

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MAGNÉTICO EM  
RATOS ADULTOS JOVENS**

CHARLES CHENWEI WANG

SÃO CARLOS  
2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MAGNÉTICO EM  
RATOS ADULTOS JOVENS**

**CHARLES CHENWEI WANG**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Co-Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

SÃO CARLOS  
2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

W246ea

Wang, Charles Chenwei.

Efeitos da administração crônica de nanopartículas de óxido de ferro magnético em ratos adultos jovens / Charles Chenwei Wang. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
96 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fisiologia. 2. Nanotoxicologia. 3. Magnetita. I. Título.

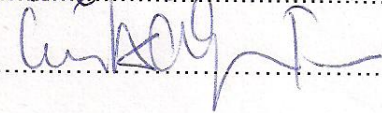
CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Charles Chenwei Wang

Profª. Drª. Keico Okino Nonaka..... 

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha..... 

Profª. Drª. Cecília Helena de Azevedo Gouveia..... 

Profª. Drª. Patrícia Driusso..... 

Prof. Dr. Dernival Bertoncetto..... 

*Aos meus pais, Wang e Chou pela minha formação pessoal e profissional, por todo o apoio nas minhas escolhas. Amo vocês.*

*Ao meu irmão Toni pelo carinho e apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, por me ter aceito como aluno de iniciação científica, depois mestrado e por último doutorado. Não existem palavras para demonstrar a minha gratidão pelas oportunidades e pela confiança. Um grande exemplo de pessoa e profissional. Carregarei eternamente o seu carinho e seu exemplo;

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto (IFSC-USP-SC), por me co-orientar e me possibilitar novos conhecimentos na área de nanotecnologia;

Ao Sr. Sérgio Dias, técnico do Laboratório de Neuroendocrinologia, pela amizade e as inúmeras ajudas durante toda a minha estadia no laboratório;

À Valéria Marangoni, aluna do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, pela síntese das nanopartículas, sem as quais este trabalho não seria possível;

À Prof. Dra. Regina Vendramini pela indispensável ajuda nas análises bioquímicas sanguíneas;

Ao Gustavo Vilela e Dra. Paula Fregonezi pela indispensável ajuda nas leituras das lâminas de esfregaço sanguíneo;

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas pela amizade e todo o apoio profissional;

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e da secretaria da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, por todo o carinho, amizade e o apoio profissional;

Aos ex e atuais amigos de laboratório: Adriana Macagnan, Daniel Mochiuti, Danilo Cardim, Dernival Bertoncello, Edvanina Queiroz, Fabio Pastor, Fabio Bogni, Fernando D'Ávila, Inalda Bispo, José Ferreira, Lidiângela Villar, Luciana Brondino, Luiz Mello (in memoriam), Juciléia Barbosa, Leandro Ruffoni, Lucélia Albertin, Patricia Driusso, pela amizade e o companheirismo, fundamentais no nosso trabalho;

A Valéria Mattos, minha concorrente eterna. Obrigado pela amizade, carinho, companheirismo, incentivo e apoio em toda a nossa trajetória de mestrado e doutorado juntos. Obrigado de coração.

Aos meus queridos amigos: Adriano Ogata, Ana Carolina Martin (Carol), Ana Cardoso, Angela Fushita, Carmen Pontes, Cyntia Montenegro, Daniel Motheo, Daniela Bassi, Elaine Sabino, Eliane Oba, Gustavo Vilela, João Silvestre, Marcia Cominetti, Laila Santos, Livia Santos, Luiz Damiano, Maurício Mattos, Robinson Sabino, Silvia Hirayama, Thais Zanutto, William Oya pela amizade e pelos vários momentos de descontração;

Aos meus amados sobrinhos de coração: Bruna e Camila Mattos e João Cominetti Martins, por me alegrarem com seus mais puros sorrisos;

A todos os amigos que foram e são importantes na minha vida pessoal e profissional.

“Pode-se vencer pela inteligência,  
pela habilidade ou pela sorte, mas  
nunca sem trabalho.”

(A. Destoef)



## RESUMO

Com o rápido desenvolvimento da nanotecnologia, o homem vem utilizando cada vez mais essa nova tecnologia para auxiliá-lo no desenvolvimento de novos produtos que auxiliem no diagnóstico de doenças, fármacos e tratamentos de inúmeras enfermidades. Alguns autores vêm chamando a atenção para o uso de nanopartículas em vários produtos comerciais, pois pouco se sabe sobre sua toxicidade. Especificamente as nanopartículas de óxido de ferro magnético vêm sendo utilizadas em líquidos de contraste de ressonância magnética, tratamento de câncer, entre outros. Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar os possíveis efeitos tóxicos dessas nanopartículas administradas cronicamente em ratos adultos jovens. Ratos Wistar machos foram distribuídos em 3 grupos experimentais: Controle (salina 0,9% - 0,1mL/100g MC), nFe 0,3 (nanopartículas de óxido de ferro - 0,3 mg/kg MC) e nFe 0,6 (nanopartículas de óxido de ferro - 0,6 mg/kg MC). O tratamento foi realizado por gavagem gástrica, 5 dias por semana, durante 8 semanas. As análises de massa corporal (MC) dos animais indicou que a concentração de 0,6 mg/kg MC de nanopartículas de óxido de ferro magnético levou à uma diminuição da MC dos animais em relação aos animais tratados com 0,3 mg/kg MC e aos animais tratados solução salina 0,9%. Os animais do grupo nFe 0,6 apresentaram aumento de colesterol sanguíneo, entretanto as concentrações de glicose, ferro, uréia, creatinina, AST, ALT e fosfatase alcalina, além da análise hematológica não foram diferentes dos animais do grupo controle. Além disso, as glândulas seminais e próstatas ventrais dos animais tratados com nFe 0,6 mg/kg MC atrofiaram, sendo que as dos animais do grupo nFe 0,3 não apresentaram diferença em relação as do grupo controle. Os parâmetros biométricos, biomecânicos e biofísicos dos ossos (fêmur e vértebra) foram semelhantes nos 3 grupos experimentais. Portanto, o tratamento crônico com nanopartículas na concentração de 0,6 mg/kg MC foi prejudicial à saúde dos animais, exceto no tecido ósseo, sendo que tal efeito não foi observado com a concentração mais baixa.

Palavras-chaves: Nanopartículas, Óxido de Ferro Magnético, Nanotoxicologia, rato, osso

## ABSTRACT

The fast development of the nanotechnology, and the use of this technology to develop new products to help in diagnosis diseases, drugs and treatments for many diseases is increasing. Some authors have been warning about the nanoparticles use, because the real affect, toxic or not, still unknown. Iron oxide nanoparticles have been used in contrast liquid for magnetic resonance imaging, cancer treatment, among others. The aim of this work was to analyze the possible effects of chronic treatment with these nanoparticles in adults rats. The animals were distributed in 3 groups: Control (saline 0.9% - 0.1 mL/100 of body weight), nFe 0.3 (magnetic iron oxide nanoparticles – 0.3 mg/kg BW) and nFe 0.6 (magnetic iron oxide nanoparticles – 0.6 mg/kg BW). The animals were treated by gastric gavage during 8 weeks, 5 days per week. The body weight of the animals from the nFe 0.6 group decreased when compared to animals from the control group, and the BW of the animals from nFe 0.3 group was not different from the control group. The animals from the nFe 0.6 group showed the higher blood levels of cholesterol, although the levels of glucose, urea, creatinine, AST, ALT and alkaline phosphatase, plus hematology were not different from the animals of control group. Moreover, the seminal gland and ventral prostate of the animals of nFe 0.6 were atrophied. All those parameters of animals from nFe 0.3 group were not different compared to control group. The bone (femur and vertebra) biometric, biomechanical and biophysical parameters were similar in the animals from the different experimental groups. These results showed that high concentrations of magnetic iron oxide nanoparticles could be toxic and dangerous to the rats when take daily, but in low concentration it could be safe.

Keywords: Nanoparticles, Magnetic Iron Oxide, Nanotoxicology, *rats*, *bone*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) preparada para o teste de flexão a três pontos em fêmur de rato.....	30
<b>Figura 2.</b>	Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) demonstrando um teste de compressão da vértebra de rato.....	32
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática de uma curva Força x Deformação registrado pelo software Instron Series IX durante o ensaio.....	33
<b>Figura 4.</b>	Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de óxido de ferro magnético e de uma amostra de solução utilizada no experimento.....	41
<b>Figura 5.</b>	Evolução ponderal dos animais dos três grupos experimentais.....	43
<b>Figura 6.</b>	Consumo de ração pelos animais dos 3 grupos experimentais durante todo o período experimental.....	45
<b>Figura 7.</b>	Consumo de água pelos animais dos três grupos experimentais durante todo o período experimental.....	47
<b>Figura 8.</b>	Excreção de fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental.....	49
<b>Figura 9.</b>	Volume de urina excretada pelos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental.....	51
<b>Figura 10.</b>	Modo de mensuração do comprimento, diâmetro maior e menor do fêmur e altura da vértebra.....	57
<b>Figura 11.</b>	Esquema proposto por OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER (2005). Biocinética de nanopartículas.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Massa corporal inicial e final dos diferentes grupos experimentais.....	42
<b>Tabela 2.</b>	Consumo médio de ração pelos animais dos diferentes grupos durante todo o período experimental.....	44
<b>Tabela 3.</b>	Consumo médio de água pelos animais dos diferentes grupos durante todo o período experimental.....	46
<b>Tabela 4.</b>	Excreção média de fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental.....	48
<b>Tabela 5.</b>	Volume médio de urina dos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental.....	50
<b>Tabela 6.</b>	Pesos das glândulas seminais e próstatas ventrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	52
<b>Tabela 7.</b>	Ferro, glicose e colesterol sérica dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	53
<b>Tabela 8.</b>	Uréia e creatinina sérica dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	54
<b>Tabela 9.</b>	AST e ALT sérica dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	55
<b>Tabela 10.</b>	Fosfatase alcalina sérica dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	55
<b>Tabela 11.</b>	Hemograma dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	56
<b>Tabela 12.</b>	Parâmetros biométricos dos ossos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	58
<b>Tabela 13.</b>	Parâmetros biomecânicos dos ossos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	59
<b>Tabela 14.</b>	Parâmetros biofísicos dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	60
<b>Tabela 15.</b>	Parâmetros biofísicos das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>ALT</b>	Alanina Amino Transferase
<b>AST</b>	Aspartato Amino Transferase
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de ouro
<b>DOPAC</b>	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	Tetróxido de Triferro ou Magnetita
<b>GBM</b>	Glioblastoma multiforme
<b>IFSC</b>	Instituto de Física de São Carlos
<b>MC</b>	Massa Corporal
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>NMs</b>	Nanomateriais
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>PDAC</b>	Cloreto de Polidialildimetilamônio
<b>Pi</b>	Peso imerso
<b>Pm</b>	Peso de material mineral
<b>Pu</b>	Peso úmido
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dióxido de titânio
<b>UFSCar</b>	Universidade Federal de São Carlos
<b>USP-SC</b>	Universidade de São Paulo – <i>campus</i> São Carlos

**vs**

versus

**$\rho$**

Densidade da água

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Nanopartículas de óxido de ferro magnético.....	17
1.2	Nanotoxicidade.....	20
1.3	Toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro magnético.....	22
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Geral.....	24
2.2	Específicos.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Animais.....	25
3.2	Nanopartículas de óxido de ferro magnético.....	25
3.3	Protocolo experimental.....	26
3.4	Parâmetros analisados.....	27
3.4.1	Consumo de água e ração.....	27
3.4.2	Excreção de fezes e urina.....	27
3.4.3	Parâmetros biométricos.....	28
3.4.3.1	Massa corporal.....	28
3.4.3.2	Comprimento e altura dos ossos.....	28
3.4.3.3	Peso das glândulas seminais e próstatas ventrais.....	28
3.4.4	Parâmetros biomecânicos dos ossos.....	29
3.4.4.1	Ensaio mecânico de flexão a três pontos.....	29
3.4.4.2	Ensaio mecânico de compressão de vértebras.....	31
3.4.5	Parâmetros biofísicos.....	35
3.4.6	Parâmetros bioquímicos.....	36
3.4.6.1	Glicose.....	36
3.4.6.2	Colesterol.....	37
3.4.6.3	Creatinina.....	37
3.4.6.4	Uréia.....	37

3.4.6.5	Aspartato Amino Transferase (AST).....	38
3.4.6.6	Alanina Amino Transferase (ALT).....	38
3.4.6.7	Ferro.....	38
3.4.6.8	Fosfatase alcalina.....	39
3.4.7	Hematologia.....	39
3.5	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Nanopartículas de óxido de ferro magnético.....	41
4.2	Massa corporal.....	41
4.3	Consumo de água e ração.....	44
4.4	Excreção de fezes e urina.....	48
4.5	Glândulas seminais e próstatas ventrais.....	52
4.6	Análise bioquímica sanguínea.....	53
4.6.1	Ferro, Glicose e Colesterol.....	53
4.6.2	Uréia e creatinina.....	54
4.6.3	AST e ALT.....	54
4.6.4	Fosfatase alcalina.....	55
4.7	Hematologia.....	56
4.8	Análise biométrica do osso.....	57
4.9	Parâmetros biomecânicos.....	58
4.10	Parâmetros físicos.....	59
5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÃO.....	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
	ANEXOS.....	79



## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente muito se ouve falar sobre a nanotecnologia e nanociência, mas o que é nanotecnologia e nanociência? De onde surgiu esse conceito? O prefixo “nano” é de origem grega que significa anão. Desde a antiguidade já se utilizavam nanotecnologia sem ter consciência desta tecnologia. Os romanos confeccionavam vitrais misturando uma solução de cloreto de ouro com vidro derretido para fazerem vitrais vermelhos. Este processo resulta em nanopartículas de ouro, que devido ao tamanho das partículas, a reflexão da luz ocorre de modo peculiar.

Em 1959, o físico Richard P. Feynman (Prêmio Nobel 1965) proferiu um discurso no encontro anual da Sociedade Americana de Física, na Califórnia, intitulado de “There’s plenty of room at the bottom” sobre a possibilidade de escrever toda a Enciclopédia Britânica em uma cabeça de alfinete, tendo isso como o marco inicial da nanotecnologia (FEYNMAN, 1992).

Norio Taniguchi (1974), professor da Universidade de Ciências de Tóquio, publicou um artigo definindo o termo “nanotecnologia” como “um processo de separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou por uma molécula”.

Em 1980, motivado pelo discurso de Feynman, Eric Drexler (Instituto de Tecnologia de Massachusetts – MIT) publicou o livro “Engines of creation – The coming era of nanotechnology”. Este livro se tornou um *best-seller*, popularizando o termo nanotecnologia.

A nanotecnologia é a tecnologia desenvolvida utilizando nanomateriais (NMs) ou nanopartículas (NPs), e estes materiais são partículas metálicas, semicondutoras ou poliméricas com dimensões máximas de 100 nanômetros (SUH *et al.*, 2009). Os NMs, apesar de possuírem a mesma composição de outros materiais, possuem propriedades diferentes, possibilitando um desempenho excepcional da condutividade, reatividade e sensibilidade óptica (NEL *et al.*, 2006).

As nanopartículas podem ser utilizadas em diversas áreas, tais como: eletrônica ou microeletrônica, cosméticos, catalisadores, artigos esportivos, pneus,

roupas especiais, indústria bélica. E recentemente, as NPs estão sendo amplamente utilizadas na área médica, como por exemplo, na farmacologia para o desenvolvimento de novos produtos que auxiliem no diagnóstico de imagens (Ressonância Magnética – RM, Ultra-Sonografia entre outros), no sistema de liberação controlada de fármacos, marcadores biológicos, entre outros (SCHROEDER *et al.*, 1998; NEL *et al.*, 2006) .

A interação das NPs com outros materiais (ex: fármacos) é dependente das interações físico-químicas, ou seja, o tamanho e os tipos de ligações das NPs e dos fármacos são de grande importância. Uma interação sinérgica entre NPs e fármacos pode proporcionar propriedades novas ou melhoradas para estes fármacos. Essa interação é de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos que auxiliem na melhoria da qualidade de vida do ser humano.

Além da interação com fármacos e outros materiais, as NPs também podem interagir com sistemas biológicos. Esta junção entre o mundo orgânico e sintético com o uso seguro da nanotecnologia e projetos de nanomateriais para aplicações biológicas pode ser chamada de “nano-bio”. A “nano-bio” compreende as interações dinâmicas físico-químicas, trocas cinéticas e termodinâmicas entre as superfícies dos nanomateriais e a superfície dos componentes biológicos, tais como: proteínas, membranas, fosfolípidios, vesículas endocíticas, organelas, DNA e fluídos biológicos (NEL *et al.*, 2009).

Fármacos ligados às nanopartículas de ouro (AuNPs), por exemplo, não perdem sua atividade e o controle do tamanho das nanopartículas é importante para otimizar o tempo de sua permanência na corrente sanguínea, prevenindo as ações enzimáticas sanguíneas, e impedir a rápida eliminação dos fármacos pelos rins (PODSIADLO *et al.*, 2008). Outro uso das AuNPs é no tratamento de células cancerígenas. Nanopartículas de ouro com 5 nm de diâmetro na concentração de 67 µM/L foram adicionados às células cancerígenas *in vitro* e posteriormente estimulados com radiofrequência e conseqüentemente aquecidas, provocando uma diminuição da quantidade de células malignas em mais de 98%, sendo que as células cancerígenas estimuladas por radiofrequência sem as NPs, a diminuição foi abaixo de 40% em diferentes períodos (GANNON *et al.*, 2008).

Alguns compostos têm recebido uma atenção especial, como por exemplo, nanopartículas de ouro ou de ferro magnética, pois essas possuem alta estabilidade química e facilidade de ligação com biomoléculas através das pontes de sulfeto (BRUST *et al.*, 1994; CASTANEDA *et al.*, 2008; DUAN, YU, CUI, 2008).

Além disso, um trabalho de revisão mostrou que as nanopartículas de ouro, prata e platina possuem singular propriedade de interagir com proteínas específicas e inibir suas atividades em diversas doenças, tais como câncer, artrite, entre outras que dependem da angiogênese. As NPs podem se ligar à células inibindo a proliferação de células endoteliais, a sinalização ou induzindo apoptose em células causadoras de patologias dependentes de angiogênese. Esse fato abre novas possibilidades para inativar a função “indutora de doenças” das proteínas pelas nanopartículas metálicas e nanopartículas metálicas com superfícies modificadas (BHATTACHARYA, MUKHERJEE, 2008).

Pesquisadores utilizando nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) de 5 nm com DOPAC (Ácido 3,4-dihidroxifenilacético) ligados à proteínas anti-interleucina humana – IL13α2R, observaram a ligação específica deste bioconjugado apenas com as células cancerígenas encefálicas, ou seja, as células saudáveis do cérebro não foram afetadas. Este estudo foi baseado no modelo da reatividade da luz com híbridos de NPs TiO<sub>2</sub>-anticorpos causando fototoxicidade em células cancerígenas cerebrais, no caso, glioblastoma multiforme (GBM) (ROZHKOVA *et al.*, 2009).

