

5) Discussão

5.1) Análise da caracterização da amostra de FM-DMSA por meio de MET

As características físicas e químicas das NPMs usadas nos ferrofluidos, como o tamanho, o tipo de ferrita e a cobertura estabilizante, são parâmetros de extrema importância para compreender os mecanismos de ação destas amostras e assim avaliar a sua eficácia nas aplicações biomédicas.

O tamanho médio, mais precisamente a polidispersão das nanopartículas, é uma característica essencial quando se trata de seu uso em sistemas biológicos, pois ela influencia diretamente no tempo de permanência da nanopartícula no organismo, na capacidade da mesma de evadir do sistema retículo endotelial, na velocidade com que ela atravessa a barreira endotelial ou outra barreira celular, assim como na sua capacidade de poder circular por vasos sanguíneos de pequeno calibre sem obstruí-los, sendo que este último fator depende também da não aglomeração das NPMs pela perda da camada estabilizante (Halbreich *et al.*, 1997; Berry & Curtis, 2003). Vale ressaltar que as características físicas também são alteradas de acordo com o tamanho das NPMs. De acordo com Chatterjee e colaboradores (2003), ferritas nanocristalizadas apresentam propriedades superparamagnéticas quando o seu tamanho é da ordem de

nanômetros, mas elas se comportam como ferrimagnéticas quando em tamanho da ordem de micrômetro. E mais, partículas magnéticas abaixo de 4 nm perdem a propriedade magnética (Ma *et al.*, 2004), e, portanto, a capacidade de responder a um campo magnético externo alternado, conseqüentemente, várias aplicações deste tipo de material na biomedicina deixam de existir.

Dentre as metodologias para a determinação da polidispersão das nanopartículas estão: a de ressonância magnética (Lacava *et al.*, 2001), a microscopia de força atômica (Silva *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2002) e a microscopia eletrônica de transmissão - MET (Poplewell & Sakhinini, 1995). Neste estudo utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão devido à alta precisão oferecida pela técnica. Dessa forma, segundo a distribuição lognormal do diâmetro das NPMs da amostra utilizada (Fig. 04), o diâmetro médio das NPMs do FM-DMSA foi de 8,5 nm \pm 0,19, com uma população relativamente homogênea de partículas. Em tese, quanto mais similares são os diâmetros das partículas, mais preciso é o indicativo de que se tenha uma amostra monodispersa com excelente estabilidade. Desta forma, o tamanho reduzido e a monodispersão das partículas podem facilitar uma rápida distribuição deste material pelo organismo.

Portanto, quanto ao diâmetro médio (8,5 nm \pm 0,19) das NPMs da amostra testada, é plausível supor ser este um material com

grande potencial para uso terapêutico, pois seu comportamento na circulação sistêmica é compatível com o desejado para um biomaterial, ou seja, circulação rápida e fácil distribuição no organismo. Além disso, as partículas estão dentro da faixa de tamanho que garante a propriedade física de superparamagnetismo, portanto, são capazes de responder a um campo magnético externo.

A natureza química do centro magnético das partículas também influencia em suas propriedades, principalmente no que se refere à biocompatibilidade/toxicidade da amostra. Como se sabe, as nanopartículas são constituídas por ferritas, principalmente a magnetita ou a maguemita, que podem ter efeitos biológicos distintos. Por exemplo, estudos realizados em camundongos com nanopartículas desenvolvidas a partir de diferentes ferritas, porém recobertas com o mesmo estabilizante, o ácido cítrico, mostraram que as NPMs à base de manganês induzem morte celular, genotoxicidade e reações inflamatórias severas (Lacava *et al.*, 1999), aquelas à base de magnetita induzem baixa genotoxicidade e citotoxicidade em células da medula óssea e também um processo inflamatório brando, principalmente no fígado (Garcia, 2002), enquanto as NPMs à base de ferrita de colbalto causam expressiva toxicidade nas células peritoniais, citotoxicidade branda nas células da medula óssea e induzem leve e temporário processo inflamatório (Kückelhaus, 2003).

