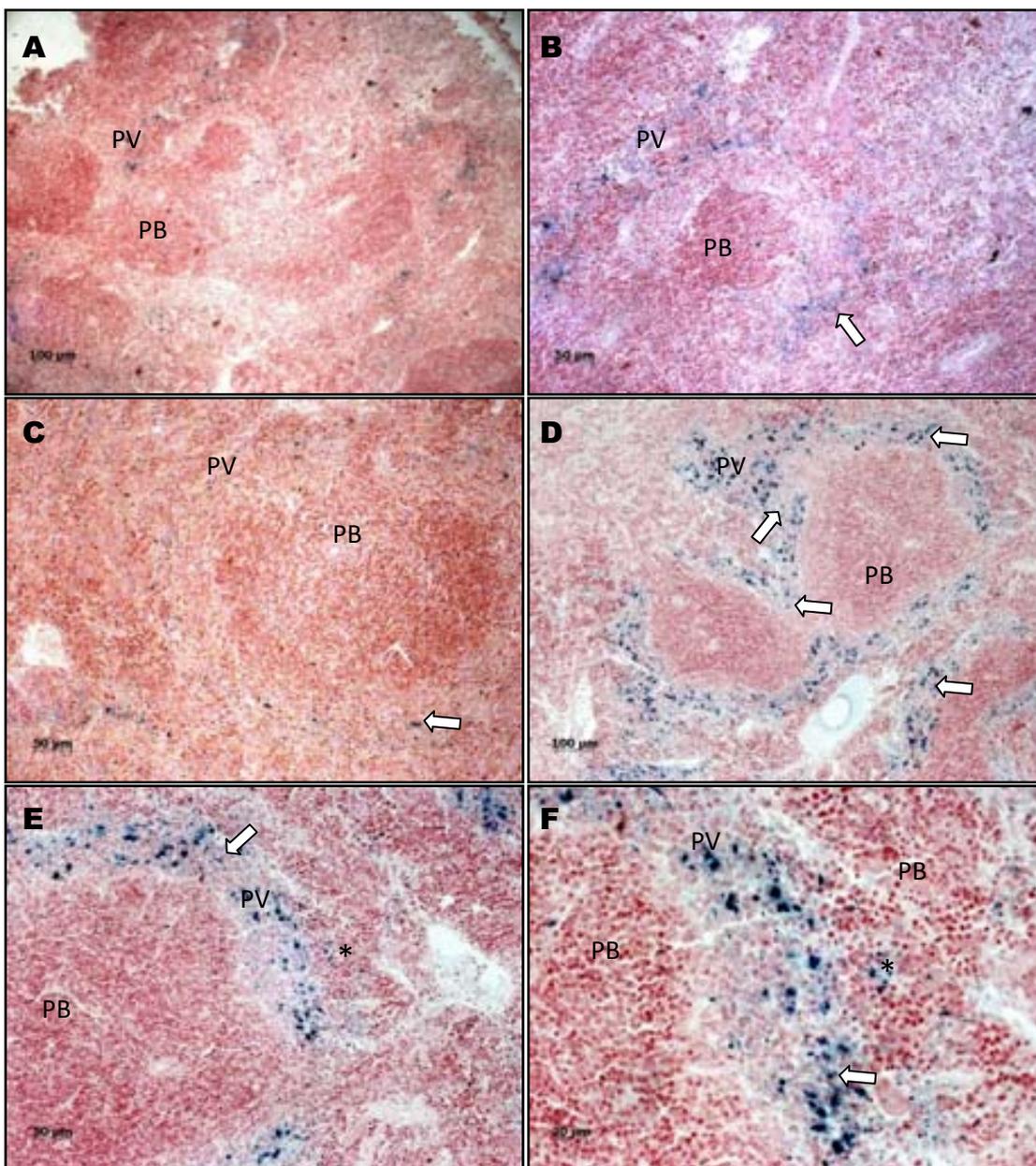


Figura 4-10 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos corados pelo método de Perls. O grupo G2 (30 minutos) pode ser observado em A e B; G3 (2 horas) em C, G4 (12 horas) em D; G5 (1 dia) em E e F. Existe uma marcação para Ferro (setas) pelo método de Perls na polpa vermelha (PV) do órgão que aumenta na seqüência de fotos. Note a marcação de Ferro (*) dentro da polpa branca (PB) em E e F.

Cortes histológicos de baço dos animais do grupo experimental 1 semana (G6O) (Figura 4-11) exibem uma forte marcação de ferro pelo método de Perls na polpa vermelha, levemente mais intenso do que o grupo G5. As marcações para ferro estão mais intensas na periferia da polpa branca, em comparação ao grupo anterior. As marcações parecem ainda ocorrer em espaços entre as células.

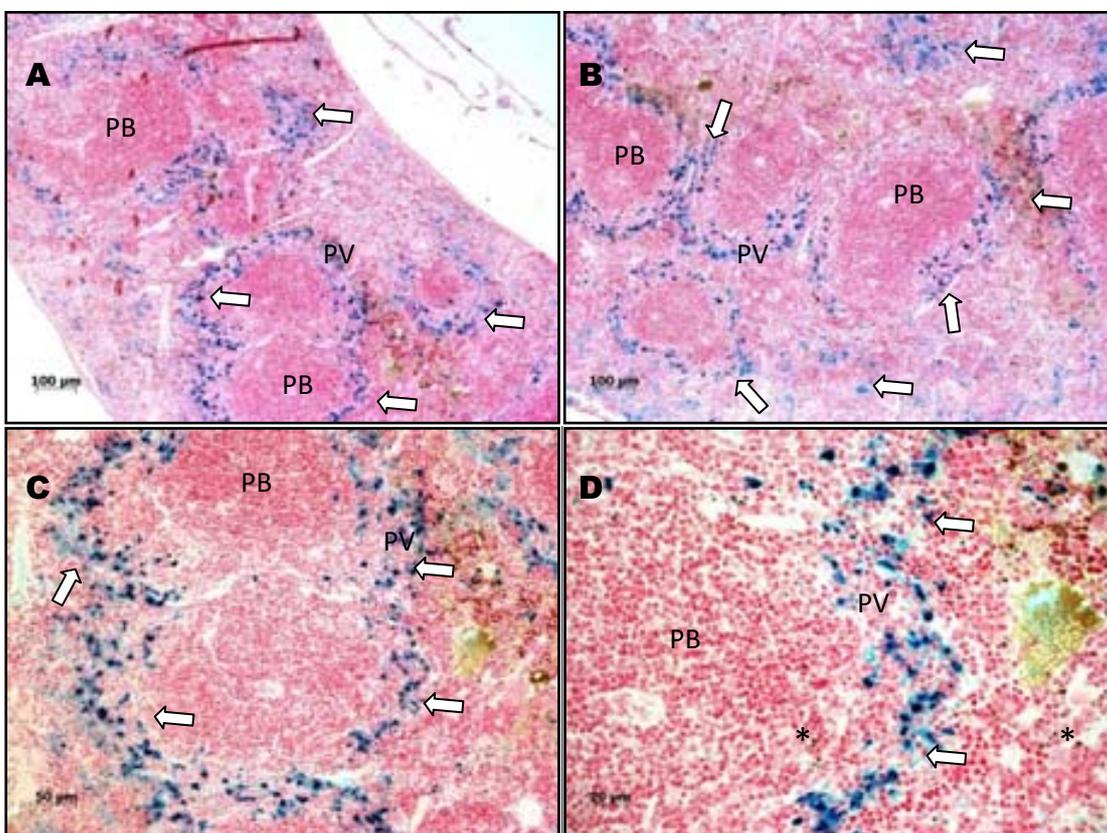


Figura 4-11 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos corados pelo método de Perls do grupo G6 (1 semana). Existe uma forte marcação para Ferro (azul) na polpa vermelha (PV) do. Note também a marcação de Ferro (seta) dentro da polpa branca (PB) em F.

Cortes histológicos de baço dos animais do grupos experimentais 1 mês (G7) (Figura 4-12) exibem uma marcação mais intensa de ferro pelo método de Perls na polpa vermelha. As marcações para ferro na polpa branca continuam a partir da periferia.

A microscopia eletrônica de transmissão (Figura 4-13) demonstrou que as NPM estão presentes tanto no meio extracelular, quanto no citoplasma das células. As partículas na parte externa aparentemente estão formando agregados, enquanto que aquelas no interior das células estão mais individualizadas.

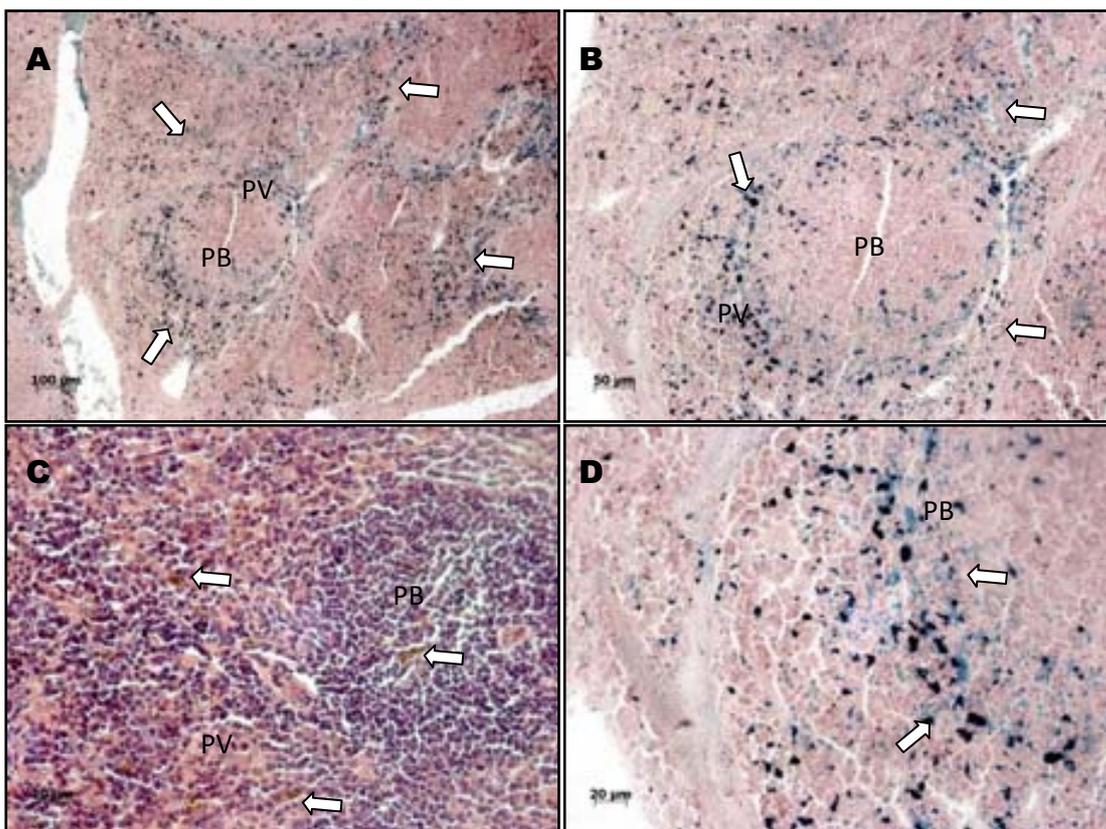


Figura 4-12 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos corados por H&E (C) e pelo método de Perls (A, B e D) do grupo G7(1 mês). Note a marcação para Ferro (setas) na polpa vermelha (PV) e na polpa branca (PB).