## 1.1 Nanopartículas de Óxido de Ferro Magnético

Além das NPs de ouro, prata, titânio e platina, existe um grande interesse nas nanopartículas de óxido de ferro magnético, pois essas NPs vêm sendo utilizadas em líquido de contraste para análises de ressonância magnética (GUIMARAES *et al.*, 1994; LUTZ *et al.*, 2006; JING *et al.*, 2008; CHEN, Y. J. *et al.*, 2010). Células tronco mesenquimais marcadas com nanopartículas de óxido de ferro magnético

foram injetadas em joelhos lesionados de coelhos e posteriormente analisados os efeitos dessas células marcadas através de RM, ou seja, a utilização de células marcadas com nanopartículas como contraste podem funcionar como uma alternativa para estudos *in vivo*, sem a necessidade de retirada de tecido para análise histológica (JING *et al.*, 2008).

Um estudo mostrou que uma injeção intravenosa de nanopartículas de óxido de ferro (10 mg/kg) em ratos pode recrutar monócitos e macrófagos inativos e rastreá-los por imagem de ressonância magnética (MRI – Magnetic Resonance Image) em modelos de Infarto do Miocárdio. A precisão desta técnica é semelhante à análise histológica do coração, mostrando que a utilização de NPs de óxido de ferro magnético é uma opção para estudos *in vivo* (MONTET-ABOU *et al.*, 2010).

As nanopartículas de óxido de ferro magnético também podem ser utilizadas na termoterapia intratumoral. Em um estudo em humanos, foram injetadas NPs de óxido de ferro magnético (diâmetro~12 nm, concentração de 112mg/mL) numa média de 0,28mL/cm<sup>3</sup> de GBM (primário ou recorrente). As NPs foram aquecidas em campo magnético alternado e combinado com radioterapia estereotáxica fracionada. O estudo mostrou que a combinação da termoterapia com doses reduzidas de radiação é segura e efetiva em GBM recorrentes quando comparado com os tratamentos convencionais utilizados atualmente (MAIER-HAUFF *et al.*, 2010).

As partículas magnéticas possibilitam manipular remotamente estruturas mecanosensorias das células, pois a ação da força magnética é rápida e sua direção, magnitude e duração podem ser controladas. Além disso, unindo essa partícula a um ligante celular específico, é possível isolar a resposta de um único receptor endócrino, possibilitando os estudos das vias de sinalização juntamente com os processos de transdução de sinais (SNIADACKI, 2010).

Além da utilização das NPs de óxido de ferro magnético em diagnósticos por imagem, terapias ou como ferramenta de estudo de vias de sinalização, essas NPs também são utilizadas no desenvolvimento de novos produtos ou tecnologia que visam à melhoria da qualidade de vida do homem.

Um exemplo disso é a utilização da força magnética juntamente com nanopartículas de óxido de ferro magnético com diâmetro médio de 10 nm, ligados a

lâminas de células mesenquimais, no desenvolvimento de uma nova técnica de engenharia de tecidos, possibilitando a construção de uma potente ferramenta para tratamentos de defeitos ósseos (SHIMIZU *et al.*, 2007).

Outro estudo mostrou que, cimento a base de fosfato  $\alpha$ -tricálcio em pó modificado com NPs de óxido de ferro aumenta a força máxima durante a compressão do composto após o seu endurecimento, aumenta o tempo de manipulação e injetabilidade do composto após o início de sua manipulação, sem afetar a citocompatibilidade do cimento. Esse composto abre novas possibilidades para o desenvolvimento de novos produtos injetáveis aplicados em cirurgias espinhais (VLAD *et al.*, 2008).

As NPs de óxido de ferro magnético também podem ter efeitos antibacterianos. Este efeito foi observado utilizando NPs (aproximadamente 9nm de diâmetro) para formar cadeias de nanopartículas de aproximadamente 100 a 200nm de comprimento em culturas de *Staphylococcus aureus*. Essas culturas foram incubadas com 30 $\mu$ g/mL, 300 $\mu$ g/mL e 3mg/mL de NPs durante 4h, 12h e 24h. O resultado obtido foi a diminuição do crescimento dessas culturas com a dose de 3mg/mL em todos os tempos quando comparados com o grupo controle (sem NPs) (TRAN *et al.*, 2010).

Porém, as nanopartículas de óxido de ferro magnético não são totalmente inofensivas para as células. Um estudo mostrou que as nanopartículas de óxido de ferro magnético com diâmetros entre 5nm e 12nm diminuíram de forma dose-dependente a capacidade das células neuronais da linhagem PC12 se diferenciarem em resposta ao fator de crescimento neural. Além disso, as células PC12 expostas a diferentes doses de NPs de óxido de ferro magnético apresentaram viabilidade diminuída, aumento do rompimento do citoesqueleto e diminuição do contato intracelular (PISANIC *et al.*, 2007).

Outro estudo *in vitro* mostrou que a incorporação de NPs de óxido de ferro magnético (diâmetro médio de 10nm) pelas células é dependente da dose, tempo de incubação e propriedades da superfície das partículas. A incorporação dessas NPs pelos lisossomos das células do músculo liso não causaram efeitos inflamatórios, porém diminuíram a viabilidade das células (ZHANG *et al.*, 2009).

A nanotoxicologia é um estudo da interação entre os NMs e o sistema biológico, principalmente sob o ponto de vista físico e químico, como a forma, tamanho, composição química, superfície química e agregação. Muitas pessoas são expostas à nanoestruturados de várias formas, como pesquisadores de nanocompostos, pacientes que recebem tratamentos com NPs ou pessoas que utilizam produtos com NPs. O crescimento da nanotecnologia está crescendo de forma exponencial e terá impactos benéficos e maléficos para a saúde (EL-ANSARY,AL-DAIHAN, 2009).

## 1.2 Nanotoxicidade

Analisando os artigos disponíveis nas bases de consulta, podemos observar uma grande quantidade de trabalhos que utilizam nanopartículas de óxido de ferro magnético, seja para obtenção de imagens para diagnóstico, seja para tratamentos ou mesmo na engenharia de tecido. Mas também podemos encontrar um número crescente de trabalhos que alertam possíveis conseqüências maléficas da utilização de nanopartículas em geral. Esse aumento do uso desses nanomateriais originou uma subárea chamada nanotoxicidade. (FISCHER,CHAN, 2007). A utilização dessas nanopartículas pode apresentar efeitos tóxicos, havendo a necessidade de mais experimentos para estudar a toxicidade desses nanomateriais (NEL *et al.*, 2006; FISCHER,CHAN, 2007; SHUBAYEV, PISANIC,JIN, 2009).

O número de artigos publicados relacionados à nanociência vem crescendo de maneira exponencial. Em 1999 foram publicados 83 artigos, 154 artigos em 2004 e em 2009 foram publicados 1.284 artigos, sendo que destes 99% focaram na engenharia de nanopartículas e mais de 70% utilizaram ensaios *in vitro* sem qualquer comparação *in vivo* (HAYNES, 2010). Com o aumento da utilização de NPs em diversas áreas, a preocupação em relação à nanotoxicidade vem aumentando drasticamente.

Em Abril de 2006 foi realizado um Workshop de Nanotoxicologia em Washington DC. Neste workshop estavam presentes 26 cientistas de vários setores, tais como: do governo, acadêmico, industrial e de organizações sem fins lucrativos. Esse encontro teve 2 perguntas como foco:

- 1) Conhecendo as propriedades físicas, químicas e biológicas da engenharia de NPs, quais informações são necessárias para avaliar os perigos para a saúde humana das nanopartículas em produtos que já estão ou serão comercializadas?
- 2) Como as informações necessárias para avaliar os perigos para a saúde humana das nanopartículas em produtos que já estão ou serão comercializadas podem ser obtidas rápida e eficientemente?

Este encontro resultou em algumas recomendações, entre elas, avaliar quantitativamente os riscos, selecionando 3 a 5 nanopartículas específicas para caracterização físico-químicas, e testes *in vitro* e *in vivo* (BALBUS *et al.*, 2007). Segundo The Nanoproject on Emerging Nanotechnologies, em 2005 existiam 54 produtos à base de nanotecnologia, já em 2009 a quantidade de produtos aumentou para 1015, sendo que destes produtos 605 estão voltados para a saúde e bem estar (NANOTECHNOLOGIES, 2009).

A Conferência de nanotoxicologia: Saúde e Impactos Ambientais foi realizada em 2009 no Reino Unido. Nesta conferência foram discutidos os seguintes itens: a) Dosimetria quantitativa de NPs; b) Perigos associados à NPs e nanotubos de carbono; c) Potenciais efeitos para a saúde humana em relação as respostas toxicológicas; d) Ecotoxicologia; e) Utilização de nanotecnologia nos alimentos; e f) Desenvolvimento de banco de dados sobre nanotoxicologia (SINGH, 2009). Desta forma podemos observar o crescente interesse e preocupação da sociedade internacional sobre a saúde humana em relação à utilização de produtos que utilizam NPs.

Apesar da possibilidade da utilização de NMs poder causar efeitos tóxicos ainda não ser conclusiva, não se pode prorrogar as avaliações destes materiais. A

compreensão da nanotoxicologia pode ser de grande importância para o desenvolvimento da engenharia de nanoproductos (NEL *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos sobre nanotoxicologia estão focadas em estudos em culturas de células *in vitro*, porém esses resultados podem não corresponder e substituir os resultados *in vivo* (FISCHER, CHAN, 2007; CLIFT, GEHR, ROTHEN-RUTISHAUSER, 2010). O interesse sobre a nanotoxicidade não é restrito apenas à saúde humana, pois ela não afeta apenas o homem, como também o meio ambiente (ROBBENS *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* mostram que o fulereno (molécula de carbono em forma esférica, elipsóide ou tubular) causa danos oxidativos; nanotubos de carbono podem causar granulomas em pulmões de ratos e camundongos, efeitos anti-proliferativos e diminuição da adesão das células, apoptose, necrose e estresse oxidativo; e TiO<sub>2</sub> pode causar inflamações, fibroses, danos ao pulmão e ao DNA ou mesmo interagir com o sistema imune humano (POMA, DI GIORGIO, 2008).

### 1.3 Toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro magnéticas

As nanopartículas magnéticas são uma classe de NPs que podem ser manipuladas sob a influência de campos magnéticos externos. Essas NPs magnéticas podem ser compostas por elementos magnéticos, tais como: ferro, níquel, cobalto e seus óxidos. As NPs de óxido de ferro magnética são as nanopartículas mais utilizadas na biomedicina. Baseado na biocinética das partículas, o tamanho de 10 a 100nm é ideal para “entregar” as drogas *in vivo*, pois são facilmente eliminados pelos rins (<10nm) (SHUBAYEV, PISANIC, JIN, 2009).

O aumento do interesse dos pesquisadores em relação à NPs de óxido de ferro magnético esta gerando preocupações em relação ao seu efeito tóxico possivelmente dose-dependente. Para esses estudos *in vitro* podemos encontrar na literatura algumas revisões que auxiliam e direcionam esses estudos (MAHMOUDI *et*



*al.*, 2009; MARQUIS *et al.*, 2009; STONE, JOHNSTON, SCHINS, 2009; OBERDORSTER, 2010).

Para o estudo da nanotoxicidade é importante saber a forma, tamanho e a distribuição magnética das nanopartículas de óxido de ferro magnético. Estudo *in vitro* com diferentes tamanhos de NPs de óxido de ferro magnético mostrou que a biocompatibilidade baseada na viabilidade celular, aumenta conforme a razão entre o polímero e a massa de ferro, independentemente da taxa de agitação (MAHMOUDI *et al.*, 2009).

A exposição à NPs de óxido de ferro (31 a 38nm) diminui a viabilidade das células endoteliais de cordão umbilical humano de forma dose dependente (de 0,1 a 20 mM) e inibe a diferenciação celular em Matrigel e migração/invasão. Isso indica que os efeitos tóxicos das NPs de óxido de ferro afetam a biocompatibilidade e biosegurança de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, este efeito tóxico pode ser aplicado em terapias para tumores de forma segura e confiável (WU *et al.*, 2010).

Estudos *in vivo* permitem observar e avaliar os efeitos a longo prazo, o acúmulo em órgãos, a biodistribuição, a retenção e a excreção. Esse tipo de estudo é de grande importância para comparar os resultados obtidos *in vitro*. Estudos *in vivo* geralmente estão focados em uma ou mais das 3 áreas: alteração da química do soro sanguíneo e população de células; mudanças da morfologia dos tecidos; e biodistribuição das NPs (MARQUIS *et al.*, 2009).

Os órgãos ou tecidos mais comumente estudados são: rim, pulmão, fígado e sistema nervoso central. Além disso, existem estudos na área de interações nanopartículas e proteínas e espermatoxicidade (EL-ANSARY, AL-DAIHAN, 2009).

Apesar do grande interesse das NPs de óxido de ferro, seja em tratamentos, “entrega” de fármacos, diagnóstico, entre outros, não existem muitos estudos sobre os possíveis efeitos tóxicos *in vivo*. Também, não existe estudo sobre a possível influência de NPs de óxido de ferro magnético sobre o tecido ósseo, uma vez que o ferro pode ser absorvido pelos dentes e ossos *in vivo*. Apesar do ferro não participar da matriz mineral, há a possibilidade dos íons de ferro auxiliar na proteção da superfície (BAUMINGER *et al.*, 1985).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos de tratamento crônico com nanopartículas de óxido de ferro magnéticos (nFe) em ratos jovens adultos. Para isso, foram analisados os parâmetros biométricos, biomecânicos e biofísicos do tecido ósseo, a biometria das vesículas seminais e das próstatas ventrais e a análise bioquímica do sangue e hematologia de ratos adultos jovens.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar os possíveis efeitos das nFe sobre o tecido ósseo;
- Analisar se as nFe foram capazes de alterar a bioquímica sanguínea e hematologia;
- Analisar as possíveis alterações biométricas das vesículas seminais e próstatas ventrais.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

No experimento foram utilizados 25 ratos Wistar, com quatro meses de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento foi realizado no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas no biotério deste laboratório, em um regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlados ( $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), alimentados com ração comercial e água “ad libitum”. Este protocolo experimental com modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFSCar - Protocolo nº 005/2010.

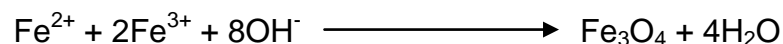
#### **3.2 Nanopartículas Metálicas de Óxido de Ferro Magnético**

As nanopartículas metálicas de óxido de ferro magnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) foram produzidas no Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo – *Campus* São Carlos – USP-SC.

O princípio da preparação das nanopartículas metálicas de óxido de ferro magnético é a coprecipitação: uma reação de alcalinização controlada, onde se adiciona um precipitador, neste caso uma base (solução aquosa de sais de ferro – pH 9 – 10, temperatura ambiente).

Para a produção de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi utilizada uma mistura de sais de ferro II e ferro III, pois essa mistura proporciona uma produção de partículas menores comparados com a utilização se apenas um tipo de sal (IIDA *et al.*, 2007).

A reação de formação das NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  esta representada na seguinte equação:



### 3.3 Protocolo Experimental

Ao completarem quatro meses de vida, os animais foram pesados e colocados em gaiolas metabólicas. O peso dos animais foram analisados duas vezes por semana com a finalidade de acompanhar o crescimento dos animais e adequar a dose de nanopartículas de óxido de ferro magnético (nFe)

Os animais foram tratados, por gavagem gástrica, com nFe durante 5 (cinco) dias por semana, durante 8 (oito) semanas. As doses utilizadas foram de 0,6 e 0,3 mg/kg MC. Lutz, *et al.* (2006) utilizam a dose de 0,6 mg/kg MC intravenosamente para adquirir a imagem por ressonância magnética do animal.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em:

- Grupo Controle (n=9): Ratos tratados com salina 0,9% (0,1 ml/100g MC);
- Grupo nFe 0,6 (n=8): Ratos tratados com 0,6 mg/kg MC de nanopartículas de óxido de ferro magnético;
- Grupo nFe 0,3 (n=8): Ratos tratados com 0,3 mg/kg MC de nanopartículas de óxido de ferro magnético.

Após as 8 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e os seguintes tecidos retirados: fêmur, quinta vértebra lombar, próstatas ventrais, glândulas seminais e sangue.

Os fêmures e as quintas vértebras lombares foram dissecados e congelados à -20°C. As glândulas seminais e próstatas ventrais foram pesadas imediatamente após a retirada e o sangue coletado do tronco foi utilizado para montagem das lâminas de esfregaço sanguíneo e posteriormente centrifugado para separar o soro e plasma.

### **3.4 Parâmetros Analisados**

#### *3.4.1 Consumo de água e ração*

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas durante as 8 semanas e diariamente foi quantificado o consumo de ração e água.

#### *3.4.2 Excreção de fezes e urina*

Diariamente foram coletadas as fezes e urina. As fezes foram pesadas e o volume da urina quantificado.

### 3.4.3 *Parâmetros Biométricos*

#### 3.4.3.1 Massa corporal

A massa corporal de cada animal dos diferentes grupos experimentais foi verificada duas vezes por semana.

#### 3.4.3.2 Comprimento e altura dos ossos

O comprimento dos fêmures e a altura das vértebras foram mensurados utilizando-se um paquímetro.

#### 3.4.3.3 Peso das Glândulas Seminais e Próstatas Ventrals

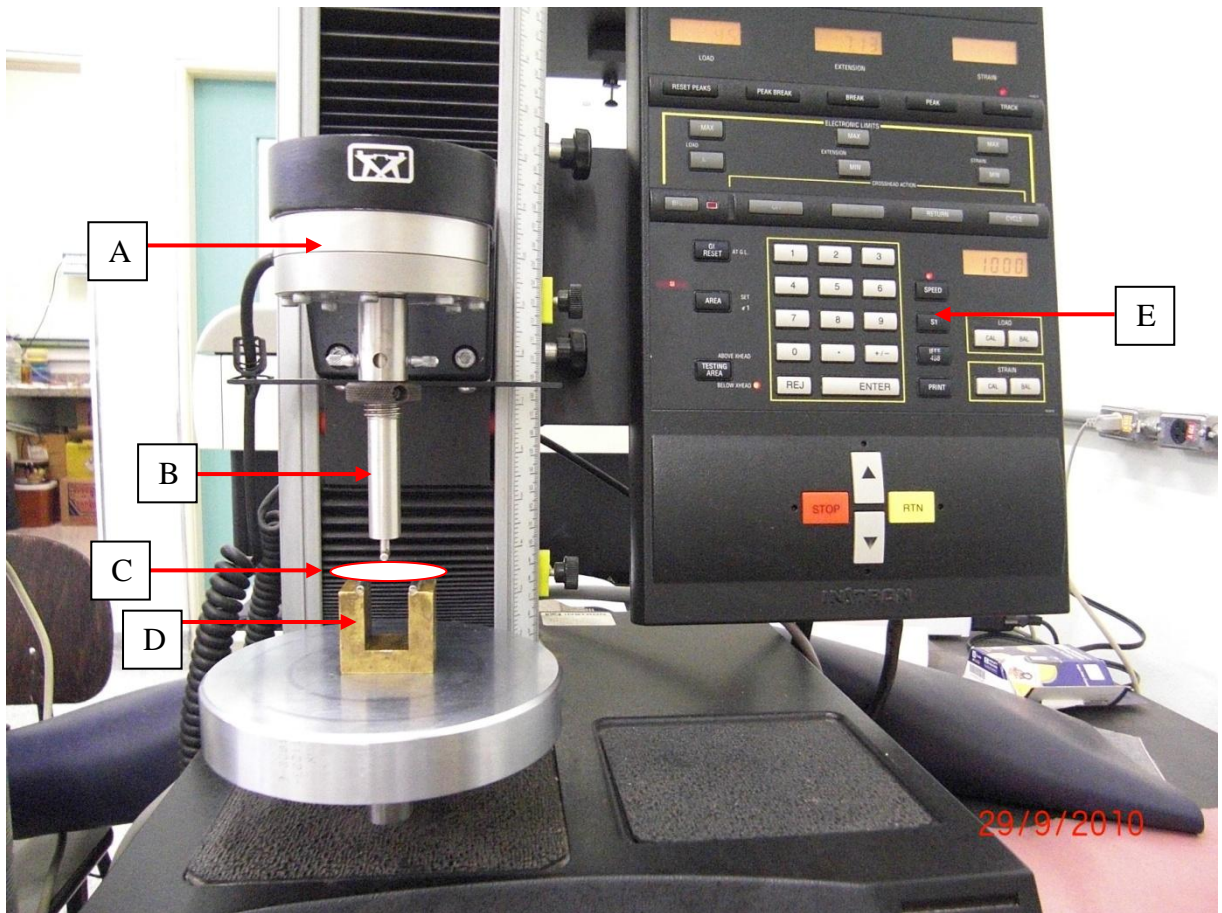
Após a eutanásia, as glândulas seminais e as próstatas ventrais foram retiradas e pesadas.