Por isso, neste trabalho, utilizou-se uma amostra de nanopartículas magnéticas à base de magnetita, até porque esta tem sido apontada como possível constituinte de agentes contrastantes para imagens de ressonância magnética devido ao fato de aparentemente não possuir toxicidade e, segundo Gupta & Gupta (2005) a magnetita já é reconhecida como biocompatível e não tóxica, tornando-a forte candidata para a construção de fluidos magnéticos com fins biológicos.

O terceiro aspecto fundamental, no que diz respeito à aplicação dos FMs na biomedicina, é a estabilidade da amostra, que durante a sua síntese é obtida pela cobertura das nanopartículas com uma substância surfactante catiônica. Esta estabilidade garante que as partículas se mantenham em suspensão, não aglomerando e conseqüentemente precipitando na parede dos vasos sanguíneos ou nos tecidos, característica que passaria a não mais ser de interesse biomédico. A mesma cobertura que estabiliza a nanopartícula deve ser uma substância de boa tolerância para o organismo, ou seja, biocompatível, e de preferência que possa ser funcionalizada, nesse caso, que permita o acoplamento de fármacos, anticorpos ou outros componentes para então ampliar o seu emprego biotecnológico. Mais uma vez, estudos preliminares da biodistribuição e biocompatibilidade da nanopartícula juntamente com sua cobertura estabilizante se fazem mais que necessários.

Como exemplo, Gupta e Curtis (2004) trabalharam com nanopartículas superparamagnéticas, de forma e tamanho específicos, acopladas a várias proteínas. Estas partículas foram caracterizadas *in vitro* e o seu efeito sobre fibroblastos humanos foi analisado em relação à adesão celular, viabilidade, morfologia e organização do citoesqueleto, usando várias técnicas para observar a interação célula-nanopartícula, incluindo microscopia de luz, fluorescência, eletrônica de varredura e de transmissão. Os autores demonstraram que cada tipo de nanopartícula com diferentes características de superfície induziu uma resposta celular diferente. Ou seja, nanopartículas sem cobertura foram internalizadas pelos fibroblastos provavelmente por endocitose, enquanto que nanopartículas recobertas com lactoferrina ou ceruloplasmina prenderam-se à membrana celular e não foram endocitados. Os autores concluíram que o tipo de resposta celular pode ser determinada de acordo com a superfície empregada na preparação específica das nanopartículas.

Este trabalho teve como objetivo mostrar o comportamento do FM-DMSA em fígado de camundongos Swiss. As análises de biodistribuição e biocompatibilidade das NPMs já foram realizadas com sucesso por Chaves (2002) e Garcia (2005), mas estudos de biocompartibilidade das partículas ficaram restritas ao pulmão. Desta

forma, observar o comportamento da partícula em fígado, órgão central no metabolismo sistêmico é essencial.

5.2) Análise de biocompatibilidade da amostra de FM-DMSA em fígado de camundongos Swiss

Este trabalho buscou analisar os efeitos da injeção de ferritas recobertas com DMSA em fígado, um órgão central do metabolismo sistêmico. O fígado é a maior glândula do corpo, possuindo inúmeras funções como a produção de bile, metabolismo de uréia e de substâncias tóxicas, armazenamento e liberação de glicose, dentre outras. Além disso, age como importante armazenador de compostos como água, ferro, cobre e vitaminas. O fígado é irrigado pela artéria hepática, cuja função é levar sangue arterial oxigenado necessário a seu metabolismo. O sangue procedente do baço e do intestino, o qual corresponde a cerca de 70% do sangue que irriga o órgão, chega ao órgão por meio da veia-porta e todo este sangue é recolhido do parênquima hepático pelas veias centro-lobulares.