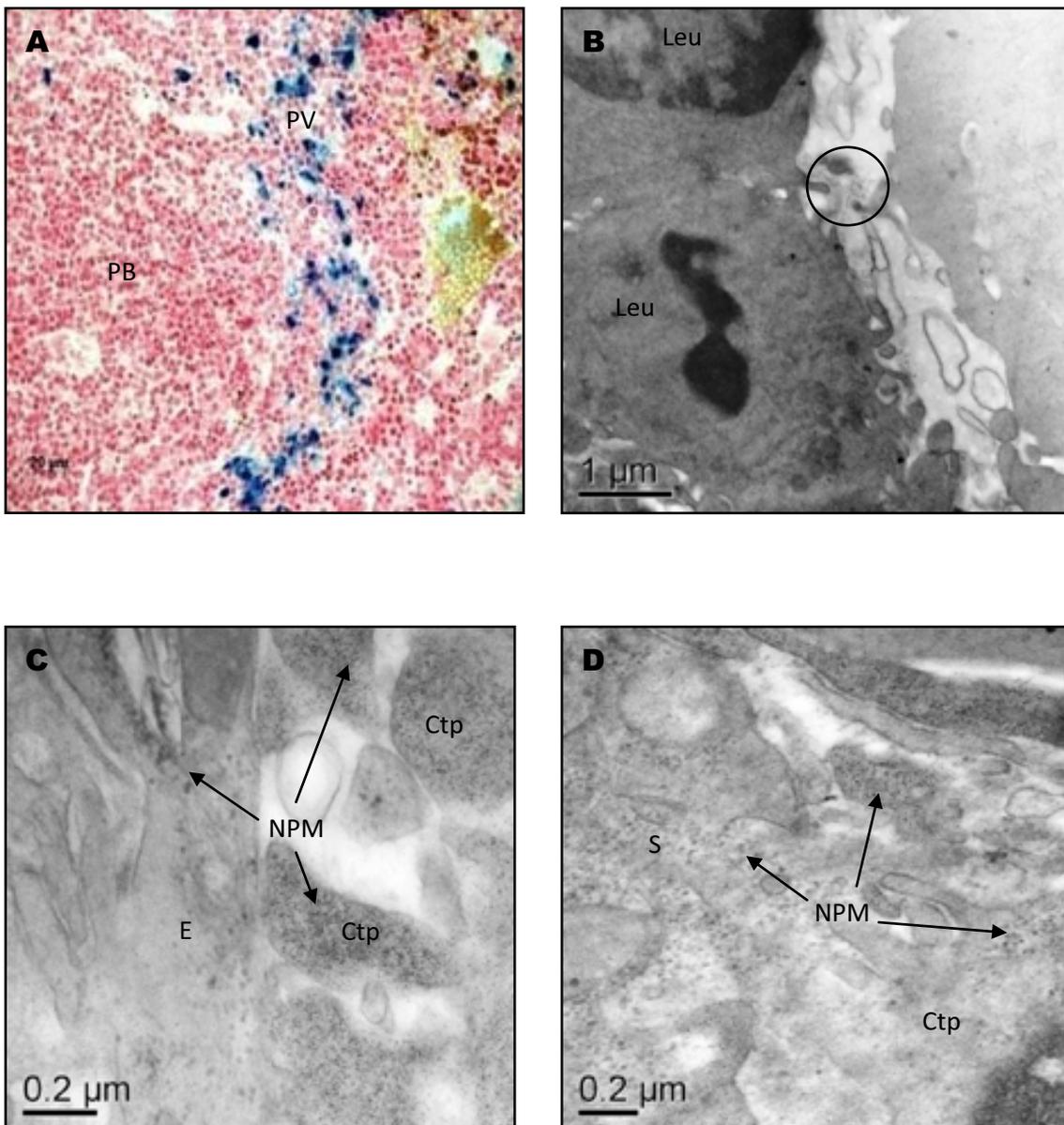


Figura 4-13 - Fotomicrografia de cortes de baço de camundongos do grupo G6 vistas no microscópio de luz (A) e eletrônico de transmissão (B, C e D). Em B temos uma ampliação semelhante à área correspondente a polpa branca de A (PB), mostrando a presença de leucócitos no parênquima do tecido (Leu). Em C, uma ampliação da área contornada em B, mostrando detalhes da presença de NPM (setas) nos espaços extracelulares (E) e no citoplasma das células (Ctp). Em D temos uma ampliação semelhante a polpa vermelha de A (PV), mostrando NPM nos sinusóides (S) e no citoplasma das células (Ctp).

Cortes histológicos de fígado do grupo controle (GC) (Figura 4-14 A, B e C) mostram a organização estrutural do órgão. A unidade funcional do fígado é composta por cordões de hepatócitos arranjados paralelamente a capilares sinusóides. Estes vasos derivam de vasos maiores nas bordas da unidade funcional (espaço porta), e convergem até a veia central de cada unidade. Na luz de cada capilar sinusoide são encontrados numerosos macrófagos, denominados células de Kupffer.

No grupo experimental 5 minutos (G1) (Figura 4-14 D), é possível notar uma leve marcação para ferro pelo método de Perls, sempre associado a células de Kupffer. No grupo experimental 30 minutos (G2) (Figura 4-14 E e F), um maior número de células de Kupffer com marcação é encontrado. Em nenhum dos grupos foi possível observar qualquer alteração histológica.

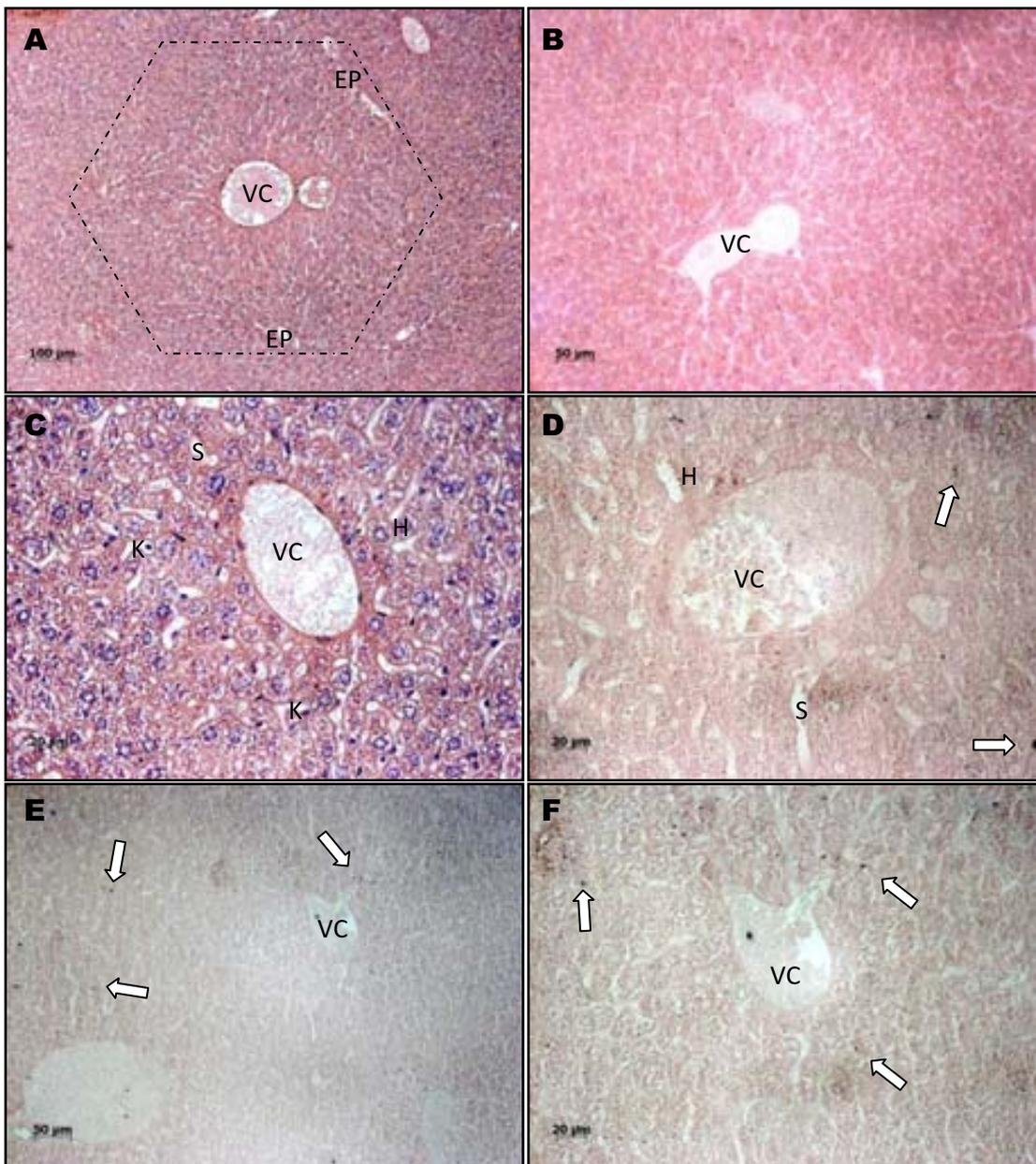


Figura 4-14 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos. O grupo GC (controle) pode ser observado em A, B e C; G1 (5 minutos) em D; G2 (30 minutos) em E e F. A unidade funcional do fígado está contornado em A, com uma veia central (VC) no centro e vasos dos espaço porta (EP) na periferia. Os capilares sinusóides (S) estão paralelos a cordões de hepatócitos (H). Células de Kupffer (K) podem ser notados na luz dos sinusóides. A presença de NPM (seta) pode ser percebida a partir da foto D. Coloração por H&E (A e C) e Perls (B, D, E e F).