### 3.4.4 Parâmetros biomecânicos dos ossos

Os parâmetros biomecânicos ósseos foram obtidos através de ensaios mecânicos de flexão a três pontos (com os fêmures) e de compressão (com as vértebras), realizados em uma máquina universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente (ENGESAETER, EKELAND, LANGELAND, 1978; PENG *et al.*, 1994).

#### 3.4.4.1 Ensaio mecânico de flexão a três pontos

No teste de flexão a três pontos em fêmures, as extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes, com diâmetros de 3,0mm, suportados por apoios distanciados de 21,70mm. A força foi aplicada utilizando uma célula de carga Instron, modelo CM, com capacidade máxima de 1kN. Esta força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido ântero-posterior, no ponto médio entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com o rolete de 3,0 mm fixada na sua extremidade, a uma velocidade constante de 5 mm/min até o momento de ruptura do osso (Figura 1). A força aplicada e o deslocamento da haste da máquina foram monitorados e registrados através do programa Instron Series IX. (ROBLING, TURNER, 2002; AKHTER *et al.*, 2003; AKHTER *et al.*, 2004) (Figura 3).



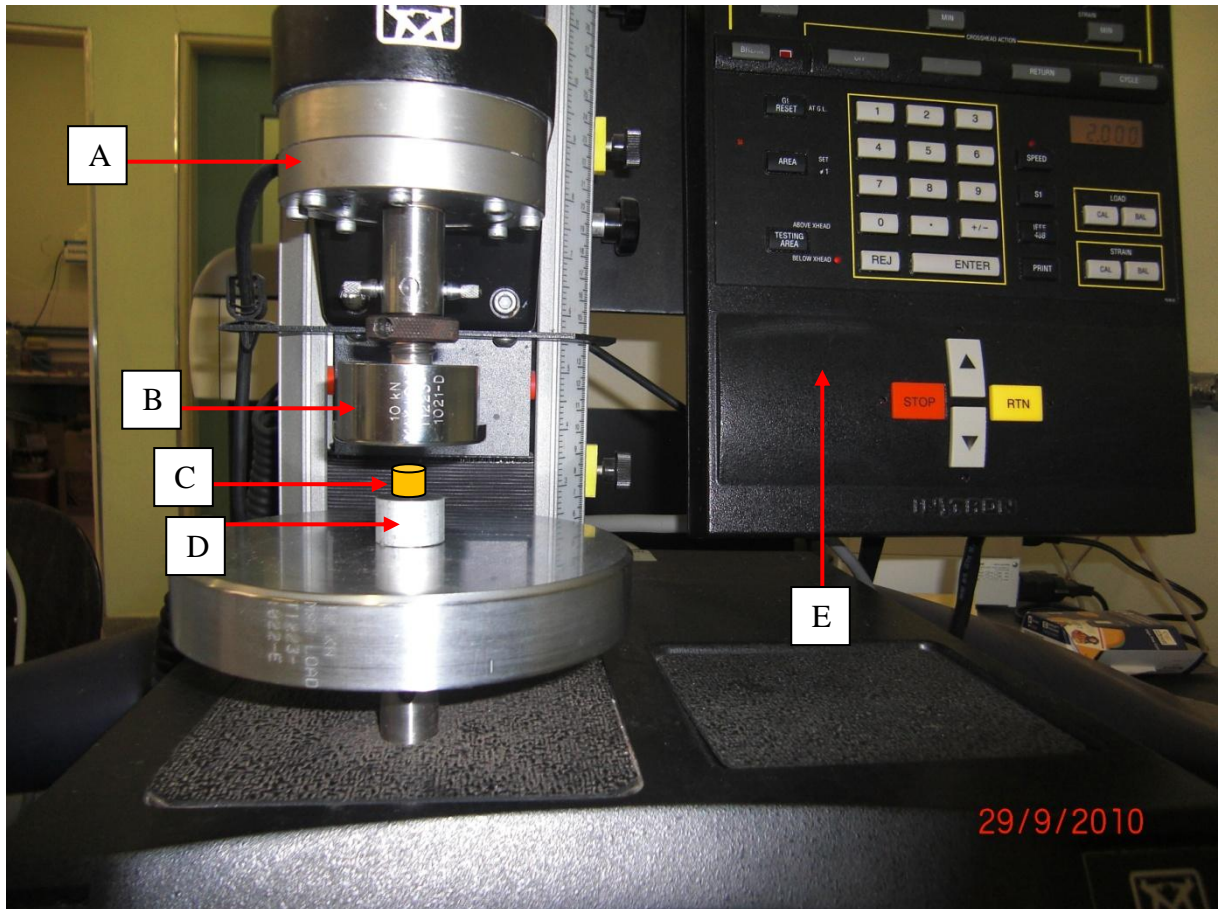
**Figura 1** - Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) preparada para o teste de flexão a três pontos em fêmur de rato. A: Célula de carga (1kN); B: Haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: Amostra a ser analisada (Fêmur); D: Suporte; E: Painel de controle.



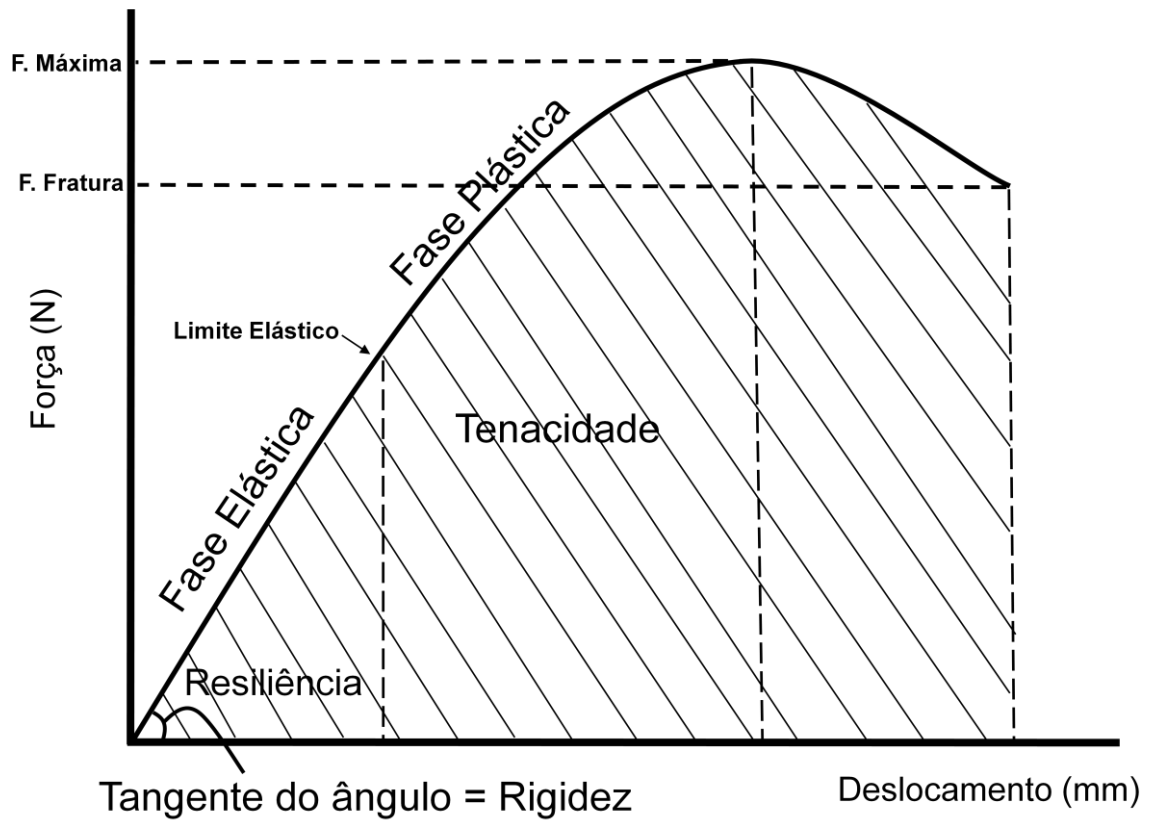
#### 3.4.4.2 Ensaio mecânico de compressão de vértebras

Para o ensaio de compressão da vértebra foi utilizada a quinta vértebra lombar ( $L_5$ ), onde arco vertebral, discos intervertebrais e os processos espinhosos foram retirados, para a obtenção do corpo vertebral. Posteriormente as extremidades do corpo vertebral foram levemente lixadas para a obtenção de superfícies planas, e colocadas sobre um suporte plano para receberem a carga de compressão. Esta carga foi aplicada utilizando uma célula de carga Instron, modelo CM, com capacidade máxima de 1kN. A velocidade de aplicação da carga foi de 2 mm/min no sentido do eixo crânio-caudal (MOSEKILDE, DANIELSEN, KNUDSEN, 1993; KATSUMATA *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 2001) até o esmagamento parcial da vértebra (2/3 da altura da vértebra) (Figura 2).

O ensaio foi registrado pelo software Instron Series IX, que gerou uma curva força-deformação (Figura 3). Através desta curva obteve-se a *Força máxima (N)*, que corresponde à maior carga suportada pela vértebra.



**Figura 2** - Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) ilustrando um teste de compressão da vértebra de rato. A: Célula de carga de 1kN; B: Haste com superfície plana; C: Material a ser analisado (Vértebra); D: Suporte com base plana; E: Painel de controle.



**Figura 3** - Representação esquemática de uma curva Força x Deformação registrado pelo software Instron Series IX durante o ensaio biomecânico.

Para o ensaio biomecânico de flexão a três pontos, pudemos obter a força máxima, deslocamento na carga máxima, força de fratura, deslocamento na fratura, resiliência, tenacidade e rigidez. Para o ensaio de compressão de vértebra, analisamos a força máxima.

### **Força Máxima (N)**

Corresponde a maior força suportada pela amostra (fêmur ou vértebra) durante o ensaio.

**Deformações (mm)**

Distância percorrida pela haste durante o ensaio no equipamento: no ponto de carga máxima e de fratura.

**Força de Fratura (N)**

Força aplicada no momento da fratura da amostra (fêmur) ao longo do ensaio.

**Resiliência (J)**

Corresponde à área sob a curva (força x deformação) até o limite elástico. Representa a energia absorvida pelo tecido ósseo durante a fase elástica, ou seja, a energia que a amostra suporta sem sofrer deformação permanente.

**Tenacidade (J)**

Corresponde à área sob a curva (força x deformação) até o ponto de ruptura. Representa a energia necessária para provocar a ruptura do material, ou seja, a capacidade de uma estrutura resistir a uma força.

**Rigidez (N/mm)**

Determinada por meio da inclinação da reta (T) ajustada aos pontos da curva (força x deformação) na fase elástica (SOGAARD *et al.*, 1997). Representa a capacidade de resistir a deformações.

### 3.4.5 Parâmetros biofísicos

Os fêmures e as vértebras foram mantidos em água destilada e colocados no dessecador durante 24 horas com a finalidade de retirar o ar dos poros ósseos.

Os seguintes parâmetros foram verificados: Peso imerso ( $P_i$ ) e peso úmido ( $P_u$ ). A seguir, os ossos foram desidratados em uma estufa (marca Funbec) a  $100^\circ\text{C}$ , durante 24 horas, obtendo-se assim o peso seco ( $O_s$ ).

Para obtenção do peso das cinzas ( $P_m$ ), os ossos foram colocados em uma mufla a  $800^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Para tais mensurações foi utilizada uma balança eletrônica (marca Chyo). O peso de material orgânico (PMO) foi obtido através da diferença entre o peso seco e o peso das cinzas.

O volume ósseo foi calculado seguindo o Princípio de Arquimedes. As densidades mineral e óssea dos fêmures foram calculadas a partir das equações abaixo descritas. A análise do volume ósseo pelo princípio de Arquimedes é equivalente à análise feita através da densitometria de raio-X por dupla energia (DXA) (KEENAN *et al.*, 1997).

$$\text{Volume Ósseo} = \frac{(P_u - P_i)}{\rho} = (\text{cm}^3)$$

$$\text{Densidade Óssea} = \frac{P_u}{\text{Volume ósseo}} (\text{g/cm}^3)$$

$$\text{Densidade Mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume ósseo}} (\text{g/cm}^3)$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100x(P_u - P_s)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100x(Ps - Pm)}{Pu}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100xPm}{Pu}$$

Onde:

Pm – Peso do Material Mineral (g)

Pu – Peso Úmido do Osso (g)

Pi – Peso do Osso Imerso (g)

$\rho$  - Densidade da Água ( $\text{g/cm}^3$ )

### 3.4.6 Parâmetros bioquímicos

#### 3.4.6.1 Glicose

A glicose sérica foi dosada utilizando kit comercial GLICOSE PAP Liquiform (Labtest). Este kit utiliza o método colorimétrico e sistema enzimático em método cinético ou de ponto final. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 505 nm.

#### 3.4.6.2 Colesterol

O colesterol sérico foi dosado utilizando kit comercial COLESTEROL Liquiform (Labtest). Este kit utiliza o método colorimétrico e sistema enzimático colorimétrico com reação de ponto final. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 500 nm.

#### 3.4.6.3 Creatinina

A creatinina sérica foi dosada utilizando kit comercial CREATININA K (Labtest). Este kit utiliza o método colorimétrico e sistema por reação cinética de dois pontos. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 510 nm.

#### 3.4.6.4 Uréia

A uréia sérica foi dosada utilizando kit comercial URÉIA UV Liquiform (Labtest). Este kit utiliza o método enzimático UV e sistema enzimático por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos em tempo fixo. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 340 nm.

#### 3.4.6.5 Aspartato Amino Transferase (AST)

O Aspartato Amino Transferase (AST) ou Transaminase Glutâmico Oxalacética (GOT) foi dosada sérica utilizando kit comercial AST/GOT Liquiform (Labtest). Este kit utiliza o método de cinética UV-IFCC e sistema em modo cinético contínuo. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 340 nm.

#### 3.4.6.6 Alanina Amino Transferase (ALT)

A Alanina Amino Transferase (ALT) ou Transaminase Glutâmico Pirúvica (GPT) foi dosada sérica utilizando kit comercial ALT/GPT Liquiform (Labtest). Este kit utiliza o método de cinética UV-IFCC e sistema em modo cinético. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 340 nm.

#### 3.4.6.7 Ferro

O ferro sérico foi dosado utilizando kit comercial Fe Liquiform (Labtest). Este kit utiliza o método colorimétrico e sistema bi-reagente por reação de ponto final. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 560 nm.



#### 3.4.6.8 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina sérica foi dosada utilizando kit comercial Fosfatase Alcalina Liquiform (Labtest). Este kit utiliza o método colorimétrico e sistema com método cinético. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Labmax 240 com comprimento de onda de 405 nm.

#### 3.4.7 Hematologia

Para a hematologia, foi coletada uma gota de sangue no momento da eutanásia para a confecção de lâminas (esfregaço sanguíneo). Foi realizada a contagem celular em microscópio óptico comum com  $n=100$  células, observando modificações morfológicas na série branca e vermelha.

### 3.5 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como MÉDIA  $\pm$  EPM, comparados entre os grupos experimentais pela análise de variância ANOVA seguido do teste t de Student aplicados pelo Microsoft Excel. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

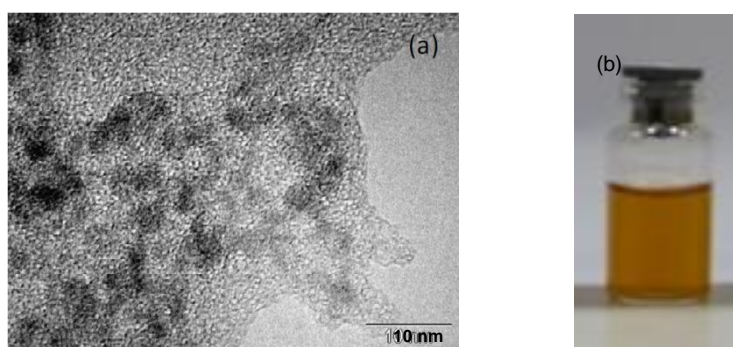
## Normas Técnicas referentes à elaboração deste trabalho

A estrutura geral deste trabalho, bem como as referências bibliográficas e citações, seguem a NBR 6023 e 10520 de agosto de 2002, e NBR 14724 de dezembro de 2005, de autoria da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, adotadas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Nanopartículas de Óxido de Ferro Magnéticos

As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação e estabilizadas com PDAC (Cloreto de Polidialildimetilamônio) de alta massa molar (Figura 4). O diâmetro médio e desvio padrão foi de  $5,5 \pm 0,4$  nm.



---

Figura 4: Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de óxido de ferro magnético (a) e de uma amostra de solução utilizada no experimento (b). As fotos foram cedidas pela Valéria Spolon Marangoni (IFSC – USP/São Carlos)

### 4.2 Massa corporal

Os animais foram pesados 2 (duas) vezes por semana com o objetivo de acompanhar o crescimento dos animais e para adequação da dose de NPs e salina administradas.

A MC inicial foi semelhante nos três diferentes grupos experimentais (Tabela 1).

Após a primeira semana, observamos que a MC dos animais estabilizou e posteriormente aumentou, exceto a dos animais do grupo nFe 0,6. O aumento da MC dos animais dos grupos controle e nFe 0,3 foram semelhantes durante todo o tratamento. Porém o grupo nFe 0,6 manteve seu peso durante as primeiras 4 (quatro) semanas, após esse período os animais começaram a perder massa corporal até o final do experimento (Figura 5 e Tabela 1).