A administração de compostos ricos em ferro pelo organismo pode induzir a formação de radicais livres dentro da célula, que culmina com a geração de processos inflamatórios e lesão tecidual

(Abbas, 2002). O FM recoberto com DMSA pode perder a sua cobertura durante a circulação na corrente sanguínea, expondo seu componente férrico. Assim, as nanopartículas magnéticas que perderam a sua cobertura estabilizante são prontamente absorvidas por células fagocitárias, que as endocitam e iniciam o metabolismo das mesmas. As análises de cortes de fígado de camundongos expostos ao tratamento com FM-DMSA mostram que as partículas encontram-se no interior de células de Kupffer a partir de um dia de tratamento. Em quinze dias de exposição, foram encontradas partículas dentro de células endoteliais de veias centro-lobulares no parênquima hepático. Desta forma, as NPMs que chegam ao fígado através da veia-porta hepática, circulam pelos capilares sinusóides e são seqüestradas por células de Kupffer e células endoteliais, que podem estar decompondo e processando essas partículas. Ao realizar o processo de fagocitose, as partículas endocitadas são fundidas aos lisossomas, que as decompõem em ferro livre sob a forma oxidada e radicais hidroxila. O ferro livre pode se associar as proteínas e ser armazenado como ferritina, que circula pelo parênquima hepático sendo prontamente absorvida por hepatócitos através de seus receptores para ferritina sérica (Siah *et al.*, 2005).

Algumas partículas, nas análises de microscopia de luz, foram encontradas dentro dos hepatócitos nos grupos experimentais de

sete dias de tratamento ao FM-DMSA, podendo sugerir absorção direta das NPMs por essas células. Em análises realizadas pela técnica da microscopia eletrônica partículas foram encontradas no espaço de Disse, espaço perisinusoidal encontrado entre os hepatócitos e o revestimento endotelial dos capilares sinusóides (Junqueira, 2005). Os hepatócitos possuem inúmeras microvilosidades no espaço de Disse, que tem como objetivo facilitar as trocas de gases e fluxo de materiais entre a membrana celular e o meio extracelular. A presença de nanopartículas dentro do espaço de Disse pode sugerir que as partículas estejam sendo fagocitadas pelos hepatócitos. Entretanto, não se pode confirmar essa hipótese, pois em nenhuma análise de grupos por meio da técnica de MET foram encontradas NPMs no citoplasma dessas células.

Aos quinze dias de tratamento, alguns grupos analisados por meio da técnica de ML apresentavam nanopartículas magnéticas entre dois hepatócitos, na localização provável de um canalículo biliar. Na análise de MET dos grupos experimentais submetidos ao tratamento com FM-DMSA, não foi encontrada a presença de nanopartículas magnéticas em canalículos biliares.

Os achados das análises realizadas por meio da microscopia de luz corroboram a hipótese apresentada por Garcia (2005), que sugeriu uma via de eliminação de NPMs pela bile. Em seu trabalho, fez de

animais, após trinta e noventa dias de tratamento ao FM-DMSA, apresentavam traços de nanopartículas magnéticas detectadas pela técnica de ressonância nuclear.

Os hepatócitos são células que possuem função de degradação de bilirrubina e produção de bile, que é secretada do fígado via ductos biliares e vesícula biliar. A bilirrubina é o principal produto do grupamento heme dos eritrócitos e possui ferro em sua constituição. O excesso de ferro incorporado aos hepatócitos pode estar sendo excretado na luz dos canalículos biliares, é então conduzido aos ductos biliares e vesícula biliar, sendo lançado na luz do intestino delgado e finalmente é eliminada pelas fezes. Dessa forma, os efeitos deletérios do ferro seriam neutralizados por um mecanismo natural de eliminação pelo organismo. Alguns autores (Siah *et al.*, 2005) já demonstram a eliminação de ferro livre pela via biliar em indivíduos acometidos por hemocromatose, embora afirmem ser uma via alternativa e pouco expressiva de eliminação.