Cortes histológicos de fígado dos grupos experimentais 2 horas (G3) (Figura 4-15 A e B), 12 horas (G4) (Figura 4-15 C e D) e 1 dia (G5) (Figura 4-15 E e F) mostram um gradual aumento da presença de NPM, mostradas pelo método de Perls ou H&E. Pequenos infiltrados inflamatórios foram observados, associados à NPM (Figura 4-15 A). Numerosos macrófagos (Kupffer) contendo NPM são encontrados em todos os cortes dos grupos.

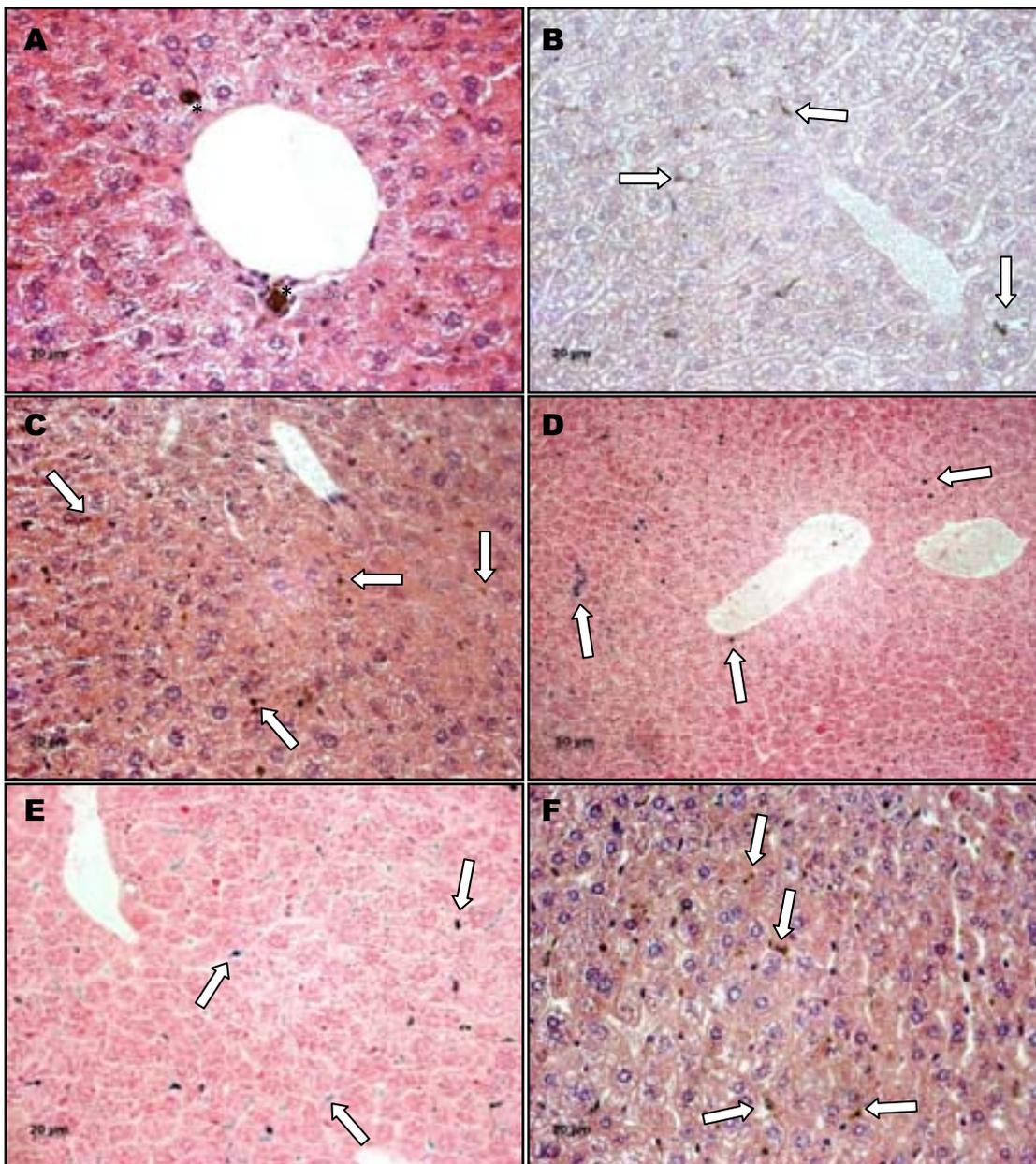


Figura 4-15 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos. O grupo G3 (2 horas) pode ser observado em A e B; G4 (12 horas) em C; G5 (1 dia) em D, E e F. As NPM podem ser percebidas na forma de aglomerados marrons (H&E) e azuis (Perls) dentro de células de Kupffer (setas) ou infiltrados inflamatórios (*). Coloração por H&E (A, B, C e F) e Perls (D e E).

Os grupos experimentais 1 semana (G6) (Figura 4-16 A e B) e 1 mês (G7) (Figura 4-16 C, D, E e F) apresentam uma forte marcação de ferro pelo método de Perls nos capilares sinusóides. Esta marcação foi a de maior intensidade e freqüência encontrada entre os grupos, sem apresentar diferença entre ambos. Numerosos macrófagos contendo NPM foram encontrados, além de depósitos de ferro na túnica adventícia (tecido conjuntivo) de veias centrais (Figura 4-16 E).

As fotomicrografias de fígado cortado para microscopia eletrônica de transmissão demonstram que os hepatócitos possuem pequenos depósitos de NPM (Figura 4-17 D) e, fato não demonstrado na ML. Uma célula de Kupffer é mostrada em detalhe na (Figura 4-17 B e C).

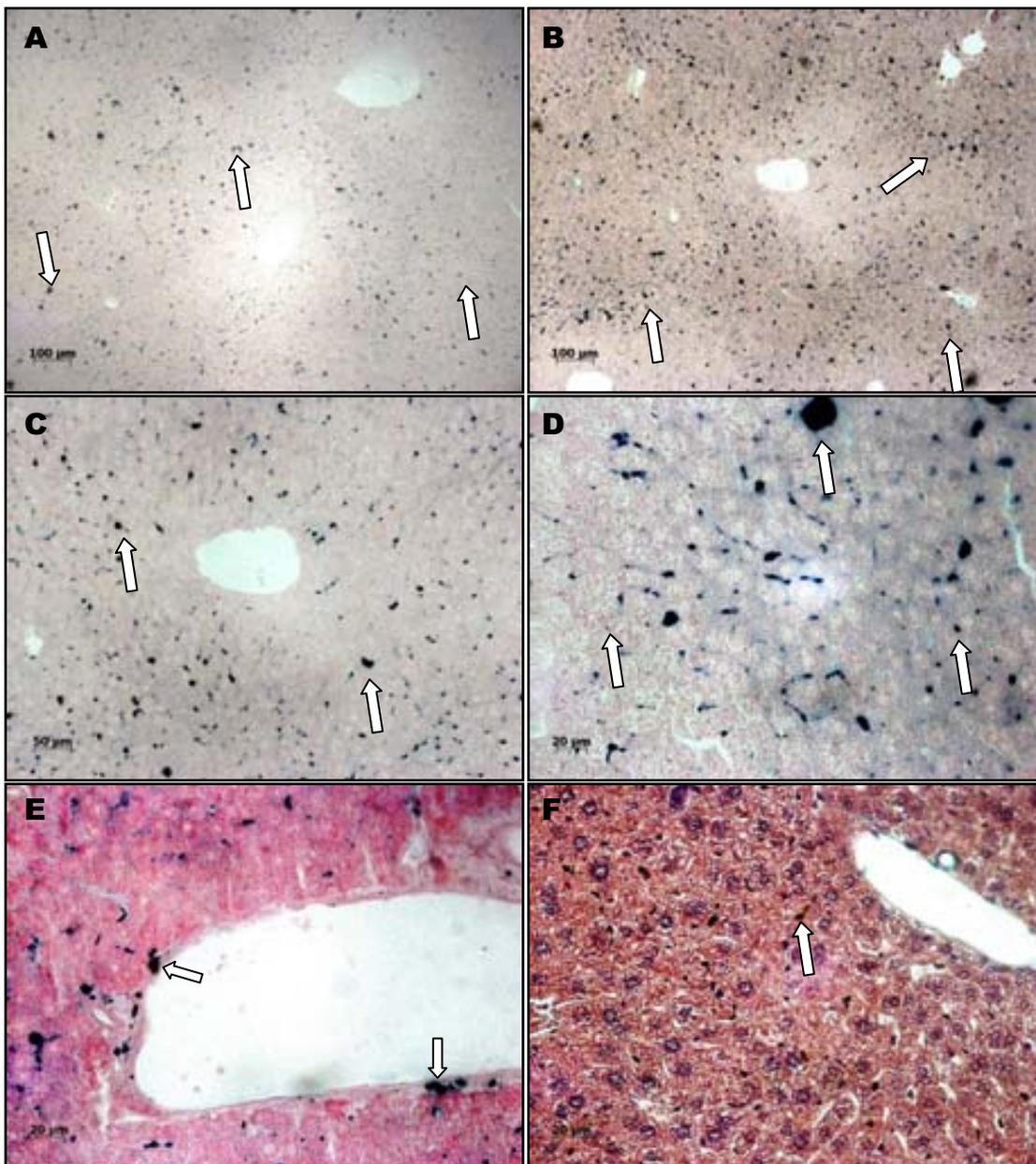


Figura 4-16 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos. O grupo G6 (1 semana) pode ser observado em A e B; G7 (1 mês) em C, D, E e F. As NPM (setas) podem ser percebidas na forma de aglomerados marrons (H&E) e azuis (Perls) dentro de células de Kupffer ou no conjuntivo associado a vasos (setas). Coloração por H&E (F) e Perls (A, B, C, D e E).