Após a quinta semana de tratamento, os animais dos grupos nFe 0,6 e nFe 0,3 apresentaram diferença estatística da MC. Após a sexta semana, a MC dos animais do grupo nFe 0,6 já era diferente dos grupos controle e nFe 0,3 (Figura 5). Os animais dos grupos controle e nFe 0,3 apresentaram ganho de MC após a segunda semana de tratamento, porém os animais do grupo nFe 0,6 perderam massa corpórea. A MC dos animais dos grupos controle e nFe 0,3 não eram diferentes ao final do tratamento, porém a MC dos animais do grupo nFe 0,6 era menor que os outros dois grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Massa corporal inicial e final dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Massa Corporal	Inicial (g)	Final (g)
Controle (9)	357,11 $\pm$ 5,74	348,22 $\pm$ 11,21
nFe 0,3 (8)	361,75 $\pm$ 8,25	364,25 $\pm$ 10,19
nFe 0,6 (8)	363,75 $\pm$ 6,78	301,25 $\pm$ 14,64 <sup>a,b</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05.

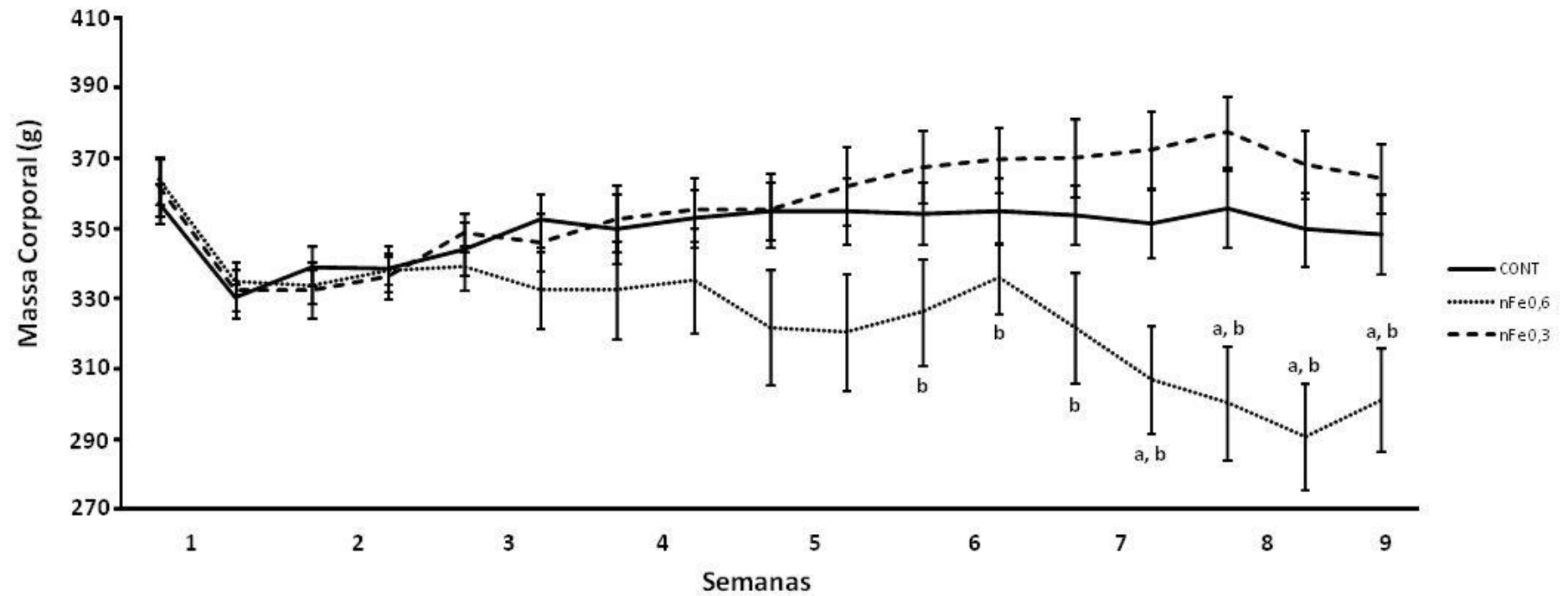


Figura 5 – Evolução ponderal dos animais dos três grupos experimentais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3.  $p < 0,05$ .

### 4.3 Consumo de água e ração

O consumo de água e ração dos animais foi quantificado diariamente, durante todo experimento (56 dias).

A ingestão de ração foi semelhante durante todo o período experimental, porém podemos observar que a ingestão do grupo nFe 0,6 manteve-se abaixo do que a do grupo nFe 0,3 e semelhante a do grupo controle (Figura 6). Este fato reflete-se sobre o consumo médio dos animais durante todo o período experimental (Tabela 2).

Tabela 2: Consumo médio de ração pelos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupo	Ração (g)
Controle (9)	19,69 $\pm$ 0,48
nFe 0,3 (8)	21,51 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>
nFe 0,6 (8)	18,35 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05.

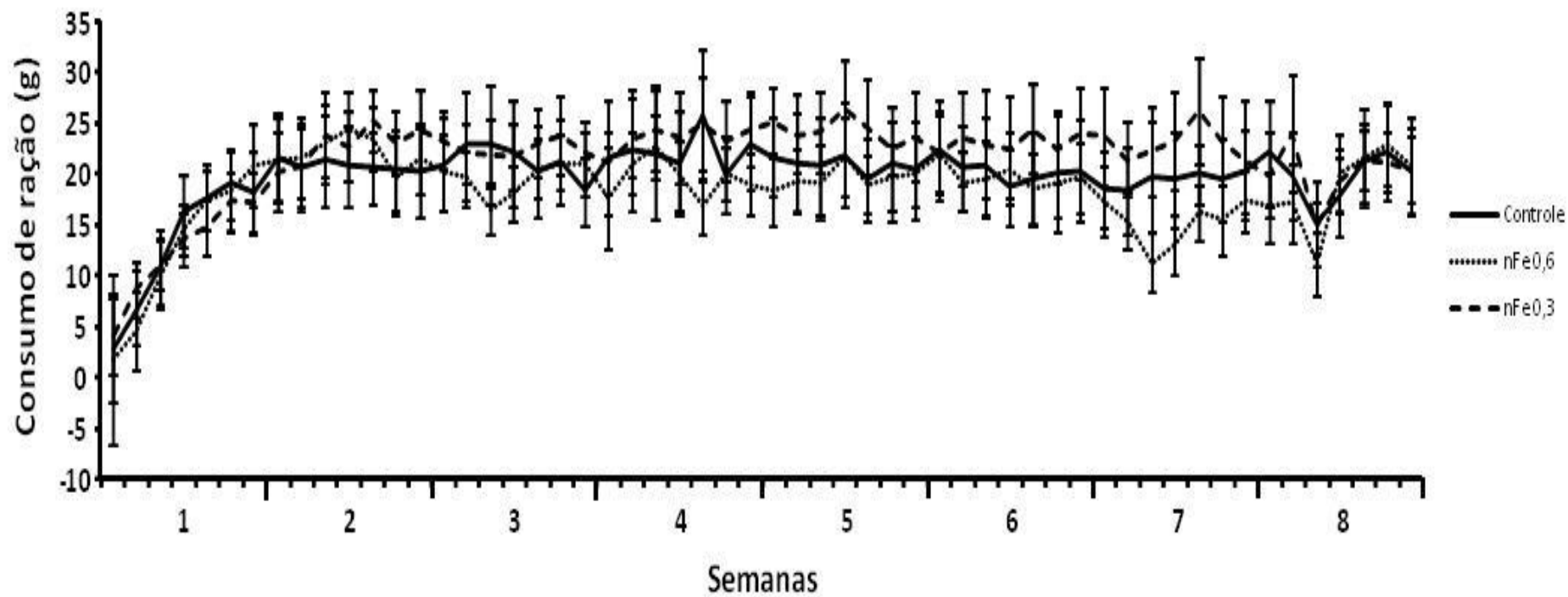


Figura 6 – Consumo de ração pelos animais dos 3 grupos experimentais durante todo o período experimental.

O volume de água consumido pelos animais não manteve um padrão durante todo o período experimental (Figura 7), porém ao analisarmos o consumo médio de água dos animais, observamos que o grupo nFe 0,3 consumiu volume menor do que os grupos controle e nFe 0,6 (Tabela 3).

Tabela 3: Consumo médio de água pelos animais dos diferentes grupos durante todo o período experimental. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupo	Água (mL)
Controle (9)	30,28 $\pm$ 0,52
nFe 0,3 (8)	27,87 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
nFe 0,6 (8)	30,19 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05.



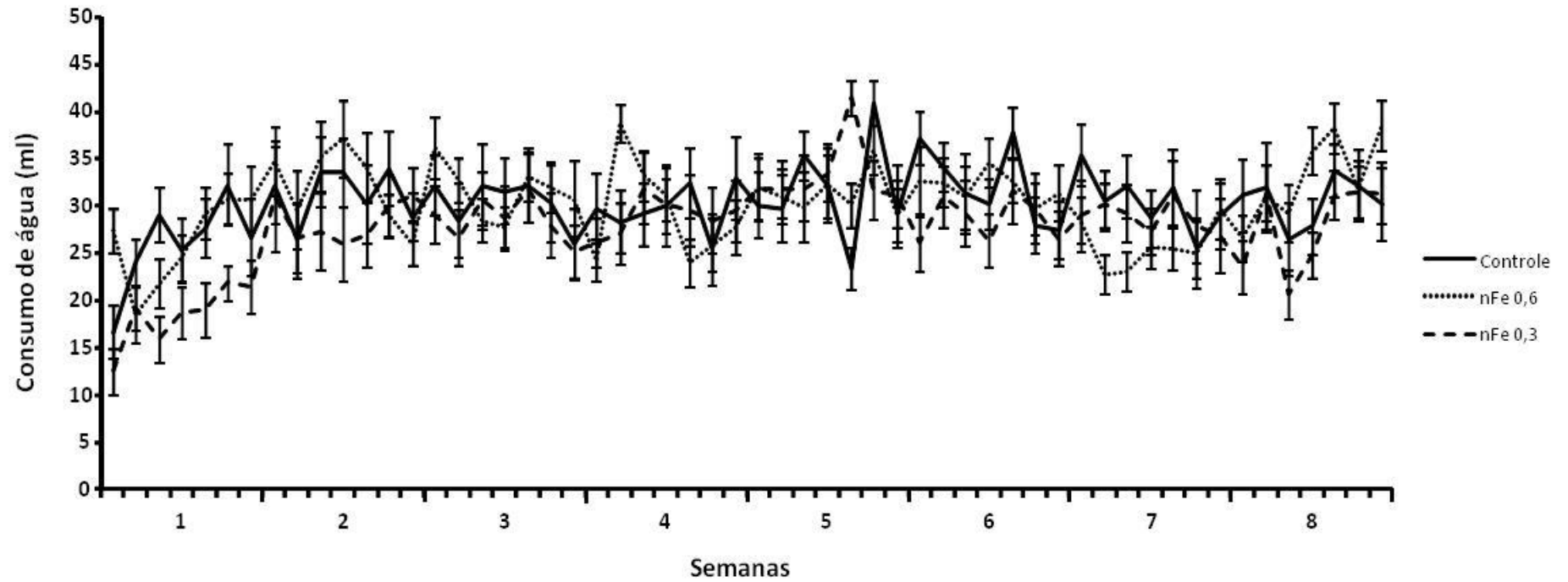


Figura 7 – Consumo de água pelos animais dos três grupos experimentais durante todo o período experimental.

#### 4.4 Excreção de fezes e urina

As fezes foram coletadas e pesadas diariamente. Não foi observada característica de diarreia (consistência normal) das fezes de todos os animais. A quantidade média de fezes excretada pelos animais do grupo nFe 0,3 foi maior que a dos animais do grupo controle e nFe 0,6. Os animais do grupo nFe 0,6 excretaram menor quantidade de fezes do que os animais do grupo controle e do grupo nFe 0,3 (Tabela 4). Quando analisamos a excreção diária durante os 56 dias, observamos que da segunda até a oitava semana de tratamento, a quantidade de fezes excretada do grupo nFe 0,6 manteve-se menor do que a dos animais controle e nFe 0,3. Os animais do grupo nFe 0,3, durante o mesmo período, manteve a quantidade de fezes excretada maior que a do grupo controle e nFe 0,6 (Figura 8).

Tabela 4: Excreção média de fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupo	Fezes (g)
Controle (9)	8,20 $\pm$ 0,22
nFe 0,3 (8)	9,15 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
nFe 0,6 (8)	7,46 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05.

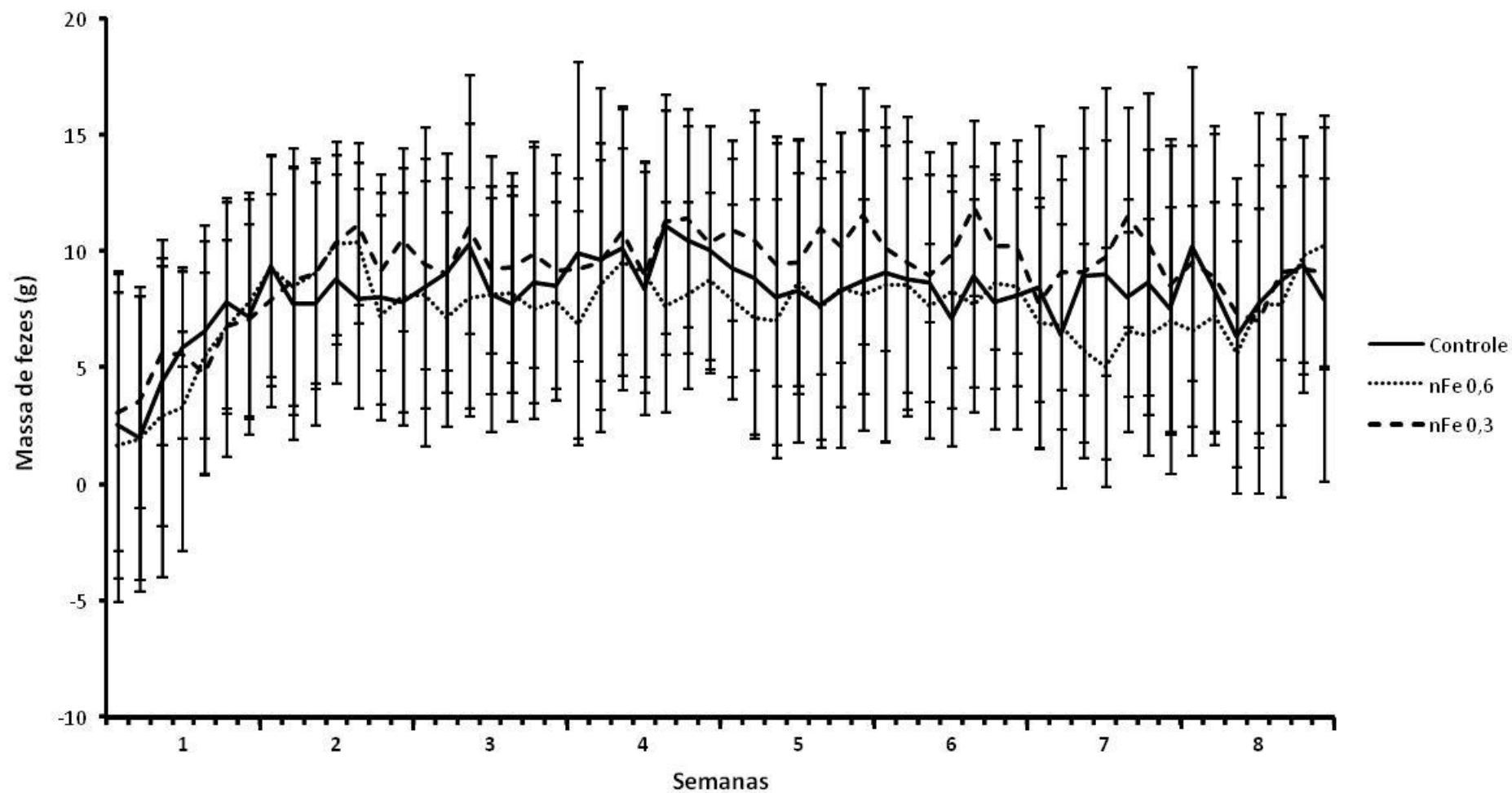


Figura 8 – Excreção de fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental.

O volume de urina excretada em aproximadamente 24 horas foi quantificado. Analisando a quantidade de urina excretada durante todo o período de tratamento foi observado que o volume de urina dos animais do grupo nFe 0,6 foi menor que a do grupo controle durante grande parte do experimento (Figura 9). Este dado pode ser confirmado ao analisarmos a excreção média de urina, em que podemos observar que os animais do grupo nFe 0,6 excretaram menor volume urinário do que os animais do grupo controle, apesar de não diferente do grupo nFe 0,3. A excreção do grupo nFe 0,3 não foi diferente do grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5: Volume médio de urina dos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupo	Urina (mL)
Controle (9)	6,93 $\pm$ 0,25
nFe 0,3 (8)	6,44 $\pm$ 0,15
nFe 0,6 (8)	6,03 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3.  $p < 0,05$ .

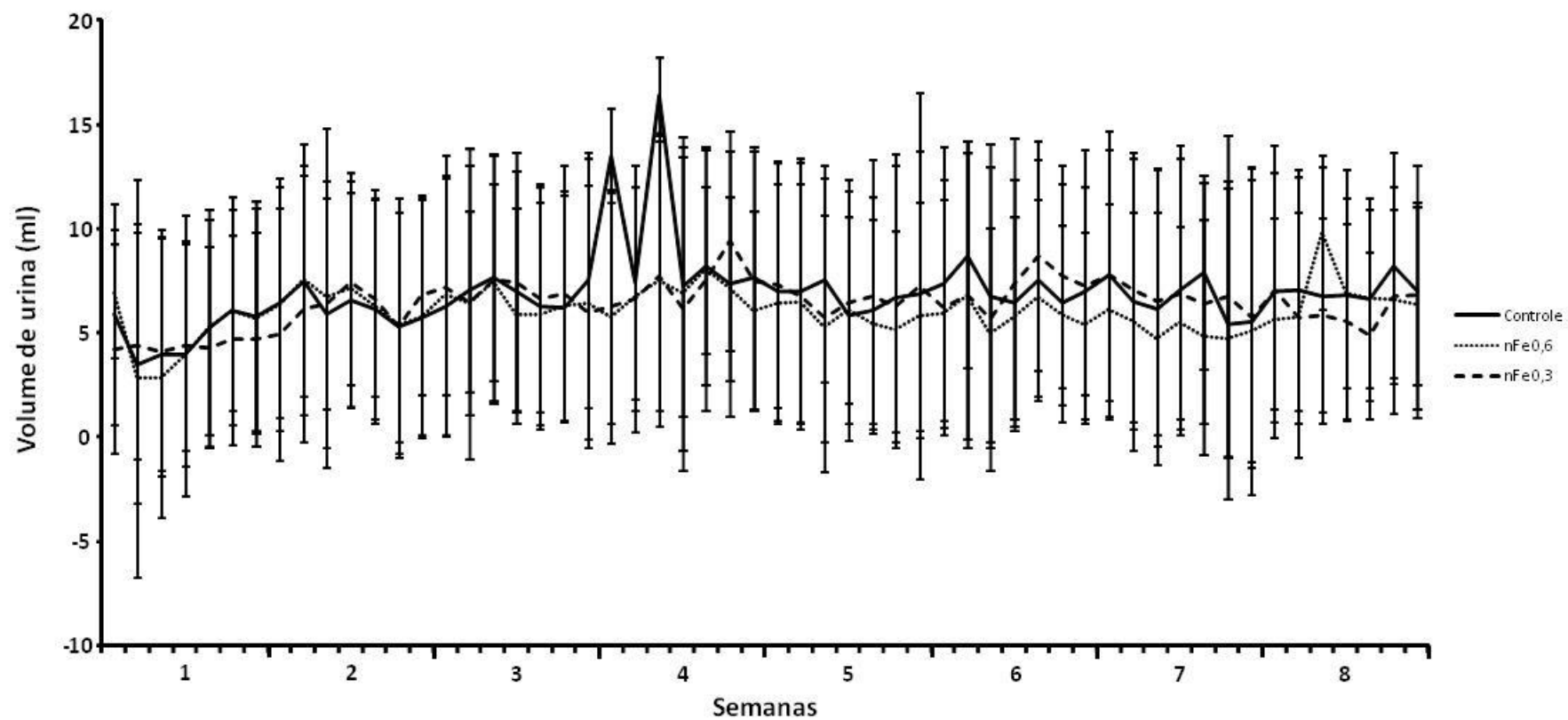


Figura 9 – Volume de urina excretada pelos animais dos diferentes grupos experimentais durante todo o período experimental.