Outra hipótese para o fato de terem sido detectados traços de ferro nas fezes de camundongos expostos ao tratamento com FM-DMSA é o mecanismo de retroalimentação negativa envolvida no metabolismo de ferro sistêmico. O peptídeo hepcidina é um hormônio regulador da absorção de ferro pelos enterócitos no intestino delgado. A produção de ferritinas e transferrinas pelos hepatócitos induz a

síntese da hepcidina, que cai na corrente sanguínea atuando nas células intestinais. Esse peptídeo inibe a ligação do ferro aos receptores presentes na membrana dos enterócitos. O íon férrico presente na dieta é eliminado juntamente com a formação do bolo fecal. As análises de ML deste trabalho corroboram a alternativa de eliminação do ferro pela via biliar; entretanto, as nanopartículas magnéticas não foram encontradas em canalículos biliares nas análises de MET, o que poderia comprovar, morfológicamente, os resultados obtidos através da microscopia de luz.

Os grupos experimentais de sete e quinze dias de tratamento apresentaram, em sua análise morfológica, grande quantidade de nanopartículas magnéticas na proximidade de veias centro-lobulares. Esses resultados sugerem que ainda existem partículas presentes na micro-circulação do fígado durante quinze dias de exposição ao FM-DMSA e que as mesmas poderiam estar deixando o órgão pelas veias centro-lobulares, que se fundem para formar a veia hepática e, dessa forma, deixar o órgão. Os resultados das análises de Chaves (2002), que realizou a técnica da ressonância magnética para a detecção de FM-DMSA em diversos órgãos, relatam que, após cinco minutos de injeção das NPMs, estas não são mais encontradas na circulação sanguínea sistêmica. Desta forma, as partículas são rapidamente absorvidas por órgãos como o fígado e os pulmões e lá permanecem

até serem metabolizadas e eliminadas. Entretanto, a análise dos grupos experimentais de trinta dias após a exposição ao FM-DMSA, revelou uma grande quantidade de NPMs presentes nos capilares sinusóides do tecido e fagocitados por células de Kupffer. Visivelmente, a quantidade das partículas parecia superior aos outros grupos experimentais. Segundo dados de Garcia (2005), análises de ressonância magnética de órgãos submetidos ao tratamento com FM-DMSA mostram, em trinta dias de exposição ao tratamento, aumento do número de nanopartículas magnéticas no fígado com conseqüente redução das mesmas no pulmão. A análise desse resultado permite a dedução de que as nanopartículas podem estar deixando o pulmão e sendo redistribuídas para o fígado.

Essa aparente redistribuição de partículas pode ser um importante indicador do papel central do fígado no metabolismo e homeostase do ferro. Os hepatócitos são células importantes para o armazenamento e inativação metabólica do ferro endógeno, pois possuem muitos receptores para ferritinas e transferrinas. Células de outros órgãos são incapazes de inativar e armazenar grande quantidade de proteínas reguladoras do ferro; assim, a redistribuição das partículas para o fígado torna-se, portanto, essencial, pois evita acúmulo desse metal em outros órgãos incapazes de inativarem seus efeitos tóxicos.

Outra observação interessante nas análises dos grupos experimentais com sessenta, noventa e cento e vinte dias de tratamento ao FM-DMSA, foi a detecção de partículas no tecido conjuntivo intersticial dos espaços-porta hepáticos. Em alguns animais dos três tempos, observou-se a presença das NPMs nas proximidades ou dentro dos canalículos biliares. Wunderbaldinger (2001) relata a detecção de nanopartículas magnéticas em tecido conjuntivo intersticial, corroborando os achados observados em microscopia de luz. Além disso, a presença de NPMs nos ductos biliares comprovam a via de eliminação das partículas pela bile, que é liberada na luz do intestino delgado e, desta forma, eliminada pela via fecal.

