

Efeito *in vitro* da nanopartícula de magnetita revestida com bicamada de laurato/dodecilamina em células de melanoma humano

^{1,2}Silva, E.M.; ^{1,3}Passos, D.C.S.; ^{1,4}Guilo, L.A.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - Brasil

elayne_bio@hotmail.com e lidia.guillo@gmail.com

palavras-chave: melanoma, nanopartículas magnéticas, fluorescência, MEV.

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é considerado um grave câncer de pele, por possuir maiores chances de formar metástases devido à transformação atípica dos melanócitos, presentes na pele (MOHR *et. al.*, 2009). Os melanócitos são células especializadas na pigmentação e encontram-se, principalmente, na pele, na camada basal da epiderme, onde produzem melanina (pigmento responsável pela cor da pele e do cabelo). Através da produção de melanina os melanócitos oferecem proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta do tipo A e B, produzidos pelo sol atuando assim, na prevenção do câncer de pele (GRAY-SCHOPFER *et. al.*, 2007).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), as taxas de incidência do câncer de pele são baixas, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase, tendo uma estimativa de novos casos no Brasil de 5.930, sendo 2960 homens e 2970 mulheres no ano de 2010. Mas o câncer de pele corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa 4% das neoplasias malignas do órgão, sendo a predominante em populações de pele clara (INCA, 2010). Se o melanoma for diagnosticado precocemente pode ser curado através de ressecção cirúrgica em 80% dos casos. Mas se o melanoma estiver na fase metastática, raramente responde às terapias existentes (radioterapia, quimioterapia, excisão cirúrgica completa das metástases, perfusão isolada), com sobrevivência de seis meses a cinco anos após diagnóstico (GRAY-SCHOPFER *et. al.*, 2007).

1- Laboratório de Bioquímica Celular, 2- Orientanda da iniciação científica, 3- Aluna de Doutorado, 4- Orientadora

Revisado pelo orientador

Devido aos graves efeitos colaterais e limitada eficiência das terapias disponíveis tem-se buscado novas estratégias e agentes terapêuticos através da nanobiotecnologia para o tratamento do melanoma cutâneo. As nanotecnologias vêm contribuindo com avanços na nanotecnologia biomédica (nanobiotecnologia), que explora nanoestruturas em escala nanométrica, para diagnóstico, bioengenharia e aplicações terapêuticas, como as nanopartículas magnéticas à base de compostos de óxidos de ferro, tais como magnetita (Fe_3O_4). Elas podem ter aplicações na área biomédica para a fabricação de nanocompósitos magnéticos, magnetolipossomas e na forma de fluídos magnéticos para carreamento de drogas, sendo que as nanopartículas magnéticas devem atravessar a barreira endotelial e se acumular nas células-alvos, sem causar danos às células vizinhas (PAVON e OKAMOTO, 2007).

As nanopartículas magnéticas contidas em fluído magnético podem ser manipuladas e direcionadas a um alvo específico sob influência de um campo magnético externo (SHUBAYEV *et. al.*, 2009), podendo assim tornar-se carreadores de drogas com especificidade de sítio para liberação controlada da droga, sem sobrecarregar o organismo com doses massivas. Sua aplicação não se limita somente ao carreamento de drogas, pois, dados científicos relatam que os sistemas magnéticos podem ser utilizados como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética nuclear, na separação magnética de células ou moléculas biológicas variadas, em marcadores para célula-alvo e na magnetohipertermia (LAVACA e MORAIS, 2004). O uso das nanopartículas como carreadores de drogas tem sido uma estratégia para superar mecanismos de resistência celular e não celular e aumentar a seletividade da droga para células cancerígenas, diminuindo os efeitos colaterais (THIERRY *et. al.*, 1992).