#### 4.5 Glândulas seminais e próstatas ventrais

Após a eutanásia, as glândulas seminais foram retiradas, esvaziadas e pesadas. As próstatas ventrais também foram retiradas e pesadas.

A análise mostrou que os pesos das glândulas seminais e próstatas ventrais dos animais do grupo nFe 0,6 foram menores que os do grupo controle. Quando comparado com o grupo nFe 0,3, os pesos dos órgãos dos animais do grupo nFe 0,6 foram semelhantes. Os pesos dos órgãos do grupo nFe 0,3 foram semelhantes aos do grupo controle.

Resumindo, as glândulas seminais e as próstatas ventrais dos animais do grupo nFe 0,6 apresentaram atrofia em relação as dos animais do grupo controle, porém os animais do grupo nFe 0,3 não apresentaram diferença de pesos dos órgãos em relação aos grupos controle e nFe 0,6. O mesmo ocorre quando o peso dos órgãos é normalizado por 100g de MC (Tabela 6).

Tabela 6: Pesos das glândulas seminais e próstatas ventrais dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupos	Glândulas Seminais (g)	Glândulas Seminais Normalizada (g/100g)	Próstatas Ventrais (g)	Próstatas Ventrais Normalizadas (g/100g)
Controle (9)	0,42 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,01
nFe 0,3 (8)	0,40 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,01
nFe 0,6 (8)	0,29 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05.

## 4.6 Análise bioquímica sanguínea

### 4.6.1 Ferro, Glicose e Colesterol

As concentrações séricas de ferro e glicose dos animais dos diferentes grupos experimentais foram semelhantes. A concentração sérica de colesterol dos animais do grupo nFe 0,6 foi maior que a dos animais do grupo nFe 0,3, porém não maior que do grupo controle. O grupo nFe 0,3 apresentou concentrações de colesterol semelhantes aos do grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7: Concentrações séricas de ferro, glicose e colesterol dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupos	Ferro ( $\mu\text{g/dL}$ )	Glicose ( $\text{mg/dL}$ )	Colesterol ( $\text{mg/dL}$ )
Controle (9)	194,78 $\pm$ 15,82	85,11 $\pm$ 4,84	54,78 $\pm$ 3,36
nFe 0,3 (8)	217,00 $\pm$ 25,63	90,12 $\pm$ 4,29	51,87 $\pm$ 3,28
nFe 0,6 (8)	196,87 $\pm$ 11,82	85,87 $\pm$ 6,02	64,37 $\pm$ 3,48 <sup>b</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3.  $p < 0,05$ .

#### 4.5.2 Uréia e Creatinina

A análise das concentrações séricas de uréia e creatinina dos animais mostrou que elas foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais (Tabela 8).

Tabela 8: Concentrações séricas de uréia e creatinina dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupos	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle (9)	36,67 $\pm$ 2,32	0,42 $\pm$ 0,02
nFe 0,3 (8)	36,00 $\pm$ 2,97	0,45 $\pm$ 0,03
nFe 0,6 (8)	43,12 $\pm$ 5,06	0,41 $\pm$ 0,02

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05.

#### 4.6.3 AST e ALT

Os valores dos indicadores de lesão hepática AST (Aspartato Aminotransferase, antigo TGO – Transaminase Glutâmica Oxalacética) e ALT (Alanina Aminotransferase, antigo TGP – Transaminase Glutâmica Pirúvica) foram semelhantes entre os animais dos grupos controle, nFe 0,3 e nFe 0,6 (Tabela 9).



Tabela 9: Concentrações séricas de AST e ALT dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupos	AST (U/L)	ALT (U/L)
Controle (9)	300,00 $\pm$ 26,17	56,89 $\pm$ 2,74
nFe 0,3 (8)	220,75 $\pm$ 29,51	54,87 $\pm$ 4,96
nFe 0,6 (8)	260,37 $\pm$ 23,96	57,87 $\pm$ 4,29

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3.  $p < 0,05$ .

#### 4.6.4 Fosfatase Alcalina

As concentrações séricas de fosfatase alcalina foram semelhantes nos animais dos três grupos experimentais (Tabela 10).

Tabela 10: Concentrações séricas de Fosfatase alcalina dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

Grupos	Fosfatase Alcalina (U/L)
Controle (9)	216,11 $\pm$ 31,46
nFe 0,3 (8)	129,50 $\pm$ 37,53
nFe 0,6 (8)	214,75 $\pm$ 45,45

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3.  $p < 0,05$ .

## 4.7 Hemograma

A análise hematológica não mostrou diferença entre os grupos experimentais. Apenas um animal do grupo nFe 0,3 apresentou contagem de eosinófilos elevada, indicando possível infecção, presença de parasitas ou processo alérgico (Tabela 11).

Tabela 11: Hemograma dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

	Valores de normalidade	Controle (9)	nFe 0,3 (7)	nFe 0,6 (8)
Neutrófilos Segmentados	24,6 $\pm$ 8,38	33,22 $\pm$ 4,33	43,71 $\pm$ 4,82	37,12 $\pm$ 7,01
Linfócitos	70,4 $\pm$ 8,29	65,22 $\pm$ 4,02	54,14 $\pm$ 4,97	63,37 $\pm$ 6,80
Eosinófilos	1,0 $\pm$ 0,71	1	8	0
Bastonetes	*	3	4	0
Monócitos	3,8 $\pm$ 2,77	13	3	11

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05. \* Valores de normalidade não encontrado (CUBAS, SILVA, CATALÃO-DIAS, 2007 (Ed))

#### 4.8 Análise biométrica do osso

Após a eutanásia dos animais, os ossos foram dissecados e congelados em solução salina 0,9% a -20°C. Antes das análises os ossos foram descongelados e medidos com o auxílio de um paquímetro. No fêmur direito foi obtido o comprimento, diâmetro maior e diâmetro menor (Figura 10). A altura do corpo da vértebra da quinta vértebra lombar (L<sub>5</sub>) foi mensurada (Figura 10).

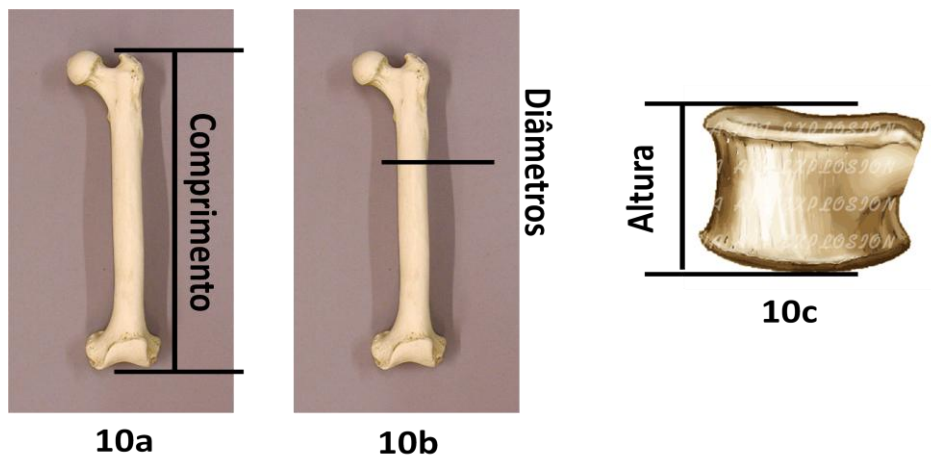


Figura 10: Medidas do comprimento, diâmetro maior e menor do fêmur e altura da vértebra. 10a – Comprimento do fêmur, do trocanter maior até o côndilo lateral; 10b – Diâmetro maior e menor abaixo da linha intertrocantérica; 10c – Altura do corpo vértebrala no sentido crânio-caudal.

Os comprimentos, diâmetro maior, diâmetro menor dos fêmures e as alturas das vértebras foram semelhantes nos três grupos experimentais (Tabela 12).

Tabela 12: Parâmetros biométricos dos ossos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

	Controle (9)	nFe 0,3 (8)	nFe 0,6 (8)
Comprimento (cm)	3,88 $\pm$ 0,06	3,65 $\pm$ 0,17	3,62 $\pm$ 0,13
Diâmetro Maior (cm)	0,49 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,03
Diâmetro Menor (cm)	0,32 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01
Altura (cm)	0,66 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,02

(n) = número de animais.

#### 4.9 Parâmetros biomecânicos

Para o fêmur foi utilizado o teste de flexão a três pontos e na vértebra foi realizado o teste de compressão (2/3 da altura).

Os ensaios foram realizados e analisados em um software específico que fornece os valores de força máxima, deslocamento até a força máxima, força de fratura, deslocamento até a força de fratura, resiliência, tenacidade e rigidez para o ensaio de flexão a três pontos e para o ensaio de compressão apenas a força máxima.

Analisando os parâmetros obtidos nos ensaios, observamos que os parâmetros analisados foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais (Tabela 13).

Tabela 13: Parâmetros biomecânicos dos ossos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

	Controle (9)	nFe 0,3 (8)	nFe 0,6 (8)
Força Máx (N)	123,4 $\pm$ 2,73	122,4 $\pm$ 4,86	120,0 $\pm$ 2,19
$\Delta$ S Força Máx (cm)	0,70 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,03	0,84 $\pm$ 0,05
Força Rupt (N)	106,5 $\pm$ 5,12	111,2 $\pm$ 5,42	103,8 $\pm$ 6,29
$\Delta$ S Força Rupt (cm)	0,99 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,16	1,13 $\pm$ 0,05
Resiliência (J)	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01
Tenacidade (J)	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
Rigidez (N/mm)	260,2 $\pm$ 5,63	242,1 $\pm$ 10,84	245,2 $\pm$ 9,10
$\angle$ Força Máx (N)	178,3 $\pm$ 11,20	177,6 $\pm$ 21,79	170,9 $\pm$ 8,93

FD = Fêmur Direito; L<sub>5</sub> = Quinta vértebra Lombar; Força Máx = Força Máxima;  $\Delta$ S Força Máx = Deslocamento até a força máxima; Força Rupt = Força de Ruptura;  $\Delta$ S Força Rupt = Deslocamento até a força de ruptura. (n) = número de animais.

#### 4.10 Parâmetros Físicos

Os parâmetros físicos analisados foram: peso úmido, peso imerso, peso seco, peso material mineral, volume ósseo, densidade óssea, densidade mineral e os percentuais de água, material mineral e material orgânico. Os parâmetros analisados dos fêmures (Tabela 14) e vértebras (Tabela 15) foram semelhantes nos três grupos experimentais.

Tabela 14: Parâmetros biofísicos dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

	Controle (9)	nFe 0,3 (8)	nFe 0,6 (8)
Peso úmido (g)	0,93 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,02
Peso imerso (g)	0,33 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01
Peso seco (g)	0,58 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,01
Peso mineral (g)	0,40 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01
Volume (cm <sup>3</sup> )	0,60 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01
D. Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	1,57 $\pm$ 0,03	1,54 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,01
D. Mineral (g/cm <sup>3</sup> )	0,68 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,01
% H <sub>2</sub> O	36,70 $\pm$ 1,81	38,67 $\pm$ 0,68	38,75 $\pm$ 0,69
% Mat. Mineral	20,16 $\pm$ 0,50	19,75 $\pm$ 0,55	20,32 $\pm$ 0,54
% Mat. Orgânico	43,14 $\pm$ 1,38	41,58 $\pm$ 1,38	40,93 $\pm$ 1,38

D. Óssea = Densidade Óssea; D. Mineral = Densidade Mineral; % H<sub>2</sub>O = Percentual de água; % Mat. Mineral = Percentual de Material Mineral; % Mat. Orgânico = Percentual de Material Orgânico. (n) = número de animais

Tabela 15: Parâmetros biofísicos das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

	Controle (9)	nFe 0,3 (8)	nFe 0,6 (8)
Peso úmido (g)	0,104 $\pm$ 0,006	0,109 $\pm$ 0,003	0,104 $\pm$ 0,009
Peso imerso (g)	0,031 $\pm$ 0,002	0,033 $\pm$ 0,003	0,032 $\pm$ 0,001
Peso seco (g)	0,053 $\pm$ 0,003	0,054 $\pm$ 0,005	0,053 $\pm$ 0,002
Peso mineral (g)	0,035 $\pm$ 0,002	0,034 $\pm$ 0,003	0,034 $\pm$ 0,001
Volume (cm <sup>3</sup> )	0,073 $\pm$ 0,005	0,076 $\pm$ 0,005	0,073 $\pm$ 0,003
D. Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	1,42 $\pm$ 0,013	1,42 $\pm$ 0,013	1,43 $\pm$ 0,012
D. Mineral (g/cm <sup>3</sup> )	0,48 $\pm$ 0,017	0,44 $\pm$ 0,017	0,47 $\pm$ 0,020
% H <sub>2</sub> O	48,62 $\pm$ 1,30	50,92 $\pm$ 1,88	48,82 $\pm$ 1,78
% Mat. Mineral	17,64 $\pm$ 0,44	18,08 $\pm$ 1,66	18,32 $\pm$ 0,95
% Mat. Orgânico	33,74 $\pm$ 0,95	31,00 $\pm$ 1,15	32,86 $\pm$ 1,19

D. Óssea = Densidade Óssea; D. Mineral = Densidade Mineral; % H<sub>2</sub>O = Percentual de água; % Mat. Mineral = Percentual de Material Mineral; % Mat. Orgânico = Percentual de Material Orgânico. (n) = número de animais.

## 5 DISCUSSÃO

As NPs não são invenções do homem, pois as NPs podem ser encontradas naturalmente em eventos como erupções, em águas, solos, sedimentos e mesmo no ar que respiramos. Por exemplo, podem-se encontrar partículas de minerais argilosos e oxihidróxi de ferro em solos e águas naturais. Porém a preocupação está na possível influência da poluição sobre essas nanopartículas naturais (HANDY, OWEN, VALSAMI-JONES, 2008). Não existem normas específicas para o descarte de NPs produzidas e sua produção e utilização é cada vez maior. Portanto, a nanotoxicologia é uma área de estudo crescente e de grande importância.

Um estudo mostrou que nanopartículas de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) inaladas se instalam uniformemente em cultura de células epiteliais alveolares, independentemente da orientação espacial dos alvéolos, enquanto que partículas maiores formam “hot spots” e se depositam de acordo com a gravidade (OBERDORSTER, 2010). Este mesmo estudo mostrou que a biodistribuição das nanopartículas é dependente da forma de introdução no corpo. Usando a inalação e injeção intravenosa de NPs de ouro (5nm), observou-se que as NPs injetadas intravenosamente eram retidas no fígado e quando inaladas, a maioria das NPs ficavam retidas na medula óssea.

As nanopartículas de óxido de ferro podem ser encontradas em líquidos de contraste, utilizados para tratamentos de câncer, em cosméticos e etc. Contudo, as nanopartículas de óxido de ferro podem causar alguns efeitos citotóxicos, tais como produção de espécies reativas ao oxigênio, liberação de íons de ferro tóxico, distúrbios de transporte de elétrons e/ou íons e das atividades da membrana das células (NEL *et al.*, 2009).

Neste trabalho, a escolha das doses de nanopartículas de óxido de ferro magnético foi baseada no trabalho de Lutz *et al.* (2006), onde os autores injetaram na veia caudal uma solução de nanopartículas com 0,6 mg Fe/kg MC (diâmetros entre 10 e 30 nm) em 500 µL de solução de NaCl 0,9% para utilizar como líquido de



contraste para ressonância magnética. Essa concentração foi eficiente como líquido de contraste e algumas horas após a injeção, não havia acúmulo no fígado.

Não existem trabalhos *in vivo* com tratamento crônico utilizando nanopartículas de óxido de ferro magnético. Na literatura podemos encontrar trabalhos *in vivo* com tratamentos agudos e trabalhos *in vitro*. Por isso o objetivo deste trabalho é de grande importância para melhor compreender a interação crônica de nanopartículas com o organismo. Este é o primeiro trabalho sugerindo tratamento crônico em animais, onde as NPs de óxido de ferro foram administradas oralmente através de gavagem gástrica, durante 5 cinco dias por semana durante 8 oito semanas, simulando uma possível ingestão diária de NPs..

A síntese das nanopartículas de óxido de ferro magnético deste trabalho gerou NPs metálicas de aproximadamente 5,5 nm de diâmetros. Estudos com partículas de poluição dispersas no ar mostraram que as nanopartículas possuem duas características diferentes de partículas maiores que promovem toxicidade. Primeiro, a atividade de superfície é importante para determinar a toxicidade, pois em uma mesma massa de material, quanto menor a partícula for maior a superfície de contato, e quanto maior a partícula, menor a superfície de contato; segundo, partículas com dezenas de nanômetros podem ultrapassar a membrana celular (SEATON,DONALDSON, 2005).

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos das NPs de óxido de ferro sobre o crescimento dos animais, já que as NPs produzidas e utilizadas neste trabalho são suficientemente pequenas para ultrapassar a membrana celular e podem causar danos aos tecidos. Para avaliar o crescimento, os animais foram pesados semanalmente durante todo o tratamento.

Durante a primeira semana podemos observar uma perda de massa corporal (MC) em todos os animais, isso provavelmente se deve ao estresse de adaptação à gaiola metabólica, pois antes do tratamento os animais eram mantidos em gaiolas coletivas. Ao final do tratamento observamos que o grupo que recebeu a maior dose de NPs (nFe 0,6), diferentemente dos animais dos outros grupos, não apresentaram ganho de massa corporal até a sexta semana, perdendo massa após a sétima semana de tratamento (Figura 5).