Os resultados das análises de microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram a biolocalização das nanopartículas magnéticas no interior do fígado de camundongos submetidos ao tratamento com FM-DMSA. Entretanto, para determinação de sua biocompatibilidade, foram realizadas análises de suas alterações morfológicas durante todo período experimental.

Os estudos de ML e MET mostraram que a partícula, visualmente, não induziu alterações morfológicas ou celulares proeminentes no parênquima hepático. Não foram detectados, em nenhum grupo experimental, processos de proliferação de fibrilas de

colágeno ou células com alterações em tamanho ou proporção citoplasma/núcleo. Esses resultados indicam que as partículas magnéticas estão sendo plenamente absorvidas e metabolizadas pelo fígado. Caso contrário, o excesso de ferro presente na constituição das NPMs poderia estar induzindo a formação de tecidos fibróticos ou células com morfologia alterada; característica comum nas lâminas de fígado obtidas de indivíduos acometidos pela hemocromatose. Assim, pode-se concluir que a concentração das partículas administrada aos camundongos em grupos experimentais foi terapeuticamente correta, pois não induziu no tecido hepático alterações morfológicas evidentes.

Outra medida da biocompatibilidade das partículas foi realizada pela observação da presença e quantificação dos infiltrados inflamatórios no tecido hepático. As células do sistema imunológico são atraídas para um tecido que sofreu alguma lesão ou injúria; no caso da exposição a partículas magnéticas, essa injúria é causada pelo estresse oxidativo do acúmulo de ferro livre no citoplasma das células. Nesse trabalho foi observado que visualmente, em análises morfológicas do fígado de camundongos submetidos ao tratamento com FM-DMSA, houve um aumento do número de focos de inflamação aos trinta e sessenta dias de tratamento, sendo estes reduzidos após noventa dias de exposição. Em trinta dias de tratamento com NPMs recobertas com DMSA, foram encontrados muitos focos inflamatórios

no parênquima do órgão associados a presença de partículas magnéticas.

Visando corroborar as análises em ML e MET, foram realizadas contagens do número de focos inflamatórios presentes no tecido hepático dos camundongos analisados neste trabalho, que revelaram aumento do número de focos de inflamação após um e dois dias de tratamento, regredindo aos sete e quinze dias de exposição, que assemelhou-se ao grupo controle. O número de focos de inflamação em animais GE1 e GE2 aumentou de forma significativa quando comparado aos animais do grupo controle, variação esta que não foi detectada nas análises de microscopia de luz. Entretanto, aos trinta e sessenta dias de exposição ao tratamento com FM-DMSA há um novo aumento no número de focos inflamatórios quando comparados ao grupo controle, sendo esse detectado nas análises em ML. O aumento aparentemente contraditório do número de focos no tecido hepático nesses dois últimos dois tempos, pode ser explicado pela redistribuição de partículas aos trinta dias no fígado. Assim, pode-se concluir que as NPMs geram, inicialmente, resposta inflamatória no parênquima hepático e que, posteriormente, é reduzida até atingir um estado basal, que não difere do grupo controle.

Desta forma estes resultados, juntamente com os de Chaves (2002) e Garcia (2005), sugerem-se que nanopartículas magnéticas

recobertas com DMSA são biocompatíveis em fígado e pulmão de camundongos Swiss, o que abre a possibilidade de sua aplicação na área biomédica.