Para melhorar a absorção e especificidade celular, possibilitando biocompatibilidade e melhores resultados no tratamento contra o câncer, as nanopartículas magnéticas podem ser funcionalizadas/cobertas com camadas de íons específicos, nucleotídeos, peptídeos entre outros, pois sem o revestimento as nanopartículas magnéticas têm superfícies hidrofóbicas e propensão a se aglomerar. Após a funcionalização com surfactantes orgânicos (dodecilamina) as nanopartículas de óxido de ferro melhoram sua estabilidade, homogeneidade em ferrofluidos (SHUBAYEV *et. al.*, 2009), altera a interação das nanopartículas com as células em termos da eficiência de sua adesão e internalização, também aumenta o tempo de circulação das nanopartículas no organismo (ZHANG *et. al.*, 2002). Assim, conhecer o comportamento das nanopartículas funcionalizadas quando interagem com as células, é uma etapa importante para avaliação da sua eficiência como aplicação biomédica (FREITAS *et.*

al., 2008). Sendo que a terapia utilizando nanopartículas magnéticas oferece grandes perspectivas para o diagnóstico e tratamento de doenças proliferativas, tais como melanoma cutâneo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a ação biológica *in vitro* de nanopartículas de magnetita revestidas com bicamada de laurato/dodecilamina em células de melanoma humano (SK-MEL-37).

2.2 Específicos

- Analisar por microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura (M.E.V) as mudanças morfológicas das células tratadas com nanopartículas magnéticas;
- Analisar degradação nuclear por Microscopia de Fluorescência.

3. METODOLOGIA

3.1 Preparação das nanopartículas de magnetita

O fluido magnético das nanopartículas de magnetita foi sintetizado a partir da mistura de soluções aquosas de cloreto ferroso e férrico seguida da adição de amônia concentrada sob agitação vigorosa (KHALAFALLA e REIMERS, 1980), o precipitado foi retirado e levado para o processo de funcionalização das nanopartículas com monocamadas de laurato, seguida da funcionalização com monocamada de dodecilamina, formando assim, nanopartículas de magnetita com bicamadas laurato/dodecilamina (MAGN-FBLD). A suspensão coloidal aquosa de nanopartículas foi dialisada para eliminar dodecilamina em excesso. O diâmetro médio estimado das partículas é ~10nm (SANTOS e LIMA, 2008). Estas preparações e caracterizações foram realizadas pela equipe da Profª Emilia Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

Estudos anteriores foram realizados por Moura e Guillo 2010, para determinar a concentração a ser utilizado neste estudo.

3.2 Cultura e manutenção da linhagem celular

A linhagem celular utilizada para os experimentos foi SK-MEL-37 (células de melanoma humano), obtidas através de doação do Dr, Loyd J. Old do Instituto de Câncer Memorial Sloan-Kettering, New York, USA. As células são estocadas em nitrogênio líquido para posterior descongelamento. As células foram descongeladas em um banho a 37°C, adicionando-se em seguida meio MEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Seguiu-se uma centrifugação a 80 x g por 2 a 3 minutos desprezando-se a seguir o sobrenadante. Ressuspendeu-se gentilmente em meio MEM contendo 10% de SFB. Elas foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm²) (Nunc Brand Products, USA) contendo Meio Mínimo Essencial (MEM-Vitrocell, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco BRL, Argentina), 0,25mg/mL de Fungizona (Gibco BRL, Argentina) e mantidas na incubadora úmida com condições de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. A cada dois dias o meio de cultura foi removido e substituído por meio fresco.

As células foram semeadas em uma densidade de pelo menos 3x10⁴ células/ml, para os experimentos assumindo-se um tempo de duplicação de 30 horas, quando atingiam a confluência, de forma que durante o tratamento com as nanopartículas magnéticas, as células se mantinham na fase exponencial de crescimento caracterizado pela duplicação do número de células (SOARES, 2008).

3.3 Análise através da Microscopia de Fluorescência

A condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo podem ser estudados morfológicamente através da coloração com DAPI (4', 6' - diamidino, 2' phenylindole - Invitrogen) que é um marcador fluorescente específico para o núcleo (fluorocromo), esse corante cora ácidos nucleicos, formando um complexo estável com a dupla fita de DNA emitindo forte fluorescência permitindo com isso a visualização dos núcleos e possibilita analisarmos o tipo de morte celular (necrose ou apoptose), utilizando microscopia de fluorescência.