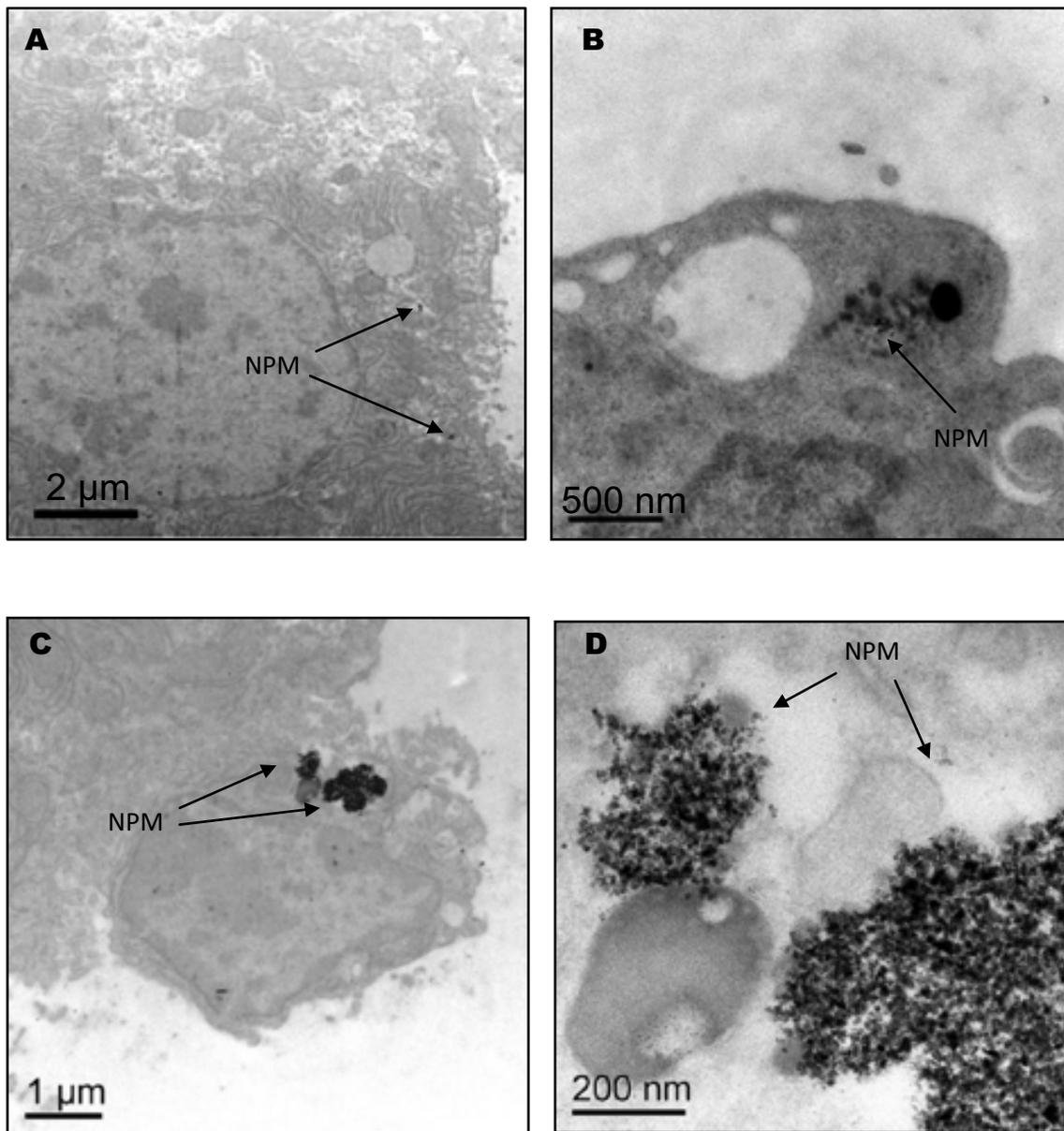


Figura 4-17 - Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos do grupo G6 (1 semana) observados ao microscópio eletrônico de transmissão. Em A é possível observar um hepatócito com pequenos aglomerados de NPM (setas) no seu citoplasma. Em B, uma ampliação da área semelhante mostrando detalhes das NPM. Em C e D uma célula de Kupffer é mostrada contendo numerosos aglomerados de NPM (setas) no seu citoplasma.

4.2.3 Micronúcleo

O teste de micronúcleo mostrou que o tratamento com AL-NPM não induziu aumento na frequência de micronúcleos de eritrócitos normocromáticos em nenhum tempo experimental (dados não apresentados). Também não foi observado aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos após o tratamento com NPM (Tabela 4-2). Por outro lado houve diminuição significativa na porcentagem de eritrócitos policromáticos (%EPC) em todos os tempos estudados, quando comparado ao controle, sugerindo atividade citotóxica.

Tabela 4-2: Efeitos do tratamento de camundongos com AL-NPM na genotoxicidade e citotoxicidade de eritrócitos da medula óssea de camundongos. As células foram coletadas após o tratamento de 12h (G4), 24h (G5), 1 semana (G6) e 1 mês (G7).

GRUPO	MN EPC	% EPC
Controle	5,0 ± 1,9 ^a	47,2 ± 1,5 ^a
G4	5,2 ± 1,5 ^a	41,3 ± 2,7 ^b
G5	5,0 ± 3,1 ^a	41,1 ± 1,8 ^b
G6	5,2 ± 1,9 ^a	41,2 ± 0,8 ^b
G7	5,8 ± 1,5 ^a	42,9 ± 0,3 ^b
Controle Positivo (CF)	12,2 ± 1,7 ^c	36,0 ± 3,0 ^c

MN EPC = Frequência de micronúcleos observados em eritrócitos policromáticos; **%PCE** = Porcentagem de eritrócitos policromáticos; **CF** = Ciclofasfamida. Letras diferentes nos tratamentos mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2.4 Campo magnético

Cortes histológicos de pulmão de animais submetidos ao campo magnético no tórax e que receberam injeção de AL-NPM, demonstram agregados de NPM distribuídos ao longo do parênquima do órgão, semelhante aos grupos que receberam injeção de AL-MPN sem campo aplicado (G2). No entanto, foi possível perceber grandes depósitos de NPM (Figura 4-18 A, B, C e D) localizados em uma única região do órgão. O tamanho destes agregados foi maior do que qualquer outro grupo (Figura 4-18 E e F). Os aglomerados foram encontrados obstruindo completamente artérias de médio calibre.

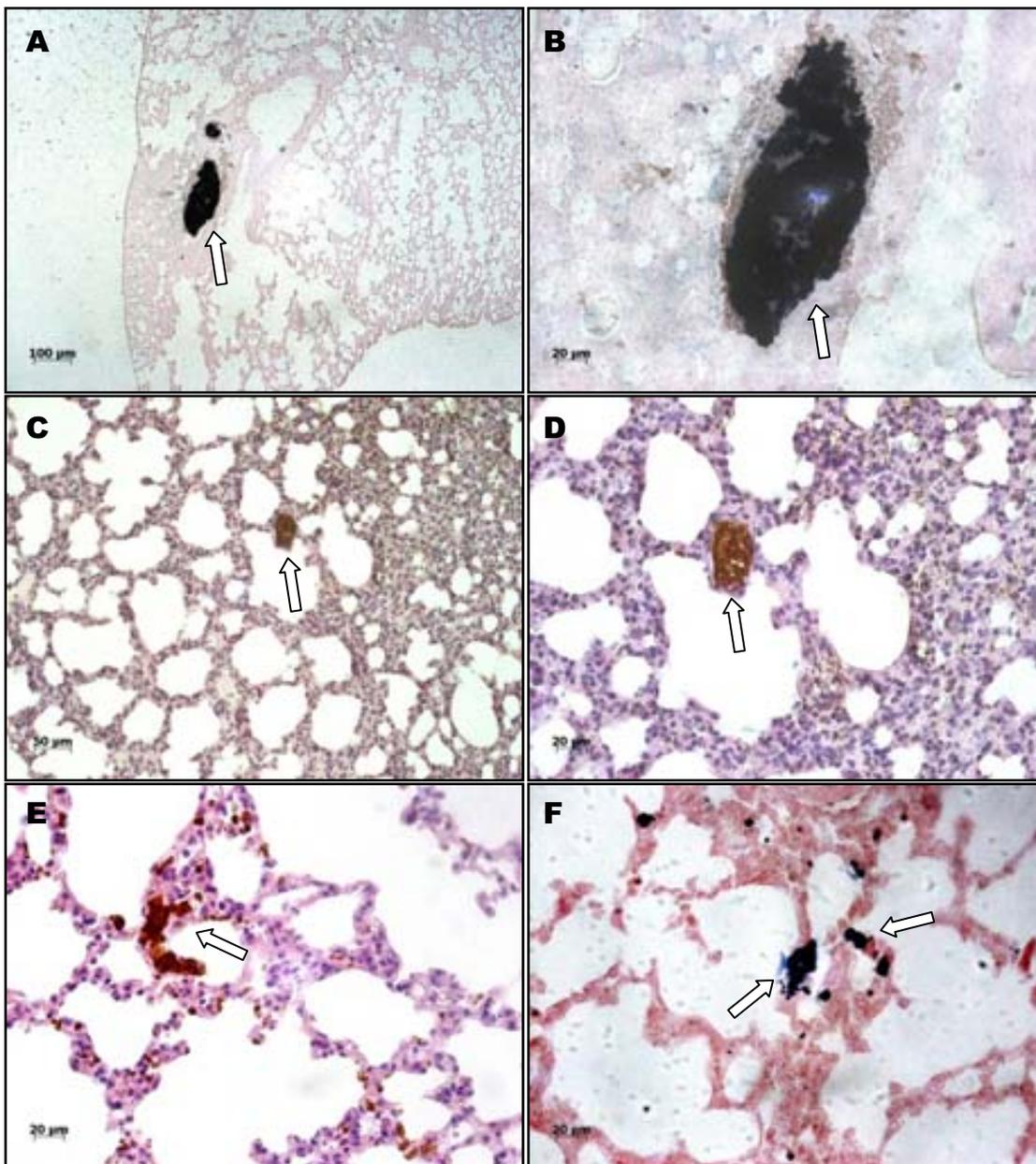


Figura 4-18 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos. Animais submetidos ao campo magnético direcionado para o tórax (A, B, C e D) exibiram grandes aglomerados de NPM (setas) marrons (coloração por H&E) ou azuis (coloração de Perls) em vasos de médio calibre. Compare com as fotos de animais sem tratamento com campo, G1 (E) e G2 (F). Coloração por H&E (C, D e E) e Perls (A, B, C, D e E).