6) CONCLUSÕES

A partir dos resultados desse trabalho conclui-se que:

- 1) A amostra de FM-DMSA empregada neste trabalho apresenta um diâmetro médio de 8,5 nm. A amostra está, portanto, dentro dos parâmetros ideais de um biomaterial, apresentando ainda propriedades magnéticas.
- 2) A biocompatibilidade no fígado da amostra de FM-DMSA utilizada neste trabalho foi comprovada por técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Em fígado de animais expostos ao tratamento com FM-DMSA, as partículas são fagocitadas por células de Kupffer no parênquima do órgão a partir de um dia de tratamento. Aos quinze dias de exposição ao FM-DMSA, partículas magnéticas são encontradas no citoplasma de células endoteliais de veias centro-lobulares. Dados de microscopia de luz, não confirmados por microscopia eletrônica

de transmissão, mostram partículas entre hepatócitos, dentro de canalículos biliares. Em trinta, sessenta e noventa dias de tratamento, são encontradas partículas magnéticas dentro de ductos biliares, o que sugere a eliminação das mesmas pela bile via vesícula biliar.

- 3)** O processo inflamatório gerado pela presença de nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA administradas aos animais experimentais e brando. A análise das médias dos focos inflamatórios no parênquima hepático revelou que a partícula induz leve processo inflamatório, que reduz com o tempo.
- 4)** As nanopartículas magnéticas a base de ferritas recobertas com DMSA justificam seu uso em estudos e aplicações na área biomédica.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. Quarta edição, **Ed. Revinter**, 2002.

ANDERSON, J.M. Inflammatory response to implants. **Trans. Am. Soc. Intern. Organs.**, v. 34, p. 101-107, 1998.

BABENSEE, J.E.; ANDERSON, J.M.; McINTIRE, L.V.; MIKOS, A.G. Host response to tissue engineered devices. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.33, p. 111 – 139, 1998.

BACON, B.R, Stark, D.D., SAINI, S., GROMAN, E.V., HAHN, P.F., COMPTON, C.C., FERRUCCI, J.T.Jr. Ferrite particles: a new magnetic resonance imaging contrast agent. Lack of acute or chronic hepatotoxicity after intravenous administration. **J. Lab. Clin Med**, v. 110(2), p.164-71, 1987.

BERRY, C. C. & CURTIS, A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 36, p.R198-206, 2003.

CHAVES, S.B. **Efeitos Biológicos de Fluídos Magnéticos a Base de Magnetita Recoberta por DMSA em Camundongos: Análise**

por Microscopia de Luz, Imunohistoquímica e Ressonância Magnética, Brasília: Universidade de Brasília, 2002, 55p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal).

CHATTERJEE, J.; HAIK, Y.; CHEN, C-J. Polyethylene magnetic nanoparticle: a new magnetic material for biomedical applications. **J. Magn. Mater.**, v.246, p.382-391, 2003.

COROIU, I. Relaxivities of different superparamagnetic fields for approach in NME tomography. **J. Magn. Mater.**, v.201, p.449, 1999.

CRICHTON, R.R. & CHARLOTEAUX, W.M. Iron transport and storage. **Eur. J. Biochem.**, v. 164 (3), p. 485-506, 2002.

DA SILVA, M.F.; SHÜTT, W.; TELLER, J.; HÄFELI, U.; ZBOROWSKY, M. In: SHÜTT, W.; TELLER, J.; HÄFELI, U.; ZBOROWSKY, M. **Scientific and clinical applications of magnetic carriers: an overview**. New York: Plenum Publishing Corp., 1997.

GARCIA, V.A.P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos**. Brasília: Universidade de Brasília, 2002, 155p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular).

GARCIA, M.P. **Estudo dos efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas a base de magnetita.** Brasília: Universidade de Brasília, 2005, 88p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde).

GUPTA, A.K. & CURTIS, A.S.G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. **Biomaterials**, v.25, p.3029-3040, 2004.

GUPTA, A.K. & GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v.26, p.3995-4021, 2005.

FREEMAN, F, WOODHALL, B., PICKRELL, K.L., DUKES, HT. Effect of hyperthermia upon cancer chemotherapy application to external cancer of head and face structures. **Ann. Surg.** v. 151, p.750-759,1960.