O marcador específico DAPI na concentração de 1µM, foi utilizado para marcar o núcleo das células SK-MEL-37. As células de melanoma SK-MEL-37 foram semeadas em placas de 3,5cm² de área (Nunc Brand Products, USA), para atingirem confluência em 48

horas. Vinte quatro horas depois da semeadura adicionou o marcador específico DAPI, após 45 horas da semeadura as células de melanoma foram tratadas com a concentração de 12,8µg/mL da nanopartícula magnetita funcionalizada com laurato/dodecilamina (MAGN/FBLD) e com a concentração de 11µg/mL da cobertura laurato/dodecilamina (composta por: 10mg/mL de Fe; 2,36mg/mL de laurato; 2,18mg/mL de dodecilamina. Após 2 horas e 30 minutos as células tratadas e as células controle foram analisadas em microscópio óptico invertido de fluorescência (Eclipse TE 2000S, NIKON), com filtro apropriado, para obtenção dos resultados.

3.4 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células de melanoma SK-MEL-37 foram plaqueadas em placas de 3,5cm² de área (Nunc Brand Products, USA) contendo lamínulas gelatinizadas (gelatina 0,1%) para 72 horas de crescimento, após a confluência, as células foram tratadas com 7µg/mL da nanopartícula magnetita funcionalizada com laurato/dodecilamina (MAGN/FBLD), após 2 horas de incubação foi realizada uma primeira fixação. As células foram lavadas com DPBS com Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ e colocadas em solução de Karnovsky's na geladeira por 72 horas, após esse período de incubação, as células foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio (0,1M pH 7,2), durante 5 minutos (2 vezes). As células então, foram desidratadas em uma série de concentrações crescentes de etanol, incluindo banhos de 30% a 90% por 10 minutos cada e a concentração 100%, por três vezes durante por 10 minutos cada. Retirou-se o etanol 100% e colocou-se 1mL de HMDS (Hexametildissilazana) por 30 minutos a uma temperatura ambiente, retirou-se o excesso de HMDS, levou-se as células a um dessecador overnight, procedeu-se a deposição de filmes de ouro no Denton Vacuum e conseqüente análise em um Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS e Thermo scientific NSS Spectral Imaging), operado a 4 Kv, instalado no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LAMMAR) no Instituto de Física/UFG.

4. RESULTADOS

4.1 Nanopartículas magnéticas induzem alterações morfológicas e estruturais em SK-MEL-37

A visualização do núcleo das células marcadas com DAPI possibilitou observar que as células de melanoma (SK-MEL-37) incubadas por 48 horas em meio de cultura com 10% de SFB sem adição de nanopartículas ou de cobertura, apresentaram núcleo com formas arredondadas uniformes, preservando a forma do núcleo e foi claramente marcado pelo corante fluorescente, assim as células do grupo controle (Figura 1 A-B) não apresentaram alterações morfológicas.