A diminuição da massa corporal do grupo nFe 0,6 não foi devido à diminuição do consumo de ração e água (Tabela 2 e 3), pois o consumo não foi diferente dos animais do grupo controle, além disso a excreção de fezes desses animais não foi diferente dos animais controle e a excreção de urina foi menor em relação ao grupo controle (Tabela 4 e 5).

Já o pequeno aumento da massa corporal dos animais do grupo nFe 0,3 em relação ao grupo controle, provavelmente se deve ao aumento do consumo de ração, apesar do consumo de água ser menor (Tabela 2 e 3). Porém não se pode afirmar que o aumento se deve ao consumo alimentar, pois a excreção de fezes também foi maior no grupo nFe 0,3 em relação ao grupo controle e a quantidade de urina foi semelhante (Tabela 4 e 5).

A utilização de NPs de óxido de ferro magnético (aproximadamente 10 nm) em cultura de células de músculo liso não causou efeitos inflamatórios, porém diminui a viabilidade dessas células (ZHANG *et al.*, 2009). Durante todo o período de experimento, não foi observado nenhuma característica incomum das fezes dos animais tratados com NPs, possivelmente as nanopartículas não causaram efeitos danosos à mucosa intestinal dos animais.

Administração de sais de ferro em crianças anêmicas provocou aumento da massa corpórea (AUKETT *et al.*, 1986; POULTON, 1987). Este efeito não foi observado nos animais do presente trabalho, provavelmente devido à diferença do tamanho das partículas (sais de ferro e NPs) e às diferentes reações do corpo em diferentes fases do crescimento e condições de saúde (anemia).

Um trabalho de revisão mostrou possíveis rotas de NPs em diferentes formas de administração, dentre elas a ingestão (água e alimentos). A ingestão de NPs permite a absorção pelo trato gastrointestinal, podendo ser eliminada pelas fezes ou circular na linfa e sangue, onde são distribuídas para os diferentes órgãos, tais como fígado, rim, baço, sistema nervoso central, medula óssea, músculo e coração. Após a passagem pelo fígado, as NPs podem retornar ao trato gastrointestinal e serem eliminadas pelas fezes; do rim podem ser eliminadas na urina (Figura11) (OBERDORSTER, OBERDORSTER, OBERDORSTER, 2005). As rotas propostas por estes autores não consideram quantitativa nem qualitativamente os efeitos das NPs.

O tratamento com nanopartículas de óxido de ferro magnético não alterou o hemograma dos animais dos diferentes grupos. Além disso, a análise bioquímica do sangue mostrou que as NPs não alteraram os níveis de glicose e ferro, porém os animais do grupo nFe 0,6 apresentaram elevada taxa de colesterol (Tabela 7).

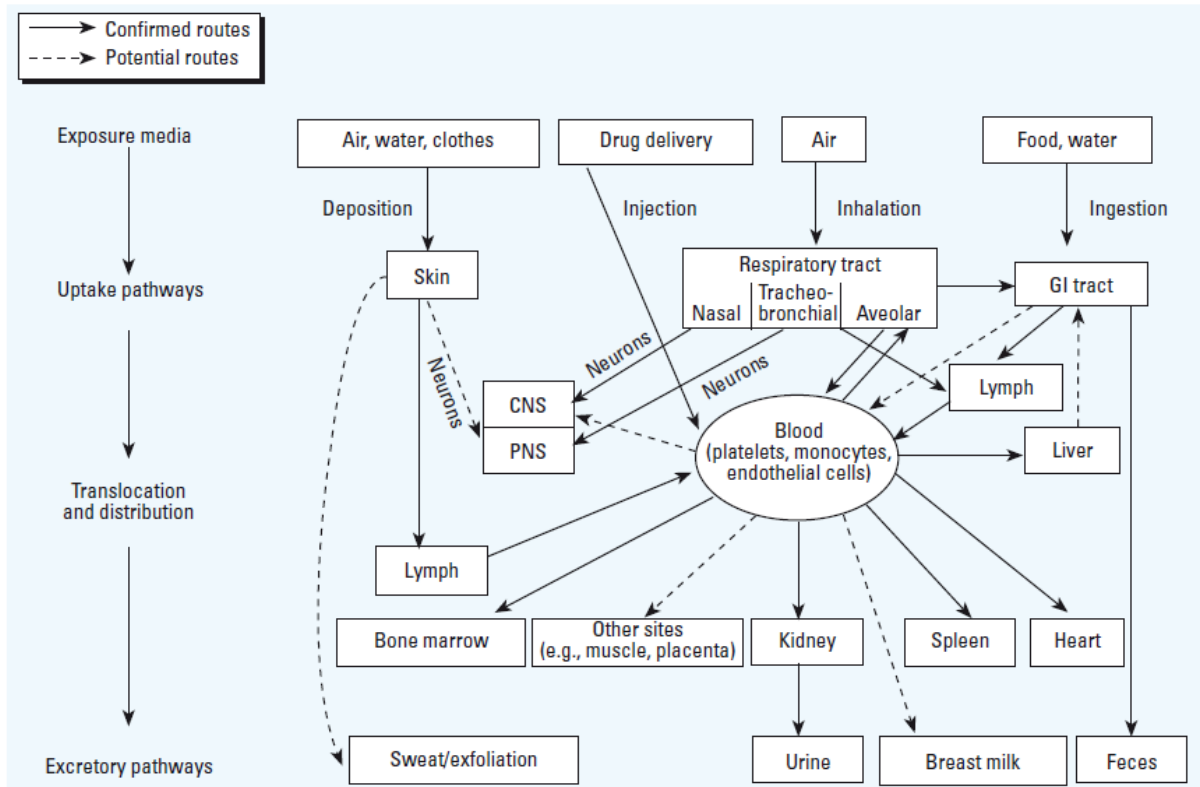


Figura 11: Esquema proposto por OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER (2005). Biocinética de nanopartículas.

Segundo Shubayev, Pisanic e Jin (2009), nanopartículas menores que 10 nm são rapidamente removidos pelo clearance renal. Acredita-se que NPs entre 10 e 100 nm seja o tamanho ideal para administrações intravenosas. Além disso, a biodistribuição das partículas injetadas intravenosamente é de 80 a 90% no fígado, 5 a 8% no baço e 1 a 2% na medula óssea. Dependendo da forma de exposição, as superfícies das NPs podem interagir com os componentes da matriz extracelular e membranas das células de macrófagos, células endoteliais, epitélio e trato

respiratório e gastrointestinal, além do acúmulo no encéfalo, fígado, baço e pulmões, este quando inalados.

As NPs passam pela membrana basal, pois essa membrana limita a passagem de materiais maiores que 13 a 15 nm de diâmetro. Além disso, tecidos como o fígado, permitem a passagem de materiais com tamanho acima de 100 nm (GARNETT, KALLINTERI, 2006).

Sendo assim, as nanopartículas utilizadas neste trabalho, atravessaram a membrana basal das células, pois o diâmetro médio das NPs utilizadas foi de 5,5 nm. Não foi observado efeito tóxico das nanopartículas no fígado, pois os níveis de AST, ALT e fosfatase alcalina foram semelhantes aos dos animais do grupo controle (Tabela 9 e 10). O mesmo ocorre nos rins, pois as concentrações séricas de uréia e creatinina não estavam alteradas (Tabela 8). Porém não podemos afirmar se houve acúmulo no tecido hepático e renal, uma vez que não foi possível analisar a presença das NPs nestes tecidos.

Trabalhos utilizando nanopartículas de cobre (CuNPs) mostraram que essas NPs causaram efeitos deletérios principalmente no fígado, rim e baço, quando administrados em doses altas. Em um estudo comparativo da toxicidade de íons de cobre (0,072nm), CuNPs (23,5nm) e micropartículas de cobre (17µm) em camundongos, foram analisados a morfologia e histopatologia dos pulmões, fígado, rins, coração, baço, encéfalo, testículos (machos) e ovários (fêmeas), e bioquímica sanguínea (ácido biliar total, fosfatase alcalina, uréia e creatinina. A administração da dose letal para 50% da população (LD<sub>50</sub> – 110mg/kg MC, 413mg/kg MC e 5000mg/kg MC, respectivamente) via gavagem gástrica, promoveu alto nível de toxicidade pelos íons e NPs, e as micropartículas não foram tóxicas para o fígado, rim e baço (CHEN *et al.*, 2006).

A análise bioquímica sanguínea (enzimas hepáticas, fosfatase alcalina, proteínas totais, colesterol total, triglicérides, bilirrubina total, ureia e creatinina) e histopatológica do fígado e rim de ratos tratados com CuNPs (25nm) mostrou que a administração oral durante 5 dias na dose de 50mg/kg.dia em ratos provoca lesão hepática e renal (LEI *et al.*, 2008).

Neste trabalho observamos que os animais do grupo nFe 0,6 apresentou perda de MC, apesar da ingestão de ração ser semelhante à ingesta dos animais do grupo controle. Provavelmente a taxa metabólica dos animais esta aumentada, isto é, gasto energético maior. Este aumento poderia ser devido à alteração na fisiologia da tireóide, das adrenais ou da hipófise anterior na secreção de GH.

A demanda energética pode ser suprida pela lipólise, o que poderia acarretar no aumento dos níveis séricos de colesterol como foi observado nestes animais. O aumento do colesterol não afetou o fígado, pois os níveis de AST, ALT e fosfatase alcalina não foram alteradas.

Além de aumentar o gasto energético, a utilização de NPs de óxido de ferro magnético provavelmente compromete a produção de testosterona pelas Células de Leydig (por ação direta ou via gonadotrofinas) ou influencia os receptores deste hormônio nos órgãos sexuais acessórios.

A análise do peso das glândulas seminais e próstatas ventrais dos animais do grupo nFe 0,6 apresentaram atrofia em relação aos órgãos dos animais dos outros grupos (Tabela 6). As glândulas seminais e as próstatas ventrais são órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino e a testosterona é responsável pelo trofismo destes órgãos. Infelizmente, não foi possível dosar a concentração de testosterona sérica dos animais por problemas técnicos.

A utilização de nanopartículas de óxido de ferro magnético pode alterar os níveis de testosterona ou de seus receptores, podendo com isso influenciar a formação e maturação dos espermatozóides. Porém, um estudo utilizando NPs de óxido de ferro (5nm) na concentração de 7,35 mM de íons de ferro mostrou que essas NPs não comprometeram a motilidade nem a reação acrossomal de espermatozóides de bovinos (MAKHLUF *et al.*, 2006).

Apesar de nanopartículas de ouro (9nm) na concentração de 44 ppm, apenas 75% da população analisada mantiveram sua motilidade, sendo que no grupo controle 95% dos espermatozóides mantiveram a motilidade (WIWANITKIT, SEREEMASPUN,ROJANATHANES, 2009).

Pesquisadores mostraram que o ferro gerado das NPs de óxido de ferro superparamagnético podem ativar vias de sinalização responsáveis pela migração

celular e conseqüentemente inibir a osteogênese em células tronco mesenquimais humanas, sugerindo cuidado ao utilizar essas NPs para marcar a osteogênese para estudos com ressonância magnética (CHEN, Y. C. *et al.*, 2010).

Neste trabalho não foi observado efeitos da inibição da osteogênese, pois os parâmetros biométricos, biomecânicos e biofísicos dos ossos (fêmur e vértebra) não foram diferentes entre os animais dos grupos experimentais.

A Força Máxima, que corresponde a carga máxima suportada pelo osso, apresentada pelos fêmures e vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas. O mesmo ocorre com a resiliência (energia suportada pelo osso durante a fase elástica), tenacidade (energia suportada pelo osso durante o ensaio até o momento da fratura) e a rigidez (capacidade do osso resistir a deformação) (Tabela 13). Esses parâmetros biomecânicos são referências para analisar a qualidade óssea em relação a forças mecânicas. As nanopartículas não alteraram nenhum dos parâmetros analisados, indicando ausência da influência sobre esses parâmetros, quando comparados entre os grupos tratados com o grupo controle.

A análise das propriedades biofísicas dos ossos não mostrou diferença significativa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle, indicando uma não influência das nanopartículas sobre a manutenção do tecido ósseo (Tabelas 14 e 15).

Em ratas pós-menopausadas (57 semanas) a sobrecarga de ferro na alimentação (50g/kg de ração) durante 4 semanas causa estresse oxidativo, o qual está relacionado com patologias ósseas, como a osteoporose (ISOMURA *et al.*, 2004) Kudo *et al.* (2008) tratou ratos Wistar machos com 6 meses de idade com sobrecarga de ferro (40 mg/dia) e observou que a quantidade de ferro aumenta os efeitos da osteoporose com disfunção renal e hepática. Pelo fato da dose utilizada ser menor que a descrita na literatura (ISOMURA *et al.*, 2004; KUDO *et al.*, 2008), pode-se dizer que a ausência de diferença nos resultados das análises biométricas, biomecânicas e biofísicas já era esperado. Além disso, os animais já eram adultos jovens, ou seja, o crescimento dos ossos desses animais está menos acentuada, apesar do constante remodelamento.

## 6 CONCLUSÕES

O tratamento de ratos durante 8 semanas, 5 vezes por semana, com nanopartículas de óxido de ferro magnético com 5,5 nm de diâmetro, na concentração de 0,6 mg/kg MC promoveu a redução da MC dos animais e aumentou as concentrações séricas de colesterol e atrofiou as glândulas seminais e das próstatas ventrais. Não foi observado alterações nos parâmetros físicos e biomecânicos do tecido ósseo e na maioria dos parâmetros bioquímicos analisados.

Nanopartículas de óxido de ferro magnético administrados em menor concentração, 0,3 mg/kg MC, não promoveram alterações dos parâmetros analisados.

O tratamento crônico por 8 semanas com nanopartículas de óxido de ferro magnético em pequenas quantidades não seria prejudicial à saúde, porém em maiores concentrações, há a possibilidade de efeitos prejudiciais.

## LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Este foi o primeiro trabalho do Laboratório de Neuroendocrinologia com este tema, por isso enfrentamos algumas dificuldades em relação à dosagem às análises. Uma das maiores dificuldades foi a quantificação de nanopartículas de óxido de ferro magnético em vários materiais, pois sem essa análise, não foi possível determinar a quantidade de NPs que foi eliminado ou retido no organismo. Além disso, não foi coletado soro suficiente para realizar outras análises bioquímicas, tais como quantificação de testosterona, ferritina, entre outras.

Por este trabalho ser o primeiro do gênero no laboratório, tivemos muitas dificuldades, porém, possibilita novas pesquisas em relação à nanotoxicidade, além de novas colaborações.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTER, M. P.,IWANIEC, U. T.,HAYNATZKI, G. R.,FUNG, Y. K.,CULLEN, D. M.,RECKER, R. R. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **J Orthop Res**, v. 21, n. 1, p. 14-9, Jan 2003.

AKHTER, M. P.,WELLS, D. J.,SHORT, S. J.,CULLEN, D. M.,JOHNSON, M. L.,HAYNATZKI, G. R.,BABIJ, P.,ALLEN, K. M.,YAWORSKY, P. J.,BEX, F.,RECKER, R. R. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162-9, Jul 2004.

AUKETT, M. A.,PARKS, Y. A.,SCOTT, P. H.,WHARTON, B. A. Treatment with iron increases weight gain and psychomotor development. **Arch Dis Child**, v. 61, n. 9, p. 849-57, Sep 1986.

BALBUS, J. M.,MAYNARD, A. D.,COLVIN, V. L.,CASTRANOVA, V.,DASTON, G. P.,DENISON, R. A.,DREHER, K. L.,GOERING, P. L.,GOLDBERG, A. M.,KULINOWSKI, K. M.,MONTEIRO-RIVIERE, N. A.,OBERDORSTER, G.,OMENN, G. S.,PINKERTON, K. E.,RAMOS, K. S.,REST, K. M.,SASS, J. B.,SILBERGELD, E. K.,WONG, B. A. Meeting report: hazard assessment for nanoparticles--report from an interdisciplinary workshop. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 11, p. 1654-9, Nov 2007.

BAUMINGER, E.,OFER, S.,GEDALIA, I.,HOROWITZ, G.,MAYER, I. Iron uptake by teeth and bones: a Mossbauer effect study. **Calcif Tissue Int**, v. 37, n. 4, p. 386-9, Jul 1985.

BHATTACHARYA, R.,MUKHERJEE, P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 11, p. 1289-306, Aug 17 2008.



BRUST, M.,WALKER, M.,BETHELL, D.,SCHIFFRIN, D. J.,WHYMAN, R. Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, n. 7, p. 801-802, Apr 7 1994.

CASTANEDA, L.,VALLE, J.,YANG, N.,PLUSKAT, S.,SLOWINSKA, K. Collagen cross-linking with Au nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 12, p. 3383-8, Dec 2008.

CHEN, Y. C.,HSIAO, J. K.,LIU, H. M.,LAI, I. Y.,YAO, M.,HSU, S. C.,KO, B. S.,YANG, C. S.,HUANG, D. M. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 245, n. 2, p. 272-9, Jun 1 2010.

CHEN, Y. J.,TAO, J.,XIONG, F.,ZHU, J. B.,GU, N.,GENG, K. K. Characterization and in vitro cellular uptake of PEG coated iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent. **Pharmazie**, v. 65, n. 7, p. 481-6, Jul 2010.

CHEN, Z.,MENG, H.,XING, G.,CHEN, C.,ZHAO, Y.,JIA, G.,WANG, T.,YUAN, H.,YE, C.,ZHAO, F.,CHAI, Z.,ZHU, C.,FANG, X.,MA, B.,WAN, L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicol Lett**, v. 163, n. 2, p. 109-20, May 25 2006.

CLIFT, M. J.,GEHR, P.,ROTHEN-RUTISHAUSER, B. Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative. **Arch Toxicol**, May 25 2010.

CUBAS, Z. S.,SILVA, J. C. R.,CATALÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007 (Ed).

DUAN, C. F.,YU, Y. Q.,CUI, H. Gold nanoparticle-based immunoassay by using non-stripping chemiluminescence detection. **Analyst**, v. 133, n. 9, p. 1250-5, Sep 2008.

EL-ANSARY, A.,AL-DAIHAN, S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. **J Toxicol**, v. 2009, p. 754810, 2009.

ENGESAETER, L. B.,EKELAND, A.,LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop Scand**, v. 49, n. 6, p. 512-8, Dec 1978.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Journal of Microelectromechanical System**, v. 1, n. 1, p. 60-66, March/1992 1992.

FISCHER, H. C.,CHAN, W. C. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 6, p. 565-71, Dec 2007.

GANNON, C. J.,PATRA, C. R.,BHATTACHARYA, R.,MUKHERJEE, P.,CURLEY, S. A. Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells. **J Nanobiotechnology**, v. 6, p. 2, 2008.

GARNETT, M. C.,KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. **Occup Med (Lond)**, v. 56, n. 5, p. 307-11, Aug 2006.

GUIMARAES, R.,CLEMENT, O.,BITTOUN, J.,CARNOT, F.,FRIJA, G. MR lymphography with superparamagnetic iron nanoparticles in rats: pathologic basis for contrast enhancement. **AJR Am J Roentgenol**, v. 162, n. 1, p. 201-7, Jan 1994.