HALBREICH, A.; ROGER, J.; PONS, J.N., DA SILVA, M.F., HASMONAY, E.; ROUDIER, M.; BOYNARD, M.; SESTIER, C.; GELDWERTH, D.; FERTIL,B.; BACRI, J.C. Magnetic maghemite nanoparticles. In: SHÜTT, W.; TELLER, J.; HÄFELI, U.; ZBOROWSKY, M. **Scientific and clinical applications of**

magnetic carriers: an overview. New York: Plenum Publishing Corp., p.399-417, 1997.

HALBREICH, A. ; ROGER, J.; PONS, J.N.; GELDWERTH, D.; DA SILVA, M.F.; ROUDIER, M.; BACRI, J.C. Biological applications of maghemite ferrofluid. **Biochimie**, v.80, p. 379 – 390, 1998.

HALBREICH, A.; GORMAN, E.V.; RAISON, D.; BOUCHAUD, C.; PATURANCE, S. Damage to the protein synthesizing apparatus in mouse liver in vivo by magnetocytolysis in the presence of hepatospecific magnetic nanoparticles. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.248, p.276-285, 2002.

HUGMAN, A. Hepcidin: an important regulator of iron homeostasis. **Clinical & Laboratory Haematology**, v. 28 (2), p.75, 2006.

HÜTTEN, A.; SUDFELD, D.; ENNEN, I.; REISS, G.; HACHMANN, W.; HEINZMANN, U.; WOJCZYKOWSKI, K.; JUTZI, P.; SAIKALY, W.; THOMAS, G. New magnetic nanoparticles for biotechnology. **J. Biotech.**, v.112, p.47-63, 2004.

ITO, A.; KUGA, Y.; HONDA, H.; KIKKAWA, H.; HORIUCHI, A.; WATANABE, Y.; KOBAYASHI, T. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. **Cancer Lett.**, v.212, p.167-175, 2004.

JAIN, T.K.; MORALES, M.A.; SAHOO, S.K.; LESLIE-PELECKY, D.L.; LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Mol. Pharm.**, v.2, p.194-205, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U. **Biologia estrutural dos tecidos: histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1ª ed., 2005.

KALIA, K.; FLORA, S.J.S. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. **J. Occup. Health**, v. 47, p.1-21, 2005.

KHARKEVICH, D.A.; ALYAUTDIN, R.N.; FILIPPOV, V.I. Employment of magnet-susceptible microparticules for the targeting of drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.41, p.286 – 288, 1989.

KIM, D.K.; ZHANG, Y; VOIT, W; RAO, K.V.; MUHAMMED, M. Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.225, p.30-36, 2001.

KÜCKLHAUS, S.A.S. **Avaliação biológica de materiais magnéticos à base de ferrita de cobalto desenvolvidos para tratamento alternativo do câncer**. Brasília: Universidade de Brasília, 2003, 135p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal).

LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R.B.; MARTINS, E.V.; LACAVA, L.M.; GARCIA, V.A.P.; RÉBULA, C.A.; LEMOS, A.P.C.; SOUSA, M.H.; TOURINHO, F.A.; DA SILVA, M.F.; MORAIS, P.C. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.201, p.431-434, 1999.

LACAVA, L.M.; LACAVA, Z.G.M.; DA SILVA, M.F.; SILVA, O.; CHAVES, S.B.; AZEVEDO, R.B.; PELEGRINI, F.; GANSAU, C. BUSKE, N.; SABOLOVIC, D.; MORAIS, P.C. Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administrated in mice. **Biophysical J.**, v.80, p.2483-2486, 2001.

LANZA, G.M.; WINTER, P.M.; CARUTHERS, S.D.; MORAWSKI, A.M.; SCHMIEDER, A.H.; CROWDER, K.C.; WICKLINE, S.A. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. **J. Nucl. Cardiol.**, v.11, p.733-743, 2004.