A histologia de cerebelo (Figura 4-19 A) mostra a substância cinza (região que contém corpos celulares de neurônios) subdividida em três regiões: camada molecular, camada granular, e entre elas uma única camada de neurônios, a camada de células de Purkinje (não mostrado). A substância branca é encontrada como uma região clara no centro. Cortes histológicos de cérebro mostram (Figura 4-19 B) a região da substância cinza, exibindo diversos corpos de neurônios.

Animais injetados com AL-NPM e submetidos a campo magnético na região encefálica demonstram poucos agregados de NPM presentes no córtex cerebral. Os agregados não parecem estar associados nenhuma célula do tecido. Nenhuma partícula foi percebida em cortes histológicos de animais injetados e sem tratamento por campo.

Os agregados de NPM foram encontrados na substância cinza de cérebro de quatro animais experimentais, e na camada molecular da substância cinza do cerebelo de um animal. Quando os cortes semi-seriados foram colocados em seqüência, foi notada a deposição pontual desses agregados no tecido. As Figuras 4-19 B e C mostram dois cortes em seqüência de cerebelo. Seqüência semelhante no cérebro é mostrada nas Figuras 4-19 D e E.

Os cortes de pulmão dos animais submetidos ao campo direcionado na cabeça não demonstram diferença na deposição de NPM quando comparados ao grupo de biodistribuição G2 (dados não mostrados).

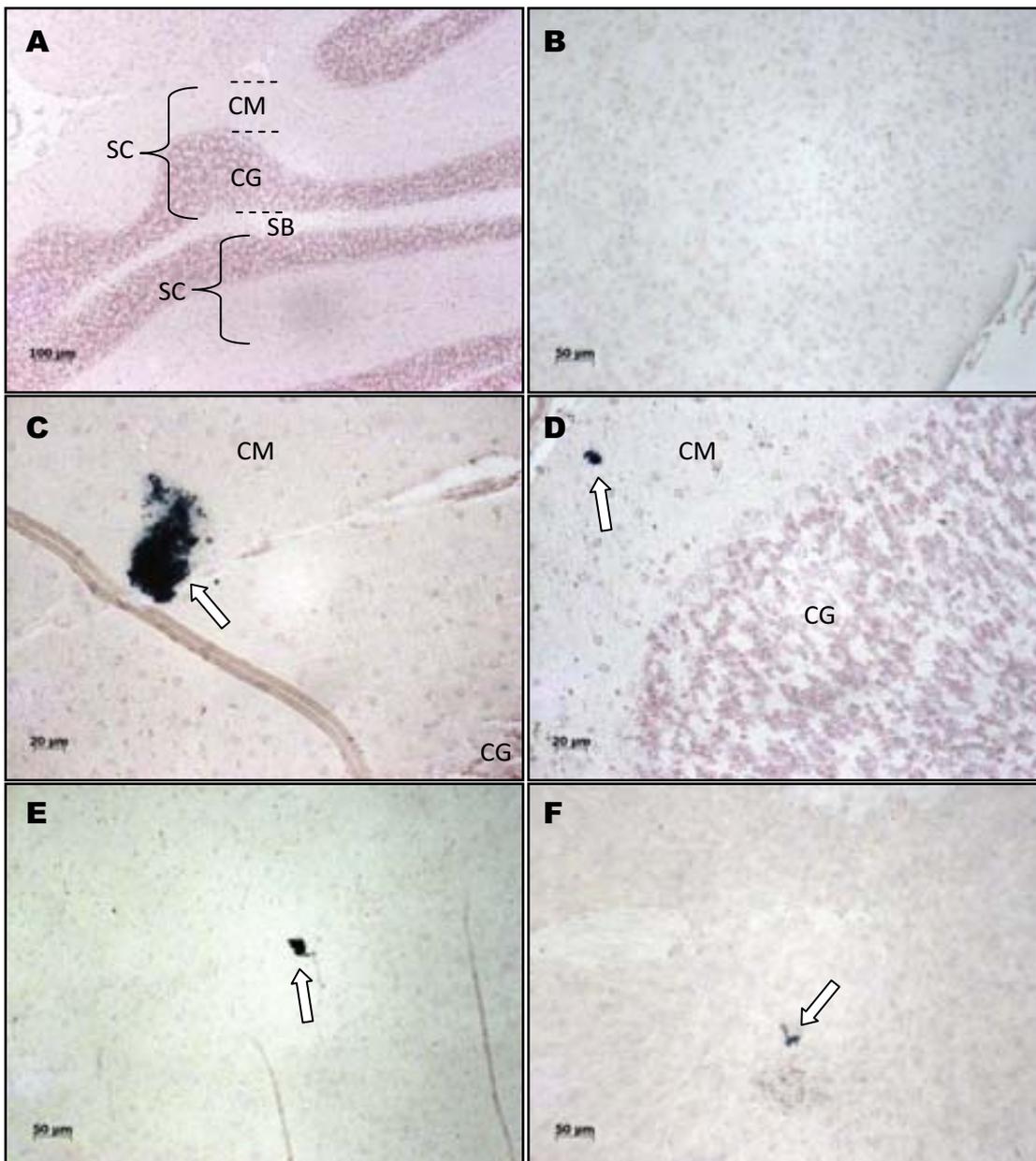


Figura 4-19 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos corados pelo método de Perls. Animais injetados e sem tratamento TRAT03 não apresentam NPM no cerebelo (A) e cérebro (B). Animais do grupo TRAT01 (C, D, E e F). Em A, corte histológico de seção do cerebelo, e em B seção seguinte quando desprezado 50 µm. Em C corte histológico de seção de cérebro, e em B seção seguinte quando desprezado 50µm. Grande aglomerados de NPM (setas) pode ser percebido na substância branca dos órgãos. Compare com as fotos de animais sem tratamento com campo (cerebelo em E e cérebro em F). SB = substância cinza, CM = camada molecular, CG = camada granular, SB = substância branca.

5 DISCUSSÃO

O ferro é o elemento mais utilizado na confecção de NPM em aplicações biomédicas por ser o metal mais abundante nos organismos. Esta característica acarreta na presença de diversos mecanismos moleculares nos organismos de controle da quantidade de ferro, em células e tecidos (CARTRON, et al. 2006, GANZ 2007). Esses mecanismos tornam-se ainda mais relevantes quando consideramos que tratamentos envolvendo NPM contendo óxidos de ferro elevam a oferta de elemento de ferro no organismo. Esta presença pode acarretar a formação de radicais livres e, conseqüentemente, causar danos às membranas e ao DNA das células, aumentando dessa forma a mortalidade celular (EMERIT, BEAUMONT e TRIVIN 2001).

Os dados obtidos na cultura de células sugerem que AL-NPM não interfere de forma significativamente no metabolismo de células de tecido conjuntivo (CHMI e FHN) nas concentrações testadas. No entanto, macrófagos peritoneais apresentaram uma diminuição na viabilidade quando tratados em altas concentrações (250µg e 25µg de AL-NPM). Quando comparados aos outros dois tipos celulares estudados, podemos inferir que este fenômeno provavelmente está associado a maior capacidade fagocítica dos macrófagos, uma vez que dados da literatura já demonstram essa maior habilidade neste tipo celular, inclusive englobando nanomateriais que são desenhados para evadir o sistema imune (XIA e TRIFFTT 2006). A resposta comum dos macrófagos quando confrontadas a materiais externos é a liberação de quimioatratantes para mais leucócitos, potencializando a resposta imunológica em organismos.

A interação macrófago e AL-NPM pode ter desencadeado uma toxicidade pelo maior acúmulo de Ferro e ácido láurico. O acúmulo de ácidos graxos também está relacionado a diversas patologias nos organismos, justamente ao oxidar compostos orgânicos básicos (LIMA, et al. 2002, HUANG, et al. 2005). Em um recente trabalho (PRADHAN, et al. 2007), NPM de magnetita estabilizadas por ácido láurico demonstraram toxicidade em fibroblastos de camundongos em concentrações maiores 400µg/ml de ferro, maior do que aquela utilizada neste trabalho. A comparação dos resultados obtidos nestes estudos são semelhantes, quando comparamos a faixa de concentração de NPM utilizada e o tipo celular estudado.

Quando comparados os resultados obtidos a estudos onde se utilizam centros metálicos com outros óxidos de ferro e a mesma cobertura (ácido lúrico), não foi possível notar diferenças na resposta celular quando comparamos o núcleo de magnetita e maguemita (PRADHAN, et al. 2007). Nenhum estudo demonstrou ainda diferenças na resposta celular quando tratados com os diversos tipos de óxidos de ferro, empregando-se a mesma cobertura.

O fator agregador de AL-NPM em meio de cultura pode ser outro fator que contribuiu com a resposta mais acentuada de macrófagos peritoneais. Em alguns trabalhos (PRADHAN, et al. 2007) é proposto que a maior concentração de NPM leva a uma maior aglomeração das partículas. Este fenômeno diminui a superfície de contato das partículas, e assim dificultam a sua endocitose por células. Os dados experimentais de AL-MPN demonstram a manutenção do raio hidrodinâmico próximo a um valor fixo, mesmo quando sua concentração é aumentada (Tabela 3-2). Estes dados experimentais sugerem que o raio

hidrodinâmico sofre pouca variação quando a sua concentração é alternada e assim, a maior aglomeração das NPM não é evidenciada.

Nos testes em animais, a amostra mostrou-se de difícil aplicação, já que como explicado anteriormente, a amostra naturalmente forma aglomerados quando em contato com o sangue. Percebeu-se que nos animais testados (camundongos swiss) a aplicação provavelmente compromete os vasos sanguíneos submetidos à injeção aplicados, provavelmente impossibilitando futuras injeções. É sugerido em a averiguação de novos modelos animais (de maior porte) para permitir sucessivas injeções. Também devemos considerar a possibilidade de aplicação através do outra via, como injeções intraperitoneais e intramusculares. Depois de aplicado, nenhum efeito físico foi percebido nos animais, mesmo após um mês de injeção.