HANDY, R. D.,OWEN, R.,VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 315-25, Jul 2008.

HAYNES, C. L. The emerging field of nanotoxicology. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 2, p. 587-8, Sep 2010.

IIDA, H.,TAKAYANAGI, K.,NAKANISHI, T.,OSAKA, T. Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. **J Colloid Interface Sci**, v. 314, n. 1, p. 274-80, Oct 1 2007.

IKEDA, S.,TSURUKAMI, H.,ITO, M.,SAKAI, A.,SAKATA, T.,NISHIDA, S.,TAKEDA, S.,SHIRAISHI, A.,NAKAMURA, T. Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats. **Bone**, v. 28, n. 6, p. 625-33, Jun 2001.

ISOMURA, H.,FUJIE, K.,SHIBATA, K.,INOUE, N.,IIZUKA, T.,TAKEBE, G.,TAKAHASHI, K.,NISHIHIRA, J.,IZUMI, H.,SAKAMOTO, W. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. **Toxicology**, v. 197, n. 2, p. 93-100, Apr 15 2004.

JING, X. H.,YANG, L.,DUAN, X. J.,XIE, B.,CHEN, W.,LI, Z.,TAN, H. B. In vivo MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection. **Joint Bone Spine**, v. 75, n. 4, p. 432-8, Jul 2008.

KATSUMATA, T.,NAKAMURA, T.,OHNISHI, H.,SAKURAMA, T. Intermittent cyclical etidronate treatment maintains the mass, structure and the mechanical property of bone in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v. 10, n. 6, p. 921-31, Jun 1995.

KEENAN, M. J.,HEGSTED, M.,JONES, K. L.,DELANY, J. P.,KIME, J. C.,MELANCON, L. E.,TULLEY, R. T.,HONG, K. D. Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle. **J Bone Miner Res**, v. 12, n. 11, p. 1903-7, Nov 1997.

KUDO, H.,SUZUKI, S.,WATANABE, A.,KIKUCHI, H.,SASSA, S.,SAKAMOTO, S. Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. **Toxicology**, v. 246, n. 2-3, p. 143-7, Apr 18 2008.

LEI, R.,WU, C.,YANG, B.,MA, H.,SHI, C.,WANG, Q.,YUAN, Y.,LIAO, M. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 232, n. 2, p. 292-301, Oct 15 2008.

LUTZ, J. F.,STILLER, S.,HOTH, A.,KAUFNER, L.,PISON, U.,CARTIER, R. One-pot synthesis of pegylated ultrasmall iron-oxide nanoparticles and their in vivo evaluation as magnetic resonance imaging contrast agents. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3132-8, Nov 2006.

MAHMOUDI, M.,SIMCHI, A.,MILANI, A. S.,STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **J Colloid Interface Sci**, v. 336, n. 2, p. 510-8, Aug 15 2009.

MAIER-HAUFF, K.,ULRICH, F.,NESTLER, D.,NIEHOFF, H.,WUST, P.,THIESEN, B.,ORAWA, H.,BUDACH, V.,JORDAN, A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. **J Neurooncol**, 2010/09/16 2010.

MAKHLUF, S. B. D.,QASEM, R.,RUBINSTEIN, S.,GEDANKEN, A.,BREITBART, H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. **Langmuir**, v. 22, n. 23, p. 9480-9482, Nov 7 2006.

MARQUIS, B. J.,LOVE, S. A.,BRAUN, K. L.,HAYNES, C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. **Analyst**, v. 134, n. 3, p. 425-39, Mar 2009.

MONTET-ABOU, K.,DAIRE, J. L.,HYACINTHE, J. N.,JORGE-COSTA, M.,GROSDÉMANGE, K.,MACH, F.,PETRI-FINK, A.,HOFMANN, H.,MOREL, D. R.,VALLEE, J. P.,MONTET, X. In vivo labelling of resting monocytes in the reticuloendothelial system with fluorescent iron oxide nanoparticles prior to injury reveals that they are mobilized to infarcted myocardium. **Eur Heart J**, v. 31, n. 11, p. 1410-20, Jun 2010.

MOSEKILDE, L.,DANIELSEN, C. C.,KNUDSEN, U. B. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. **Bone**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 1993.

NANOTECHNOLOGIES, T. P. O. E. The Project on Emerging Nanotechnologies. 2009. Disponível em: <  
[http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis\\_draft/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/)>. Acesso em: 22 de outubro.

NEL, A.,XIA, T.,MADLER, L.,LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-7, Feb 3 2006.

NEL, A. E.,MADLER, L.,VELEGOL, D.,XIA, T.,HOEK, E. M.,SOMASUNDARAN, P.,KLAESSIG, F.,CASTRANOVA, V.,THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nat Mater**, v. 8, n. 7, p. 543-57, Jul 2009.

OBERDORSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J Intern Med**, v. 267, n. 1, p. 89-105, Jan 2010.

OBERDORSTER, G.,OBERDORSTER, E.,OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 7, p. 823-39, Jul 2005.

PENG, Z.,TUUKKANEN, J.,ZHANG, H.,JAMSA, T.,VAANANEN, H. K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-32, Sep-Oct 1994.

PISANIC, T. R., 2ND,BLACKWELL, J. D.,SHUBAYEV, V. I.,FINONES, R. R.,JIN, S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. **Biomaterials**, v. 28, n. 16, p. 2572-81, Jun 2007.

PODSIADLO, P.,SINANI, V. A.,BAHNG, J. H.,KAM, N. W.,LEE, J.,KOTOV, N. A. Gold nanoparticles enhance the anti-leukemia action of a 6-mercaptopurine chemotherapeutic agent. **Langmuir**, v. 24, n. 2, p. 568-74, Jan 15 2008.

POMA, A.,DI GIORGIO, M. L. Toxicogenomics to improve comprehension of the mechanisms underlying responses of in vitro and in vivo systems to nanomaterials: a review. **Curr Genomics**, v. 9, n. 8, p. 571-85, Dec 2008.

POULTON, J. Treatment with iron increases weight gain and psychomotor development. **Arch Dis Child**, v. 62, n. 2, p. 213, Feb 1987.

ROBBENS, J.,VANPARYS, C.,NOBELS, I.,BLUST, R.,VAN HOECKE, K.,JANSSEN, C.,DE SCHAMPHELAERE, K.,ROLAND, K.,BLANCHARD, G.,SILVESTRE, F.,GILLARDIN, V.,KESTEMONT, P.,ANTHONISSEN, R.,TOUSSAINT, O.,VANKONINGSLOO, S.,SAOUT, C.,ALFARO-MORENO, E.,HOET, P.,GONZALEZ, L.,DUBRUEL, P.,TROISFONTAINES, P. Eco-, geno- and human toxicology of bio-active nanoparticles for biomedical applications. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 170-81, Mar 10 2009.

ROBLING, A. G.,TURNER, C. H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562-9, Nov 2002.

ROZHKOVA, E. A.,ULASOV, I.,LAI, B.,DIMITRIJEVIC, N. M.,LESNIAK, M. S.,RAJH, T. A high-performance nanobio photocatalyst for targeted brain cancer therapy. **Nano Lett**, v. 9, n. 9, p. 3337-42, Sep 2009.

SCHROEDER, U.,SOMMERFELD, P.,ULRICH, S.,SABEL, B. A. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **J Pharm Sci**, v. 87, n. 11, p. 1305-7, Nov 1998.

SEATON, A.,DONALDSON, K. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. **Lancet**, v. 365, n. 9463, p. 923-4, Mar 12-18 2005.

SHIMIZU, K., ITO, A., YOSHIDA, T., YAMADA, Y., UEDA, M., HONDA, H. Bone tissue engineering with human mesenchymal stem cell sheets constructed using magnetite nanoparticles and magnetic force. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 82, n. 2, p. 471-80, Aug 2007.

SHUBAYEV, V. I., PISANIC, T. R., II, JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 6, p. 467-77, Jun 21 2009.

SINGH, N. Conference scene - nanotoxicology: health and environmental impacts. **Nanomedicine (Lond)**, v. 4, n. 4, p. 385-90, Jun 2009.

SNIADECKI, N. J. A tiny touch: activation of cell signaling pathways with magnetic nanoparticles. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 451-7, Feb 2010.

SOGAARD, C. H., MOSEKILDE, L., THOMSEN, J. S., RICHARDS, A., MCOSKER, J. E. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, n. 5, p. 439-49, May 1997.

STONE, V., JOHNSTON, H., SCHINS, R. P. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. **Crit Rev Toxicol**, v. 39, n. 7, p. 613-26, 2009.

SUH, W. H., SUSLICK, K. S., STUCKY, G. D., SUH, Y. H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Prog Neurobiol**, v. 87, n. 3, p. 133-70, Feb 2009.

TANIGUCHI, N. Nanotechnology. **Journal of the Japan Society of Precision Engineering**, v. 40, n. 471, p. 287-291 %U <http://ci.nii.ac.jp/naid/110001289632/en/>, 1974.

TRAN, N., MIR, A., MALLIK, D., SINHA, A., NAYAR, S., WEBSTER, T. J. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus. **Int J Nanomedicine**, v. 5, p. 277-83, 2010.

VLAD, M. D.,DEL VALLE, L. J.,BARRACO, M.,TORRES, R.,LOPEZ, J.,FERNANDEZ, E. Iron oxide nanoparticles significantly enhances the injectability of apatitic bone cement for vertebroplasty. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 33, n. 21, p. 2290-8, Oct 1 2008.

WIWANITKIT, V.,SEREEMASPUN, A.,ROJANATHANES, R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. **Fertil Steril**, v. 91, n. 1, p. e7-8, Jan 2009.

WU, X.,TAN, Y.,MAO, H.,ZHANG, M. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. **Int J Nanomedicine**, v. 5, p. 385-99, 2010.

ZHANG, S.,CHEN, X.,GU, C.,ZHANG, Y.,XU, J.,BIAN, Z.,YANG, D.,GU, N. The Effect of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles on Smooth Muscle Cells. **Nanoscale Res Lett**, v. 4, n. 1, p. 70-77, Jan 2009.



# ANEXOS

ANEXO A - Massa corporal dos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como MED  $\pm$  EPM.

	Pesagem	Controle (9) (g)	nFe 0,3 (8) (g)	nFe 0,6 (8) (g)
Semana 1	1	357,11 $\pm$ 5,74	361,75 $\pm$ 8,25	363,75 $\pm$ 6,78
	2	330,44 $\pm$ 3,68	332,50 $\pm$ 8,14	334,75 $\pm$ 3,50
Semana 2	3	339,11 $\pm$ 5,58	332,50 $\pm$ 8,11	333,50 $\pm$ 4,78
	4	338,67 $\pm$ 6,75	336,50 $\pm$ 6,61	338,00 $\pm$ 4,00
Semana 3	5	344,22 $\pm$ 7,55	348,75 $\pm$ 5,26	339,00 $\pm$ 6,31
	6	352,44 $\pm$ 7,50	346,00 $\pm$ 8,25	332,50 $\pm$ 10,93
Semana 4	7	350,00 $\pm$ 10,16	352,75 $\pm$ 9,55	332,50 $\pm$ 13,81
	8	352,89 $\pm$ 8,30	355,50 $\pm$ 9,21	335,25 $\pm$ 15,12
Semana 5	9	354,89 $\pm$ 8,17	355,25 $\pm$ 10,64	321,75 $\pm$ 16,47
	10	354,89 $\pm$ 9,37	362,00 $\pm$ 11,08	320,50 $\pm$ 16,78
Semana 6	11	354,22 $\pm$ 8,92	367,50 $\pm$ 10,41	326,25 $\pm$ 15,33 <sup>b</sup>
	12	354,89 $\pm$ 9,31	369,75 $\pm$ 9,19	336,00 $\pm$ 10,12 <sup>b</sup>
Semana 7	13	353,78 $\pm$ 8,58	370,00 $\pm$ 11,34	321,75 $\pm$ 15,78 <sup>a,b</sup>
	14	351,56 $\pm$ 9,62	372,50 $\pm$ 11,02	307,12 $\pm$ 15,15 <sup>a,b</sup>
Semana 8	15	355,56 $\pm$ 11,20	377,25 $\pm$ 10,10	300,50 $\pm$ 16,31 <sup>a,b</sup>
	16	349,78 $\pm$ 10,55	368,00 $\pm$ 9,67	290,75 $\pm$ 15,16 <sup>a,b</sup>
Semana 9	17	348,22 $\pm$ 11,22	364,25 $\pm$ 10,19	301,25 $\pm$ 14,64 <sup>a,b</sup>

(n) = número de animais. a = vs controle, b = vs nFe 0,3. p < 0,05.



ANEXO B – GLICOSE, FERRO, COLESTEROL E FOSFATASE ALCALINA SÉRICA DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.

	Glicose (mg/dL)			Ferro (µg/dL)			Colesterol (mg/dL)			Fosfatase Alcalina (u/L)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	94	72	78	303	211	217	62	69	56	214	154	43
	72	91	75	195	185	305	70	70	66	66	72	87
	79	77	89	161	191	347	65	48	61	87	149	54
	65	101	84	233	158	196	61	75	40	224	491	80
	72	65	84	185	253	144	43	53	43	269	229	59
	84	118	101	166	171	204	48	68	53	210	291	126
	90	81	102	159	235	157	54	73	43	260	176	257
	103	82	108	195	171	166	43	59	53	380	156	330
	107			156			47			235		
n	9	8	8	9	8	8	9	8	8	9	8	8
MEDIA	85,11	85,88	90,13	194,78	196,88	217,00	54,78	64,38	51,88	216,11	214,75	129,50
DESVPAD	14,53	17,04	12,14	47,46	33,44	72,49	10,07	9,86	9,26	94,37	128,55	106,15
EPM	4,84	6,03	4,29	15,82	11,82	25,63	3,36	3,48	3,28	31,46	45,45	37,53
ANOVA	p = 0,76			p = 0,65			p = 0,04			p = 0,21		
Teste t	NÃO SIGNIFICATIVO			NÃO SIGNIFICATIVO			p = 0,066 p = 0,547 p = 0,020			NÃO SIGNIFICATIVO		

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.

ANEXO C – AST, ALT, CREATININA E URÉIA SÉRICA DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.

	AST (u/L)			ALT (u/L)			Creatinina (mg/dL)			Uréia (mg/dL)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	409	187	385	54	38	56	0,5	0,4	0,5	46	35	50
	235	343	186	43	50	64	0,5	0,5	0,6	45	44	40
	412	212	196	50	48	45	0,5	0,4	0,4	34	38	42
	289	199	141	67	56	34	0,4	0,5	0,4	31	75	39
	335	275	163	62	74	42	0,4	0,4	0,5	36	31	28
	331	264	193	61	70	56	0,4	0,4	0,4	39	40	34
	207	373	189	53	62	65	0,4	0,3	0,4	34	50	24
	278	230	313	68	65	77	0,3	0,4	0,4	24	32	31
	204			54			0,4			41		
n	9	8	8	9	8	8	9	8	8	9	8	8
MEDIA	300,00	260,38	220,75	56,89	57,88	54,88	0,42	0,41	0,45	36,67	43,13	36,00
DESVPAD	78,51	67,77	83,48	8,22	12,15	14,02	0,07	0,06	0,08	6,96	14,33	8,40
EPM	26,17	23,96	29,51	2,74	4,29	4,96	0,02	0,02	0,03	2,32	5,07	2,97
ANOVA	p = 0,12			p = 0,87			p = 0,53			p = 0,32		

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.

## ANEXO D – HEMATOLOGIA DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

	Controle					nFe 0,6					nFe 0,3				
	Segm	Linf	Eosi	Bast	Mon	Segm	Linf	Eosi	Bast	Mon	Segm	Linf	Eosi	Bast	Mon
	34	63	1		2										
	17	82		1		23	77								
	32	68				33	67				45	46	6	3	
	23	76		2		38	62				34	64			2
	46	54				29	69			2	45	51	2	1	1
	24	70			6	68	38			4	30	70			
	22	75			5	67	31			2	34	66			
	48	52				21	79				67	33			
	53	47				18	84			3	51	49			
n	9	9				8	8				7	7			
MED	33,2	65,2	1	3	13	37,1	63,4	0	0	11	43,7	54,1	8	4	3
DESVPAD	13,0	12,0				19,8	19,2				12,7	13,2			
EPM	4,33	4,02				7,013	6,81				4,82	4,97			

Segm: Neutrófilos Segmentados, Linf: Linfócitos, Eosi: Eosinófilos, Bast: Bastonetes, Mon: Monócitos

ANEXO E – PESO DAS GLÂNDULAS SEMINAIS E PRÓSTATAS VENTRAIS DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

	GLÂNDULAS SEMINAIS (g)			PROSTATAS VENTRAIS (g)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	0,2545	0,2383	0,3744	0,2995	0,2095	0,3680
	0,3321	0,2928	0,2987	0,3201	0,3144	0,2810
	0,4356	0,3504	0,3154	0,3287	0,3927	0,1658
	0,6105	0,3122	0,2526	0,6379	0,2276	0,3018
	0,4562	0,3036	0,3478	0,5203	0,3162	0,3241
	0,4160	0,1646	0,4096	0,5209	0,1585	0,3746
	0,3323	0,1867	0,5145	0,4770	0,1705	0,5046
	0,5198	0,4432	0,7243	0,5451	0,2730	0,7243
	0,4444			0,4454		
n	9	8	8	9	8	8
MED	0,4224	0,2865	0,4047	0,4550	0,2578	0,3805
DESVPAD	0,1068	0,0901	0,1515	0,1168	0,0809	0,1687
EPM	0,0356	0,0318	0,0536	0,0389	0,0286	0,0596
ANOVA		p = 0,060			p = 0,014	
Teste t						
CONT vs nFe 0,6		0,013			0,001	
CONT vs nFe 0,3		0,782			0,302	
nFe 0,6 vs nFe 0,3		0,079			0,085	

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.

ANEXO F – PESO DAS GLÂNDULAS SEMINAIS E PRÓSTATAS VENTRAIS NORMALIZADAS POR 100g DE MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

	GLÂNDULAS SEMINAIS/100gMC (g)			PRÓSTATAS VENTRIS/100gMC (g)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	0,0860	0,0769	0,0945	0,1012	0,0676	0,0929
	0,0943	0,0915	0,0889	0,0909	0,0983	0,0836
	0,1100	0,1068	0,0956	0,0830	0,1197	0,0502
	0,1573	0,1062	0,0730	0,1644	0,0774	0,0872
	0,1366	0,0949	0,0994	0,1558	0,0988	0,0926
	0,1156	0,0735	0,1138	0,1447	0,0708	0,1041
	0,1093	0,0718	0,1293	0,1569	0,0656	0,1268
	0,1444	0,1252	0,1820	0,1514	0,0771	0,1820
	0,1292			0,1295		
n	9	8	8	9	8	8
MED	0,1203	0,0933	0,1096	0,1309	0,0844	0,1024
DESVPAD	0,0234	0,0189	0,0337	0,0312	0,0192	0,0386
EPM	0,0078	0,0067	0,0119	0,0104	0,0068	0,0136
ANOVA		p = 0,1242			p = 0,0167	
Teste t						
CONT vs nFe 0,6		0,0206			0,0024	
CONT vs nFe 0,3		0,4526			0,1139	
nFe 0,6 vs nFe 0,3		0,2548			0,2563	

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.