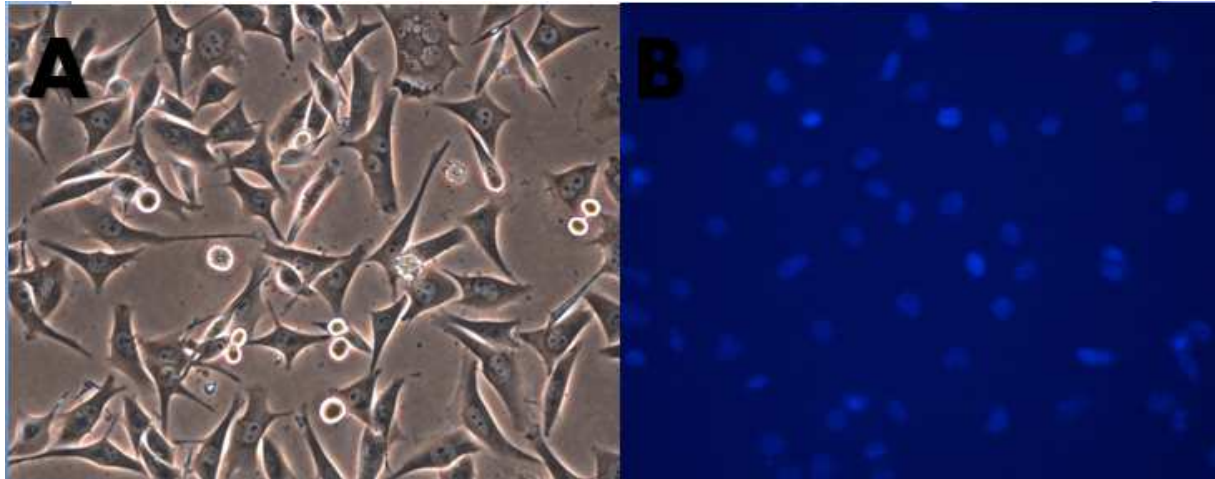


Figura 1: Aspecto morfológico das células do grupo controle de melanoma (SK-MEL-37) em cultura por 48 horas incubadas com DAPI e visualizadas em microscópio de fluorescência. (A) Células controle não apresentaram alterações morfológicas; (B) células com núcleos preservados e arredondados. (A-B) aumento 200 vezes.

Nas células SK-MEL-37 tratadas com a cobertura laurato/dodecilamina (Figura 2 C-D) na concentração de $11\mu\text{g/mL}$ quando comparadas as células controle, pode-se observar o desprendimento de aproximadamente 20% do total das células, e alterações morfológicas, como presença de vacúolos citoplasmáticos. Os vacúolos observados nas células tratadas com a cobertura são características que podem ocorrer no processo de apoptose, mas como não houve desprendimento significativo, sugere-se que a indução da apoptose pela cobertura não foi significativa.

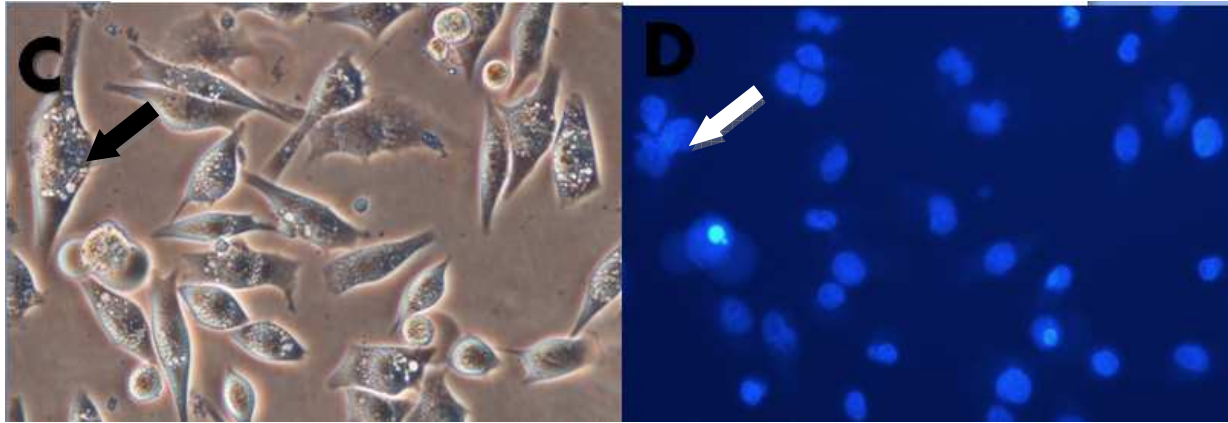


Figura 2: Aspecto morfológico através da Microscopia de fluorescência das células de melanoma (SK-MEL-37) tratadas por 2 horas e 30 minutos na concentração de $11\mu\text{l/mL}$ da cobertura da nanopartícula composta por Ferro, laurato e dodecilamina. (C) Podemos observar intensa vacuolização (seta preta) e (D) núcleos com pequenas alterações na morfologia celular (seta branca). (C-D) aumento 200 vezes.

Já nas células de melanoma tratadas com as nanopartículas de magnetita funcionalizadas com laurato/dodecilamina (MAGN/FBLD) (Figura 3 E-H), na concentração de $12,8\mu\text{g/mL}$, quando comparadas as células controle percebe-se que elas tornaram-se mais arredondadas, isto poderia estar associado às mudanças morfológicas, como perda da integridade nuclear, deixando de ser arredondados e apresentado-se mais alongados, os núcleos parecem ser menores com perda da uniformidade havendo fragmentação do núcleo das células.