Nos exames histopatológicos, as AL-NPM quando em contato com os órgãos estudados, não demonstraram qualquer alteração severa. O espessamento do parênquima pulmonar encontrado nas observações histológicas são encontrados também em outros outros trabalhos que utilizaram diferentes coberturas e partículas (Garcia, et al. 2005, Sadeghiani, et al. 2005). Nos trabalhos recentes que utilizam ácido láurico, não foram feitos testes *in vivo* (PRADHAN, et al. 2007) ou a NPM está contido em outro sistema de nanomateriais, como magnetolipossomo (DE CUYPER, et al. 2007). O espessamento do parênquima pulmonar foi relacionado com a presença células inflamatórias, um indicativo de que uma resposta inflamatória está em curso no tecido conjuntivo. Está resposta mostrou-se reversível em outros modelos experimentais com MPN ((GARCIA, et al. 2002), e os dados experimentais do trabalho atuam sustentam essas evidências, uma vez que o

espessamento encontrado nos animais de tempos curtos de tratamento (até 2 horas de tratamento) mostrou uma clara diminuição nos tempos experimentais mais longos (um mês).

O efeito agregador de AL-NPM no sangue parece também ser o responsável pela aparente afinidade da partícula ao pulmão. É proposto que, AL-MPN quando injetados, formam aglomerados quando em contato com o fluido sanguíneo, que possui concentrações semelhantes às encontradas no meio de cultura. Estes aglomerados seriam rapidamente conduzidos aos diminutos capilares existentes no pulmão, formando os aparentes depósitos nos exames morfológicos (Figura 4-5 e Figura 4-6). No entanto, estes aglomerados rapidamente são desfeitos no órgão (após 30 minutos e 2 horas). A diminuição da presença de aglomerados de AL-NPM coincide com o aumento de marcação para ferro em fígado e baço. O quando essa afinidade se deve por esse mero fator físico, ou se afinidades químicas contribuem para o fenômeno permanecem em aberto.

A retenção de NPM no baço e fígado é amplamente descrito na literatura. Animais submetidos a injeções de NPM de magnetita recobertas por dextran (Lacava, et al. 2004) mostram um direcionamento das NPM do sangue diretamente para estes órgãos. Nas NPM de maguemita recobertas por DMSA (Chaves, et al. 2005), as partículas surgiram primeiro no pulmão, e até 24 horas após o tratamento foi notada a presença das partículas no fígado, porém não foi demonstrado presença das partículas em baço. O estudo realizado com NPM recobertas por ácido poliaspártico (Sadeghiani, et al. 2005) mostram a retenção das partículas em pulmão, fígado e baço mesmo após 15 dias de injeção. Como comentado anteriormente, esta afinidade diferenciada

certamente é atribuído a natureza química da cobertura e não ao emprego dos diferentes óxidos de ferro.

O fígado e baço são órgãos estão interpostos na circulação sistêmica e, entre outras funções, realizam filtração e remoção de partículas e patógenos do sangue. O fígado é o órgão que mais possui macrófagos (célula de Kupffer) no corpo, e por isso sempre está associado à captação de NPM em diversos estudos (MORNET, et al. 2006, BARBOSA 2004, Chaves, et al. 2005, Garcia, et al. 2005, Kim, et al. 2006). Nos tempos experimentais testados nos animais, foi possível notar a progressão da presença baixa marcação para ferro nos sinusóides hepáticos e nas células de Kupffer e tempos experimentais mais curtos, até atingirem uma marcação máxima após um mês de tratamento. Estudos utilizando NPM recobertas por DMSA (BARCELLOS, et al. 2003) mostram um tempo de retenção no fígado que pode ser notado até trinta dias após a injeção. Após noventa dias, indícios de alterações morfológicas foram observados. Apesar dos achados anteriores em meio de cultura com macrófagos peritoneais terem mostrado um diminuição da viabilidade celular em maiores concentração de AL-NPM, no fígado a células podem ser repostas, e assim não causar prejuízos ao organismo.

O baço é o maior órgão linfóide interposto na circulação sistêmica. Artérias originadas da cápsula do órgão penetram no tecido esplênico e são envoltas por tecido linfóide frouxo, formando a polpa branca. Essas artérias saem da polpa branca e podem confluir a uma circulação aberta na polpa vermelha, nos chamados sinusóides esplênicos, delimitados por numerosos macrófagos e linfócitos. As NPM injetadas são encontradas nos sinusóides da polpa vermelha, como evidenciado nas pranchas de figuras 4-9 a 4-13. Foi

notado nas análises morfológicas que a maior concentração de NPM) levam a um extravasamento a polpa branca, provavelmente através de espaços na matriz. Este processo explica o padrão de infiltração periférico encontrado na polpa branca e as fotomicrografias de baço tiradas na MET (Figura 4-13) demonstram a grande presença de partículas na matriz extracelular. Vale ressaltar que nenhum efeito patológico foi observado no órgão, apesar da grande quantidade de AL-NPM acumulado.

Nos testes de micronúcleo, o efeito genotóxico é avaliado por meio da incidência de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos, pois os mesmos possuem um tempo de vida curto, de modo que, qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (RIBEIRO 2003). Os resultados encontrados no teste de micronúcleo mostram que a amostra de AL-NPM não é genotóxica aos animais tratados, na dose e tempos utilizados. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, nos quais foram utilizados materiais magnéticos (GARCIA, et al. 2002).

O efeito citotóxico é avaliado por meio do percentual de eritrócitos policromáticos (%EPC). Normalmente, o %EPC varia de 50 a 60%, sendo que valores menores que 20% em relação ao controle indicam citotoxicidade (RIBEIRO 2003).

Os resultados deste estudo evidenciaram efeito citotóxico AL-NPM em todos os tempos avaliados. Resultados similares foram encontrados em outros trabalhos, nos quais os autores verificaram redução de %EPC após tratamento com NPM, porém a natureza química destas amostras eram diferentes: Magnetita recoberta com ácido glucônico (BARBOSA 2004), ácido

Poliaspartico (Sadeghiani, et al. 2005) e ferrita de cobalto recobertas com ácido cítrico (KÜCKELHAUS, et al. 2003). Porém, este efeito foi considerado brando, uma vez que a representou uma leve queda em comparação ao grupo controle (Tabela 4-2).

Como foi demonstrado nos resultados de RM (Tabela 4-1), AL-NPM não foram encontrados em cérebro de animais injetado. No entanto, em animais submetidos ao campo magnético, este quadro foi revertido. Quando consideramos o órgão como um todo, notamos que uma pequena área do órgão, associada à região de indução do campo magnético, demonstrou acúmulos pontuais de NPM. Trabalhos recentes usando NPM ligados a peptídeos (BULTE e KRAITCHMAN 2004) e lipossomas contendo NPM (Rivière, et al. 2007) demonstraram que a migração das partículas ocorre basicamente através da microcirculação do órgão. Nenhum vaso sanguíneo próximo aos aglomerados foi notado, e os mecanismos nos quais ocorre essa migração no trabalho atual não estão claros. A presença de NPM em cerebelo e não ao cérebro de um animal experimental pode estar relacionado ao posicionamento deste animal na bobina de Helmholtz, que ocasionou uma indução magnética diretamente na área deste órgão.

Outros estudos demonstram que a aplicação de um campo magnético direcionado a cabeça de animais experimentais aumentam a concentração das NPM no tecido nervoso, mesmo para aquelas partículas com baixa afinidade a esse tecido. A aplicação de campo também aumenta o tempo de permanência das partículas no tecido cerebral (Chertok, A. Moffatb, et al. 2008).

Os resultados obtidos na atração magnética direcionada ao tórax de animais injetados por AL-NPM sugerem uma maior susceptibilidade neste

órgão ao campo. Este fato se deve provavelmente pela presença de aglomerados nos capilares do órgão. Nos sistemas magnéticos, o tamanho está diretamente relacionado à suscetibilidade magnética. Partículas menores que $1\mu\text{m}$ são de difícil resposta magnética (FORBES, et al. 2003), por isso muitos grupos usam como estratégia para potencializar esta resposta justamente a aglomeração de NPM, como na separação de neutrófilos em solução (Hoshino, Ohnishi e Yas 2007). Os resultados obtidos na atração magnética direcionada ao tórax de animais injetados por AL-NPM sugerem uma maior susceptibilidade neste órgão ao campo pela presença de grandes aglomerados presentes no tecido.

A qualidade dos resultados obtidos no direcionamento magnético está diretamente relacionada com o equipamento. Na bobina de Helmholtz utilizada no experimento, duas peças metálicas de formato cilíndrico garantem o campo magnético uniforme do sistema (Figura 5-1 A). O formato destes cilindros gera um campo magnético apenas nas bordas de cada peça. A utilização de peças com formato mais triangulares (afiados) permite um campo de maior intensidade e localização mais pontual (Figura 5-1 B).

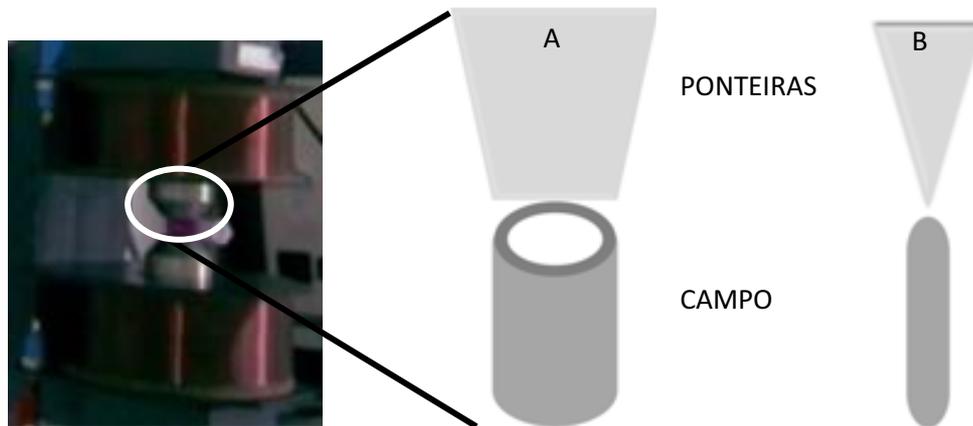


Figura 5-1 - Figuras esquemáticas mostrando o campo magnético gerado no experimento (A) e o modelo proposto (B).