ANEXO G – PROPRIEDADES BIOMÉTRICAS DOS FÊMURES E VÉRTEBRAS DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

	FÊMUR									VÉRTEBRA		
	COMPRIMENTO (cm)			DIÂMETRO MAIOR (cm)			DIÂMETRO MENOR			ALTURA (mm)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	3,95	3,05	3,05	0,64	0,58	0,61	0,34	0,37	0,33	6,80	6,40	7,40
	4,05	3,45	3,10	0,65	0,58	0,63	0,33	0,36	0,36	6,50	7,50	6,85
	3,50	3,15	4,25	0,62	0,61	0,58	0,33	0,33	0,35	7,50	7,70	7,25
	3,83	3,70	3,60	0,42	0,63	0,61	0,33	0,34	0,35	7,30	6,20	7,30
	3,86	3,85	3,20	0,42	0,45	0,61	0,31	0,32	0,32	6,45	6,30	6,55
	4,10	3,83	3,96	0,47	0,43	0,44	0,33	0,33	0,33	6,75	6,30	5,75
	3,79	3,95	4,00	0,42	0,43	0,47	0,33	0,31	0,33	6,25	7,00	6,75
	3,95	3,97	4,03	0,42	0,49	0,45	0,29	0,34	0,34	6,35	6,35	6,25
	3,89			0,42			0,30			5,90		
n	9	8	8	9	8	8	9	8	8	9	8	8
MED	3,88	3,62	3,65	0,50	0,52	0,55	0,32	0,33	0,34	6,64	6,72	6,76
DESVPAD	0,17	0,36	0,47	0,11	0,08	0,08	0,02	0,02	0,01	0,51	0,60	0,57
EPM	0,0581	0,1271	0,1680	0,0355	0,0298	0,0285	0,0055	0,0065	0,0050	0,1688	0,2117	0,2015
ANOVA	p = 0,2612			p = 0,5184			P = 0,0691			p = 0,9070		

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.

ANEXO H – FORÇA MÁXIMA, DESLOCAMENTO NA FORÇA MÁXIMA, FORÇA DE RUPTURA E DESLOCAMENTO MÁXIMO DOS FÊMURES DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

	FORÇA MÁXIMA (N)			DESLOCAMENTO NA FORÇA MÁXIMA (mm)			FORÇA DE RUPTURA (N)			DESLOCAMENTO MÁXIMO (mm)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	121,1	119,9	110,8	0,72	0,77	0,97	110,2	118,6	97,5	1,03	1,00	1,22
	126,6	126,2	124,6	0,92	0,92	0,76	116,7	118,0	94,5	1,13	1,06	1,13
	117,3	121,6	116,6	0,89	0,60	0,87	113,6	73,6	113,1	1,01	1,07	1,12
	110,8	127,9	137,0	0,73	0,99	0,77	76,1	123,6	130,8	1,20	1,08	1,04
	114,1	107,4	102,2	0,85	0,98	0,91	104,4	90,2	94,3	1,09	1,27	1,04
	136,2	121,0	115,1	0,75	0,99	0,89	96,2	97,5	113,9	0,84	1,29	0,96
	127,1	117,8	142,7	0,77	0,76	0,99	119,6	116,1	133,5	0,89	0,94	0,13
	129,9	118,6	130,5	0,60	0,76	1,00	126,3	93,2	111,8	0,70	1,36	0,12
	127,7			0,07			95,4			1,05		
n	9	8	8	9	8	8	9	8	8	9	8	8
MED	123,4	120,1	122,4	0,70	0,84	0,89	106,5	103,9	111,2	0,99	1,13	0,85
DESVPAD	8,19	6,21	13,76	0,2565	0,1440	0,0919	15,37	17,78	15,33	0,1565	0,1516	0,4490
EPM	2,73	2,20	4,86	0,0855	0,0509	0,0325	5,12	6,29	5,42	0,0522	0,0536	0,1587
ANOVA	p = 0,77			p = 0,09			p = 0,66			p = 0,15		

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.

ANEXO I – RESILIÊNCIA, TENACIDADE E RIGIDEZ DOS FÊMURES DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

	RESILIÊNCIA (J)			TENACIDADE (J)			RIGIDEZ (N/mm)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	0,0532	0,0606	0,0761	0,0926	0,0883	0,1025	262,8	257,4	196,9
	0,0819	0,0776	0,0636	0,1112	0,0904	0,1041	291,4	254,7	274,8
	0,0727	0,0437	0,0691	0,0868	0,0927	0,0978	252,1	269,5	246,1
	0,0482	0,0852	0,0639	0,0949	0,0979	0,1006	237,1	224,4	260,6
	0,0652	0,0700	0,0645	0,0927	0,1005	0,0782	239,8	202,5	209,1
	0,0656	0,0863	0,0690	0,0765	0,1203	0,0776	275,6	266,4	214,7
	0,0634	0,0555	0,0947	0,0781	0,0774	0,1417	264,3	219,9	269,0
	0,0453	0,0585	0,0906	0,0580	0,1205	0,1052	263,8	266,7	265,6
	0,0514			0,0910			255,4		
n	9	8	8	9	8	8	9	8	8
MED	0,0608	0,0672	0,0739	0,0869	0,0985	0,1010	260,3	245,2	242,1
DESVPAD	0,0122	0,0152	0,0123	0,0148	0,0152	0,0199	16,90	25,74	30,67
EPM	0,0041	0,0054	0,0043	0,0049	0,0054	0,0070	5,63	9,10	10,84
ANOVA	p = 0,15			p = 0,20			p = 0,29		

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.

ANEXO J – PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DAS VÉRTEBRAS DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

	FORÇA MÁXIMA (N)			DESLOCAMENTO NA FORÇA MÁXIMA (mm)		
	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3	CONT	nFe 0,6	nFe 0,3
	191,8	217,8	200,5	0,75	0,32	0,70
	99,20	157,7	307,0	0,26	0,29	0,46
	180,3	160,2	117,2	0,88	0,62	0,45
	161,4	148,3	159,6	2,77	0,55	0,42
	215,3	187,9	112,6	2,55	0,94	0,78
	187,0	191,0	150,4	2,25	0,39	3,25
	205,0	146,0	176,2	1,31	2,27	0,40
	190,0	158,5	197,0	0,71	0,59	2,96
	175,1			0,38		
n	9	8	8	9	8	8
MED	178,3	170,9	177,6	1,32	0,75	1,18
DESVPAD	33,60	25,26	61,62	0,96	0,65	1,20
EPM	11,20	8,93	21,79	0,32	0,23	0,42
ANOVA	p = 0,9280			p = 0,4630		

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg.

## ANEXO K – PROPRIEDADES FÍSICAS DOS FÊMURES DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE

	P.imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. MM. (g)	VOLUME (cm <sup>3</sup> )	D. ÓSSEA (g/cm <sup>3</sup> )	D. MINERAL (g/cm <sup>3</sup> )	% H <sub>2</sub> O	% MO	%MM
	0,3335	0,9377	0,5941	0,3942	0,6042	1,5520	0,6524	36,64	21,32	42,04
	0,3439	0,9920	0,5930	0,4067	0,6481	1,5306	0,6275	40,22	18,78	41,00
	0,3637	0,9930	0,6293	0,4303	0,6293	1,5779	0,6838	36,63	20,04	43,33
	0,3206	0,9277	0,5621	0,3805	0,6071	1,5281	0,6268	39,41	19,58	41,02
	0,3261	0,9063	0,5574	0,3716	0,5802	1,5620	0,6405	38,50	20,50	41,00
	0,3336	1,0408	0,6371	0,4425	0,7072	1,4717	0,6257	38,79	18,70	42,52
	0,3153	0,9067	0,5537	0,3754	0,5914	1,5331	0,6348	38,93	19,66	41,40
	0,3363	0,7408	0,5740	0,3998	0,4045	1,8314	0,9884	22,52	23,52	53,97
	0,3109	0,9047	0,5545	0,3798	0,5938	1,5236	0,6396	38,71	19,31	41,98
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MED	0,3315	0,9277	0,5839	0,3979	0,5962	1,5678	0,6799	36,70	20,16	43,14
DESVPAD	0,0160	0,0849	0,0319	0,0249	0,0816	0,1032	0,1171	5,45	1,50	4,14
EPM	0,0053	0,0283	0,0106	0,0083	0,0272	0,0344	0,0390	1,82	0,50	1,38

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg, P.imerso: Peso imerso, P.úmido: Peso úmido, P.seco: Peso seco, P.MM.: Peso do material mineral, D.ÓSSEA: Densidade óssea, D.MINERAL: Densidade Mineral, %H<sub>2</sub>O: Percentual de água, %MO: Percentual de material orgânico, %MM: Percentual de material mineral.

## ANEXO L – PROPRIEDADES FÍSICAS DOS FÊMURES DOS ANIMAIS DO GRUPO nFe 0,6

	P.imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. MM. (g)	VOLUME (cm <sup>3</sup> )	D. ÓSSEA (g/cm <sup>3</sup> )	D. MINERAL (g/cm <sup>3</sup> )	% H <sub>2</sub> O	% MO	%MM
	0,3595	1,0234	0,6313	0,4253	0,6639	1,5415	0,6406	38,31	20,13	41,56
	0,3392	0,9746	0,5994	0,4023	0,6354	1,5338	0,6331	38,50	20,22	41,28
	0,3320	0,9552	0,5881	0,3926	0,6232	1,5327	0,6300	38,43	20,47	41,10
	0,3781	1,0266	0,6438	0,4491	0,6485	1,5830	0,6925	37,29	18,97	43,75
	0,3410	0,9427	0,5853	0,4014	0,6017	1,5667	0,6671	37,91	19,51	42,58
	0,2896	0,8804	0,5101	0,3210	0,5908	1,4902	0,5433	42,06	21,48	36,46
	0,3133	0,9344	0,5954	0,3772	0,6211	1,5044	0,6073	36,28	23,35	40,37
	0,3724	1,0914	0,6415	0,4403	0,7190	1,5179	0,6124	41,22	18,44	40,34
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	0,3406	0,9786	0,5994	0,4012	0,6380	1,5338	0,6283	38,75	20,32	40,93
DESVPAD	0,0298	0,0660	0,0432	0,0405	0,0404	0,0307	0,0443	1,94	1,54	2,13
EPM	0,0105	0,0233	0,0153	0,0143	0,0143	0,0108	0,0157	0,69	0,55	0,75

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg, P.imerso: Peso imerso, P.úmido: Peso úmido, P.seco: Peso seco, P.MM.: Peso do material mineral, D.ÓSSEA: Densidade óssea, D.MINERAL: Densidade Mineral, %H<sub>2</sub>O: Percentual de água, %MO: Percentual de material orgânico, %MM: Percentual de material mineral.

## ANEXO M – PROPRIEDADES FÍSICAS DOS FÊMURES DOS ANIMAIS DO GRUPO nFe 0,3

	P.imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. MM. (g)	VOLUME (cm <sup>3</sup> )	D. ÓSSEA (g/cm <sup>3</sup> )	D. MINERAL (g/cm <sup>3</sup> )	% H <sub>2</sub> O	% MO	%MM
	0,3441	0,9634	0,5954	0,4069	0,6193	1,5556	0,6570	38,20	19,57	42,24
	0,3664	1,0599	0,6736	0,4353	0,6935	1,5283	0,6277	36,45	22,48	41,07
	0,3481	0,9593	0,6153	0,4128	0,6112	1,5695	0,6754	35,86	21,11	43,03
	0,3528	1,0243	0,6257	0,4176	0,6715	1,5254	0,6219	38,91	20,32	40,77
	0,3211	0,9168	0,5581	0,3808	0,5957	1,5390	0,6392	39,13	19,34	41,54
	0,3129	0,9231	0,5350	0,3744	0,6102	1,5128	0,6136	42,04	17,40	40,56
	0,3630	1,0369	0,6331	0,4342	0,6739	1,5387	0,6443	38,94	19,18	41,87
	0,3504	1,0108	0,6078	0,4200	0,6604	1,5306	0,6360	39,87	18,58	41,55
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	0,3449	0,9868	0,6055	0,4103	0,6420	1,5375	0,6394	38,67	19,75	41,58
DESVPAD	0,0188	0,0536	0,0435	0,0224	0,0368	0,0179	0,0198	1,94	1,56	0,81
EPM	0,0067	0,0189	0,0154	0,0079	0,0130	0,0063	0,0070	0,68	0,55	0,29

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg, P.imerso: Peso imerso, P.úmido: Peso úmido, P.seco: Peso seco, P.MM.: Peso do material mineral, D.ÓSSEA: Densidade óssea, D.MINERAL: Densidade Mineral, %H<sub>2</sub>O: Percentual de água, %MO: Percentual de material orgânico, %MM: Percentual de material mineral.

## ANEXO N – PROPRIEDADES FÍSICAS DAS VÉRTEBRAS DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE

	P.imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. MM. (g)	VOLUME (cm <sup>3</sup> )	D. ÓSSEA (g/cm <sup>3</sup> )	D. MINERAL (g/cm <sup>3</sup> )	% H <sub>2</sub> O	% MO	%MM
	0,0362	0,1189	0,0592	0,0386	0,0827	1,4377	0,4667	50,21	17,33	32,46
	0,0214	0,0819	0,0355	0,0233	0,0605	1,3537	0,3851	56,65	14,90	28,45
	0,0387	0,1407	0,0676	0,0433	0,1020	1,3794	0,4245	51,95	17,27	30,77
	0,0329	0,1131	0,0586	0,0381	0,0802	1,4102	0,4751	48,19	18,13	33,69
	0,0314	0,1044	0,0542	0,0367	0,0730	1,4301	0,5027	48,08	16,76	35,15
	0,0281	0,0896	0,0487	0,0324	0,0615	1,4569	0,5268	45,65	18,19	36,16
	0,0325	0,1053	0,0574	0,0367	0,0728	1,4464	0,5041	45,49	19,66	34,85
	0,0291	0,0906	0,0509	0,0344	0,0615	1,4732	0,5593	43,82	18,21	37,97
	0,0271	0,0917	0,0481	0,0313	0,0646	1,4195	0,4845	47,55	18,32	34,13
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MED	0,0308	0,1040	0,0534	0,0350	0,0732	1,4230	0,4810	48,62	17,64	33,74
DESVPAD	0,0051	0,0183	0,0091	0,0056	0,0136	0,0377	0,0523	3,90	1,32	2,86
EPM	0,0017	0,0061	0,0030	0,0019	0,0045	0,0126	0,0174	1,30	0,44	0,95

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg, P.imerso: Peso imerso, P.úmido: Peso úmido, P.seco: Peso seco, P.MM.: Peso do material mineral, D.ÓSSEA: Densidade óssea, D.MINERAL: Densidade Mineral, %H<sub>2</sub>O: Percentual de água, %MO: Percentual de material orgânico, %MM: Percentual de material mineral.



## ANEXO O – PROPRIEDADES FÍSICAS DAS VÉRTEBRAS DOS ANIMAIS DO GRUPO nFe 0,6

	P.imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. MM. (g)	VOLUME (cm <sup>3</sup> )	D. ÓSSEA (g/cm <sup>3</sup> )	D. MINERAL (g/cm <sup>3</sup> )	% H <sub>2</sub> O	% MO	%MM
	0,0372	0,1150	0,0646	0,0384	0,0778	1,4781	0,4936	43,83	22,78	33,39
	0,0319	0,1123	0,0454	0,0289	0,0804	1,3968	0,3595	59,57	14,69	25,73
	0,0320	0,1112	0,0565	0,0356	0,0792	1,4040	0,4495	49,19	18,79	32,01
	0,0326	0,0984	0,0547	0,0373	0,0658	1,4954	0,5669	44,41	17,68	37,91
	0,0316	0,1080	0,0542	0,0357	0,0764	1,4136	0,4673	49,81	17,13	33,06
	0,0322	0,1070	0,0556	0,0363	0,0748	1,4305	0,4853	48,04	18,04	33,93
	0,0298	0,0973	0,0482	0,0326	0,0675	1,4415	0,4830	50,46	16,03	33,50
	0,0256	0,0864	0,0473	0,0288	0,0608	1,4211	0,4737	45,25	21,41	33,33
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	0,0316	0,1045	0,0533	0,0342	0,0728	1,4351	0,4723	48,82	18,32	32,86
DESVPAD	0,0032	0,0096	0,0062	0,0037	0,0072	0,0352	0,0573	5,03	2,67	3,36
EPM	0,0011	0,0034	0,0022	0,0013	0,0025	0,0124	0,0202	1,78	0,94	1,19

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg, P.imerso: Peso imerso, P.úmido: Peso úmido, P.seco: Peso seco, P.MM.: Peso do material mineral, D.ÓSSEA: Densidade óssea, D.MINERAL: Densidade Mineral, %H<sub>2</sub>O: Percentual de água, %MO: Percentual de material orgânico, %MM: Percentual de material mineral.

## ANEXO P – PROPRIEDADES FÍSICAS DAS VÉRTEBRAS DOS ANIMAIS DO GRUPO nFe 0,3

	P.imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. MM. (g)	VOLUME (cm <sup>3</sup> )	D. ÓSSEA (g/cm <sup>3</sup> )	D. MINERAL (g/cm <sup>3</sup> )	% H <sub>2</sub> O	% MO	%MM
	0,0450	0,1453	0,0734	0,0475	0,1003	1,4487	0,4736	49,48	17,83	32,69
	0,0436	0,1337	0,0756	0,0372	0,0901	1,4839	0,4129	43,46	28,72	27,82
	0,0305	0,1050	0,0428	0,0272	0,0745	1,4094	0,3651	59,24	14,86	25,90
	0,0283	0,0949	0,0499	0,0320	0,0666	1,4249	0,4805	47,42	18,86	33,72
	0,0335	0,1124	0,0497	0,0340	0,0789	1,4246	0,4309	55,78	13,97	30,25
	0,0176	0,0660	0,0297	0,0200	0,0484	1,3636	0,4132	55,00	14,70	30,30
	0,0345	0,1120	0,0598	0,0405	0,0775	1,4452	0,5226	46,61	17,23	36,16
	0,0281	0,0989	0,0491	0,0308	0,0708	1,3969	0,4350	50,35	18,50	31,14
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	0,0326	0,1085	0,0538	0,0337	0,0759	1,4246	0,4417	50,92	18,08	31,00
DESVPAD	0,0088	0,0242	0,0154	0,0084	0,0155	0,0363	0,0489	5,32	4,68	3,25
EPM	0,0031	0,0086	0,0054	0,0030	0,0055	0,0128	0,0173	1,88	1,66	1,15

CONT: Grupo Controle, nFe 0,6: Grupo tratado com 0,6mg/Kg, nFe 0,3: Grupo tratado com 0,3mg/Kg, P.imerso: Peso imerso, P.úmido: Peso úmido, P.seco: Peso seco, P.MM.: Peso do material mineral, D.ÓSSEA: Densidade óssea, D.MINERAL: Densidade Mineral, %H<sub>2</sub>O: Percentual de água, %MO: Percentual de material orgânico, %MM: Percentual de material mineral.