MORAIS, P.C.; SKEFF NETO, K.; GRAVINA, P.P.; FIGUEIREDO, L.C.; DA SILVA, M.F.; LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R.B.; SILVA, L.P.; DE CUYPER, M. Birefringence and transilition electron microscopy of monolayer and bilayer magnetoliposomes. **J. Mag. Magm. Mater.**, v. 252, p. 418-420, 2002.

MA, M.; WU, Y.; ZHOU, J.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; GU, N. Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.268, p.33-39, 2004.

NA, J.B.; SUH, J.S.; HUH, Y.M.; KIM, S.J.; KIM, S.H.; CHA, S.W., LEE, S.H. Pharmacokinetic modeling of phagocytic activity of the liver using superparamagnetic iron oxide nanoparticles in dynamic MR imaging. **Yonsei Med. J.** v. 44 (3), p.429-437, 2003.

OSWALD, P.; CLEMENT, O.; CHAMBON, C.; SCHOUMAN-CLAEYS, E.; FRIJA, G. Liver positive enhancement after injection of superparamagnetic nanoparticles respective role of circulating and uptaken particles. **Mag. Reson. Imag.**, v. 15(9), p. 1025-1031, 1997.

PANKHURST, Q A. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J. Appl. Phys**, v. 36, p.R167-R181, 2003.

POPPLEWELL, J. & SAKHNINI, L. The dependence of the physical and magnetic properties of magnetic fluids on particle size. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.149, p.72-78, 1995.

RADEMACHER, D.J., STEINPREIS, R.E., WEBER, D.N. Short-term exposure to dietary Pb and/or DMSA affects optic tectum and cerebellum. **Pharmacol Biochem. Behav.** V. 70, p. 199-207,

RAUSCH, M.; HIESTAND, P.; FOSTER, C.A.; BAUMANN, D.R.; CANNET, C.; RUDIN, M. Predictability of FTY720 Efficacy in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by *In Vivo* Macrophage Tracking: Clinical Implications for Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. **J. Mag. Res. Imaging**, v.20, p.16-24, 2004.

SAFARIK, I. & SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **BioMag. Res. Tech.**, v.194 (10), p.1105-1110, 2004.

SIAH, C.W.; TRINDER, D.; OLYNYK, J.K. Iron overload. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, p. 24-36, 2005.

SILVA, L.P.; LACAVA, Z.G.M.; BUSKE, N.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Atomic force microscopy and transmission electron microscopy of biocompatible magnetic fluids: A comparative analysis. **J. Nanop. Res.**, v.6, p.209-213, 2004.

SOUZA, A.F.M.; CARVALHO-FILHO, R.J.; CHEBLI, J.F. Hemocromatose hereditária. Relato de caso e revisão da literatura. **Arq Gastroenterol**, v.38, p. 194-202, 2001.

SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D.B.; RAOUX, S.; RICE, P.M.; WANG, S.X.; LI, G. Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, p.273-279, 2004.

TARTAJ, P.; MORALES, M.P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALEZ-CARRENÑO, T.; SERNA, C.J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 36, p. 182-197, 2003.

WHITESIDES, G & ALIVISATOS, P. **Fundamental Scientific Issues for Nanotechnology**, Harvard University, 2001.

WILLIAMS, R. Fundamentals of Biocompatibility. **Biomaterials**, v. 33, p. 110-115, 1999.

WUNDERBALDINGER, P.; JOSEPHSON, L.; WEISSLEDER, R. Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. **Bioconjugate Chem.**, v. 13, p.264-268, 2002.

WUST, P; HILDEBRANDT, G; SREENIVASA, B, GELLERMANN, H; FELIZ, R & SCHLAG, PM. Hipertermia in combined treatment of cancer. **Lancet Onc.**, v. 3, p.487-497, 2002.

YANASE, M.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; WAKABAYASHY, T.;
YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. Intracellular hipertermia for cancer
using magnetic cationic lipossomes: *Ex vivo* study. **Jpn. J. Cancer
Res.**, v. 88, p. 630 – 632, 1997.