6 CONCLUSÃO

Com base nas possíveis aplicações das nanopartículas magnéticas em sistemas biológicos, este trabalho visou à análise dos efeitos de um novo FM contendo NPM de maguemita revestidas por dupla camada de ácido láurico (AL-NPM) em células cultivadas (*in vitro*) e em camundongos machos submetidos a uma injeção endovenosa do FM. Os resultados permitem concluir que:

- Os testes *in vitro* demonstraram que AL-NPM não interferem com a viabilidade de células CHMI e FNH quando utilizamos concentrações de AL-NPM que variam de 250 μ g a 0,25 μ g de ferro. Porém em macrófagos peritoneais apresentaram diferença estatística significativa em concentrações de 250 μ g e 25 μ g de Ferro, com uma redução na viabilidade celular;
- A distribuição de AL-NPM injetados em camundongos swiss determinado por RM mostrou presença de NPM em baço e fígado após 24 e 48 horas da injeção. Em pulmão NPM foram detectadas apenas no tempo de 24 horas;
- Análises histológicas demonstraram a presença de NPM no tecido pulmonar, em vasos sanguíneos e parênquima pulmonar, com algumas regiões de espessamento associados. A quantidade de NPM observada foi progressivamente de uma quantidade dita máxima no grupo G1 a menor quantidade nos grupos G6 e G7;
- As NPM foram detectadas na polpa vermelha do baço de animais do grupo G2, tendo pico máximo de concentração em G7. Quando presente na polpa branca exibe uma migração periférica. As NPM são

encontradas preferencialmente nos sinusóides. Não foi detectado adulterações morfológicas no órgão;

- As NPM foram detectadas no fígado majoritariamente dentre de células de Kupffer, apesar de que na MET foi possível observar hepatócitos com partículas. A quantidade de NPM teve um padrão similar aquele encontrado no baço. Não foi detectado adulterações morfológicas no órgão;
- O teste do micronúcleo demonstrou que AL-NPM não causou nenhum efeito genotóxico em eritrócitos jovens da medula óssea de animais submetidos a injeções de AL-NPM, porém exibiu um leve efeito citotóxico em todos os tempos experimentais;
- A atração magnética mostrou-se eficiente no direcionamento de partículas no tecido cerebral, demonstrando que pequenas quantidades de AL-NPM podem ser conduzidas a sítios novos de deposição;
- A atração magnética no pulmão não alterou o perfio de distribuição de AL-NPM no tecido pulmonar, porém causou a aglomeração de NPM em vasos de médio calibre no órgão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Type Culture Collection (ATCC) . “MTT Cell Proliferation Assay Instructions.” *ATCC Instructions*. 2001.

BAKUZIS, A.F., P.C. MORAIS, e F. PELEGRENI. “Surface and exchange anisotropy fields in MnFe₂O₄ nanoparticles: Size and temperature effects.” *Journal of Applied Physics*, 1999: 7480 - 7482.

BALLOU, BYRON, B. CHRISTOFFER LAGERHOLM, , LAUREN A. ERNST, MARCEL P. BRUCHEZ, e ALAN S. WAGGONER. “Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice.” 2004: 79-86.

BARBOSA, LUZIRLANE DOS SANTOS. “Avaliação in vivo da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico.” *Dissertação de mestrado em Patologia Molecular - UnB*. Brasília, 2004.

BARCELLOS, NATHALIA, RICARDO BENTES DE AZEVEDO, MÔNICA PEREIRA GARCIA, SACHA BRAUN CHAVES, LUCIANO PAULINO DA SILVA, e ZULMIRA GUERRERO LACAVAL. “Análise morfológica de camundongos tratados com fluido magnético recoberto com DMSA.” *Anais do 9º Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília*. 2003.

BULTE, JEFF W. M., e DARA L. KRAITCHMAN. “Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging.” *NMR IN BIOMEDICINE*, 2004: 484–499.

CARTRON, MICHAËL L. , SARAH MADDOCKS, PAUL GILLING, C. JEREMY CRAVEN, e SIMON C. ANDREWS. “Fe⁰ – Transport of Ferrous Iron into Bacteria.” *BioMetals*, 2006: 143-157.

CHAVES, S. B., et al. "Light Microscopy and Magnetic Resonance." *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS*, 2002: 3231-3233.

Chaves, S. B., L. P. Silva, Z. G. M. Lacava, P. C. Morais, e R. B. Azevedo. "Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles." *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, 2005: 10Q915-1 - 10Q915-3.

Chertok, Beata, Allan E. David, Yongzhuo Huang, e Victor C. Yang. "Glioma selectivity of magnetically targeted nanoparticles: A role of abnormal tumor hydrodynamics." *Journal of Controlled Release*, 2007: 315–323.

Chertok, Beata, Bradford A. Moffatb, Davi Allan E., Faquan Yua, e Christian Bergemann. "Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors." *Biomaterials*, 2008: 487–496.

DE CUYPER, MARCEL, STEFAAN J.H. SOENEN, KENNETH COENEGRACHTS, e LEÓN TER BEEK. "Surface functionalization of magnetoliposomes in view of improving iron oxide-based magnetic resonance imaging contrast agents: Anchoring of gadolinium ions to a lipophilic chelate." *Analytical Biochemistry*, 2007: 266–273.

EMERIT, J., C. BEAUMONT, e F. TRIVIN. "Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury." *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 2001: 333-339.

EPA. "Mammalian erythrocyte micronucleus test." *Health Effects Test Guidelines*. 2004.

FORBES, ZACHARY G., BENJAMIN B. YELLEN, KENNETH A. BARBEE, e GARY FRIEDMAN. "An Approach to Targeted Drug Delivery Based on Uniform Magnetic Fields." *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS*, 2003: 3372-3377.

FRIEBE, LARS, KUN LIU, BORIS OBERMEIER, SREBRI PETROV, PAUL DUBE, e IAN MANNERS. "Pyrolysis of Polycarbosilanes with Pendant Nickel Clusters: Synthesis and Characterization of Magnetic Ceramics Containing Nickel and Nickel Silicide Nanoparticles." *Chemistry of Materials*, 2007, 10 ed.: 2630-2640.

GANZ, TOMAS. "Molecular Control of Iron Transport." *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007: 394-400.

Garcia, Mônica Pereira, et al. "Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005: 277–282.

GARCIA, V. A. P., et al. "Magnetoliposome evaluation using cytometry and micronucleus test." *European Cells and Materials*, 2002: 154-155.

H. McNaughton, Brandon, Rodney R. Agayan, Roy Clarke, Ron G. Smith, e Raoul Kopelman. "Single bacterial cell detection with nonlinear rotational frequency shifts of driven magnetic microspheres." *Applied Physics Letters*, 2007, 22 ed.: 224105-1 - 224105-3.

HONG, YOUNGJUN, e GI-RA YI. "Industrial Applications of Sol-Gel Technology." *Solid State Phenomena*, 2007: 619-622.

Hoshino, Akiyoshi, Noriyuki Ohnishi, e Masato Yas. "Separation of Murine Neutrophils and Macrophages by Thermoresponsive." *Biotechnology Progress*, 2007: 1513-1516.

HOU, Y., H. KONDOH, T. OHTA, e S. GAO. "Size-controlled synthesis of nickel nanoparticles." *Applied Surface Science*, 2005, 1-2 ed.: 218-222.

HUANG, FRANKLIN W., JACK L. PINKUS, GERALDINE S. PINKUS, MARK D. FLEMING, e NANCY C. ANDREWS. "A mouse model of juvenile hemochromatosis." *The journal of clinical investigation*, 2005: 2187-2191.

Jackson, John David. *Classical Electrodynamics*. 3a edição. New York: Wiley, 1999.

Johannsen, Manfred, et al. "Thermal therapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles." *Actas Urológicas Españolas*, 2007, 6 ed.: 660-667.

Kang, Bin, Shu-quan Chang, Yao-dong Dai, e Da Chen. "Radiation synthesis and magnetic properties of novel Co_{0.7}Fe_{0.3}/Chitosan compound nanoparticles for targeted drug carrier." *Radiation Physics and Chemistry*, 2007, 6 ed.: 968-973.

Kelly, K., et al. "TARGETED NANOPARTICLES FOR IMAGING INCIPIENT PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA." *Pancreas*, 2007, 4 ed.: 408.

Kettering, M, et al. "Magnetic nanoparticles as bimodal tools in magnetically induced labelling and magnetic heating of tumour cells." *Nanotechnology*, 2007: 1-9.

Kim, Jun Sung, et al. "Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice." *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 2006: 338–347.

KÜCKELHAUS, S., et al. "Biological investigation of a citrate-coated cobalt–ferrite-based magnetic fluid." *Journal of Applied Physics*, 2003: 6707–6708.

Lacava, L.M., et al. "Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004: 2434–2435.

LACAVA, L.M., et al. "Use of magnetic resonance to study biodistribution." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2002: 367–369.

Lacava, Z. G. M., et al. "Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999: 431-434.

LIMA, E.C.D., e P.C. MORAIS. *Técnicas de preparação de nanopartículas*. Vol. 1, em *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, por N. DURAN, L.H.C. MATOSO e P.C. MORAIS, 83-99. São Paulo: Artliber, 2006.

LIMA, T.M., C.C. KANUNFREK, C. POMPEIA, R. VERLEN, e R. CURI. "Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis." *Toxicology in Vitro*, 2002: 741–747.

Lin, Po-Chiao, Mei-Chun Tseng, An-Kai Su, Yu-Ju Chen, e Chun-Cheng Lin. "Functionalized Magnetic Nanoparticles for Small-Molecule Isolation, Identification, and Quantification." *Analytical Chemistry*, 2007: 3401-3408.

Liu, Huinan, e Thomas Jay Webster. "Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools." *Biomaterials*, 28 de 2007: 354–369.

Lu, An-Hui, E. L. Salabas, e Ferdi Schüth. "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application." *Angewandte Chemie International Edition*, 2007: 1222 - 1244.

Massart, R. Magnetic fluids and process for obtaining them. Estados Unidos Patente 4 329 241. 1982.

Montet, Xavier, Ralph Weissleder, e Lee Josephson. "Imaging Pancreatic Cancer with a Peptide-Nanoparticle Conjugate Targeted to Normal Pancreas." *Bioconjugate Chemistry*, 2006: 905 -911.

MORNET, S., et al. "Magnetic nanoparticle design for medical applications." *Progress in Solid State Chemistry*, 2006: 237-247.

Mykhaylyk, Olga, Dialekti Vlaskou, Nittaya Tresilwised, e Pimolpan Pithayanukul. "Magnetic nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007: 275–281.

Pankhurst, Q A. "Nanomagnetic medical sensors and treatment methodologies." *BT Technology Journal*, 2006, 3 ed.: 33-38.

PARK, BARRY. "Current and Future Applications of Nanotechnology." *Environmental Science and Technology*. 2007.

Pörtner, Ralf. *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. 2a edição. Humana press, 2007.

PRADHAN, PALLAB, JYOTSNENDU GIRI, RINTI BANERJEE, JAYESH BELLARE, e DHIRENDRA BAHADUR. “Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007: 282–287.

Primo, Fernando L., et al. “Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007: 354–357.

Racuciu, , M., D.E. Creanga, V. Badescu, e N. Sulitanu. “Microstructural investigation of some biocompatible ferrofluids.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007: e772–e775.

Reddy, Sai T, Melody A. Swartz, e Jeffrey A. Hubbell. “Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines.” *Trends in Immunology*, 12 de 2006: 553-559.

RIBEIRO, L. R. “Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo.” Cáp. 7 em *Mutagênese Ambiental*, por L. R. RIBEIRO, D. M. F. SALVADORI e E MARQUES, 173 – 200. CANOAS: ULBRA, 2003.

Rivière, Charlotte, et al. “Magnetic Targeting of Nanometric Magnetic Fluid-loaded Liposomes to Specific Brain Intravascular Areas: A Dynamic Imaging Study in Mice.” *Radiology*, 2007: 439-448.

Roach, Paul, David Eglin, Kirsty Rohde, e Carole C. Perry. “Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications.” *Journal of Materials Science*, 2007: 1263–1277.

Rosensweig, Ronald E. *Ferrohydrodynamics*. NY: Cambridge University Press, 1985.

Russell, Mai, e Yoshimi Anzai. "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide enhanced MR imaging for lymph node metastases." *Radiography*, 2007, 1 ed.: e73-e84.

Sadeghiani, N., L.S. Barbosa, L.P. Silva, R.B. Azevedo, e P.C. Morais. "Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005: 466-468 .

SAI T. REDDY, MELODY A. SWARTZ, e JEFFREY A. HUBBELLI. "Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines." *Trends in Immunology*, 12 de 2006: 553-559.

Saiyeda, Z.M., C. Bochiwala, H. Gorasiaa, e S.D. Tela. "Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells." *Analytical Biochemistry*, 2006, 2 ed.: 306-308 .

Schmid, W. "The micronucleus test." *Mutation Research*, 1975: 9-15.

SCHULTE, JÜRGEN, JOHN WILEY, e SONS. *Nanotechnology: Global Strategies, Industry Trends and Applications*. Wiley, 2005.

SHAW, D. J. *Introdução à Química dos Colóides de Superfícies*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1975.

SINCAI, MARIANA, DIANA GANGA, MARIUS GANGA, DIANA ARGHERIE, e DOINA BICA. "Antitumor effect of magnetite nanoparticles in cat mammary

adenocarcinoma.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007: 438–441.

SON, DONGYEON, DAE-RYONG JUNG, JONGMIN KIM, TAEHO MOON, CHUNJOONG KIM, e BYUNGWOO PARK. “Synthesis and photoluminescence of Mn-doped zinc sulfide nanoparticles.” *Applied Physics Letters*, 2007: 101910.

Tolosa, Erasmo Magalhães de Castro de, Consuelo Junqueira Rodrigues, Oswaldo Arruda Behmer, e Antonio Geraldo de Freitas Neto. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. Manole, 2003.

VEKAS, LADISLAU, DOINA BICA, e MIKHAIL V. AVDEEV. “Magnetic nanoparticles and concentrated magnetic nanofluids: Synthesis, properties and some applications.” *China Particuology*, 2007: 43–49.

Wang, Joseph. “Nanomaterial-based electrochemical biosensors.” *The Analyst*, 2005: 421–426.

WU, SZU-HAN, e DONG-HWANG CHEN. “Synthesis of high-concentration Cu nanoparticles in aqueous CTAB solutions.” *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 1 ed.: 165-169.

XIA, ZHIDAO, e JAMES T TRIFFTT. “A review on macrophage responses to biomaterials.” *BIOMEDICAL MATERIALS*, 2006: R1-R9.

XIANG, JIE, WEI LU, YONGJIE HU, YUE WU, HAO YAN, e CHARLES M. LIEBER. “Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice.” *Nature*, 2006: 489 - 493.

YAMAMOTO, HIROMITSU, YOSHIO KUNO, SHOHEI SUGIMOTO, HIROFUMI TAKEUCHI, e YOSHIKI KAWASHIMA. "Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions." *Journal of Controlled Release*, 2005, 2 ed.: 373-381.

8 APÊNDICE

8.1 Síntese de AL-NPM

8.1.1 Síntese da Magnetita (Fe_3O_4)

Foram preparadas 100 mL de duas soluções contendo 9,94 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 27,03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, soluções de $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente. As soluções foram misturadas, sob agitação mecânica, e foram adicionados 100 mL de NH_4OH a 25%. Um precipitado negro foi instantaneamente formado. O sistema continuou sob agitação a temperatura ambiente por 20 minutos. Após o referido período as partículas foram sedimentadas com o auxílio de um ímã e o sobrenadante removido. Em seguida as partículas foram lavadas por cinco vezes, com água destilada, para a remoção dos contra-íons.

8.1.2 Síntese da Maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

As partículas de Fe_3O_4 produzidas pelo método descrito anteriormente, puderam ser oxidadas à $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. A estas partículas de magnetita foram adicionados 80 mL de uma solução de HNO_3 a $2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e 120 mL de uma solução preparada a partir de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ $0,35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Em seguida, a mistura foi aquecida até ebulição por 2 h. Por vezes, foi adicionada água destilada para evitar a secura do sistema. Após o referido período houve a mudança da coloração negra das partículas de magnetita para

coloração marrom, evidenciando-se a oxidação. As partículas foram sedimentadas com o auxílio de um imã e o sobrenadante removido. Em seguida as partículas foram lavadas por três vezes, com HCl 1mol.L⁻¹.

8.1.3 Preparação das partículas de maguemita funcionalizadas com monocamada de laurato

As partículas de maguemita foram dispersas em água e o sistema foi aquecido até atingir temperatura aproximada de 60 °C, sob agitação mecânica ininterrupta. Ainda nestas condições 1,8 g de ácido láurico foi adicionado. O pH foi ajustado para oito com algumas gotas de NH₄OH concentrado. A temperatura foi aumentada para 75 °C e mantida neste patamar por 30 minutos. Ao término deste período, as partículas funcionalizadas passaram a ter caráter hidrofóbico, devido à funcionalização da monocamada de laurato nas nanopartículas. Em seguida as partículas foram lavadas por cinco vezes, com água destilada, para a remoção dos contra-íons.

8.1.4 Preparação das partículas de maguemita funcionalizadas com bicamada de laurato. (AL - NMP)

Procedimento semelhante à formação da monocamada foi adotado. As nanopartículas funcionalizadas com laurato foram adicionadas a água em um

béquer. As nanopartículas não se dispersam em água devido ao caráter hidrofóbico proveniente da funcionalização com o laurato. O sistema foi aquecido até atingir temperatura aproximada de 60 °C, sob agitação mecânica ininterrupta. Ainda nestas condições o ácido láurico foi adicionado. O pH foi ajustado para oito com algumas gotas de NH₄OH concentrado. A temperatura foi aumentada para 75 °C e mantida neste patamar por 30 minutos. Ao término deste período, as partículas se dispersaram espontaneamente na fase aquosa formando um fluido magnético, evidenciando o caráter hidrofílico, devido à funcionalização de mais uma camada de laurato nas nanopartículas. O fluido de bicamada foi dialisado em membrana semipermeável em água deionizada para remoção do excesso de ácido láurico. Após a diálise, o pH do fluido magnético foi ajustado para pH = 7, pela adição de soluções aquosas de NaOH e HCl.

8.1.5 Modelo de AL-MNP

A Figura 8-1 ilustra modelos estruturais da molécula de ácido láurico. As nanopartículas funcionalizadas com monocamada de laurato podem ser representadas pela Figura 8-2 A. As nanopartículas funcionalizadas com bicamada de laurato podem ser representadas pela Figura 8-2 A. Estes são modelos genéricos de possibilidades ideais.

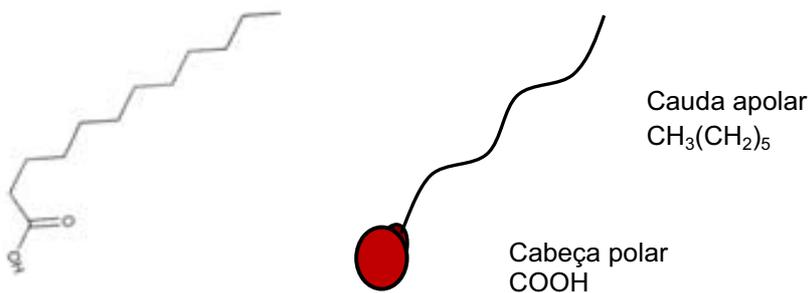


Figura 8-1 - Modelos esquemáticos da molécula de ácido láurico

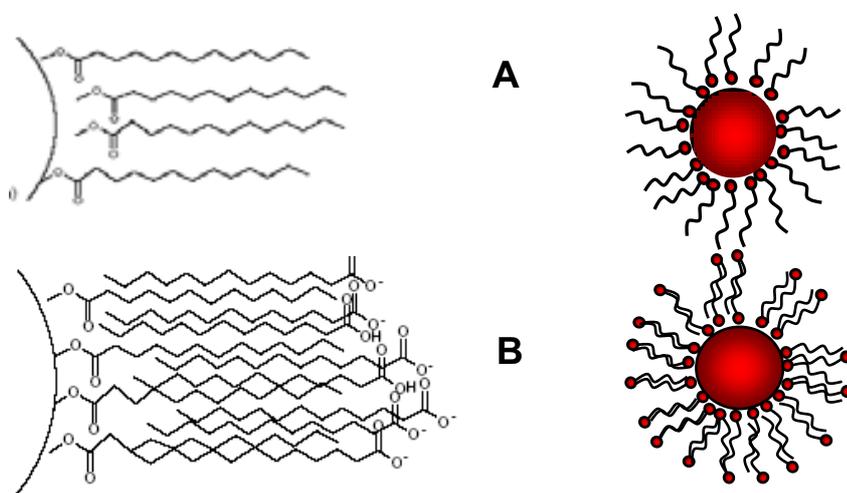


Figura 8-2 - Figuras ilustrativas do arranjo molecular encontrado em AL-MNP com monocamada de ácido láurico (A) e bicamada (B).