Também foi observada a presença de vacúolos, formação de “*blebs*” de membrana e houve aproximadamente 90% de desprendimento das células nas células tratadas com as nanopartículas MAGN/FBLD. Os resultados obtidos indicam, provavelmente, que as nanopartículas de magnetita funcionalizadas com laurato/dodecilamina induzem morte celular por apoptose, já que as alterações como formação de “*blebs*” de membrana e fragmentação nuclear são características do processo apoptótico da célula.

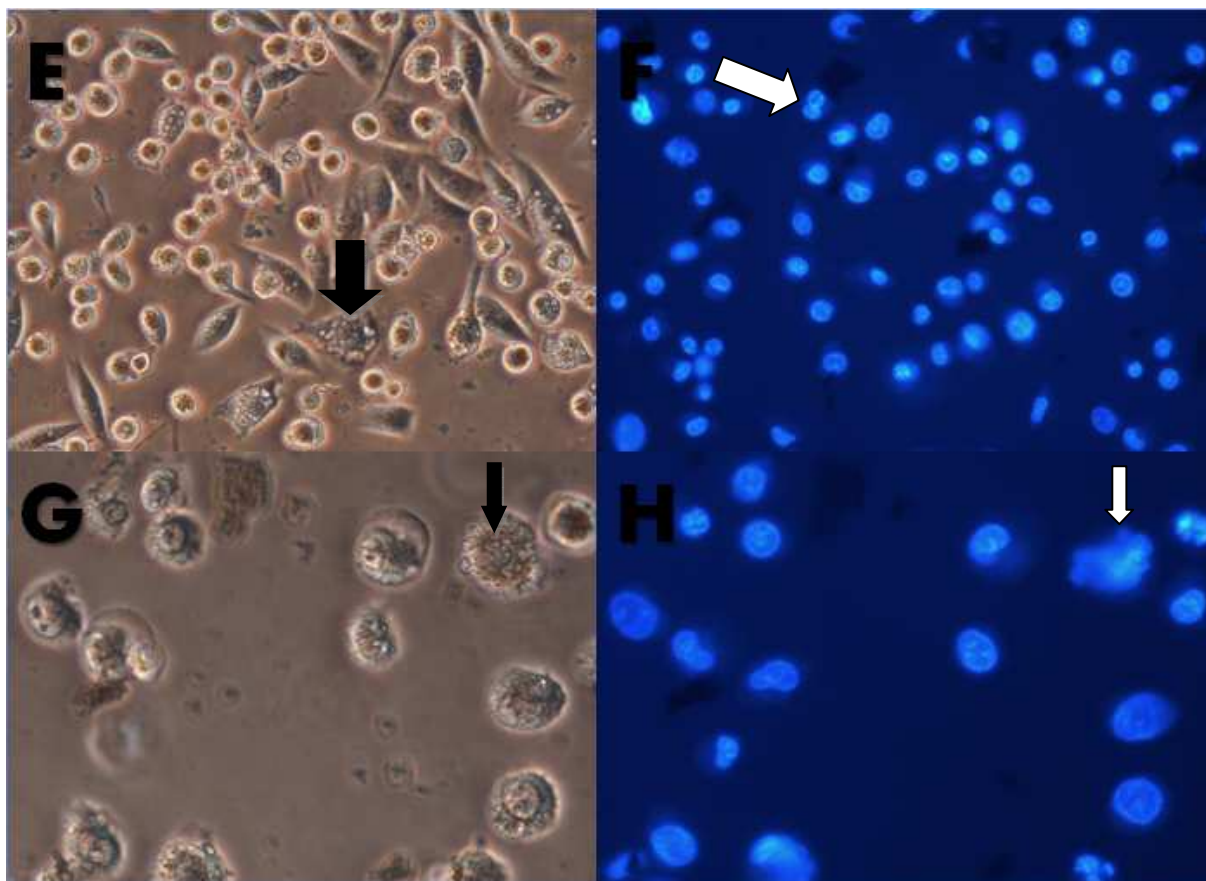


Figura 3: Aspecto morfológico das células de melanoma humano da linhagem SK-MEL-37 tratadas com as nanopartículas MAGN/FBLD por 2 horas e 30 minutos na concentração de $12,8\mu\text{g/mL}$ incubadas com DAPI e visualizadas em microscópio de fluorescência. (E) Observa-se aproximadamente 90% de desprendimento das células e presença de vacúolos (seta preta larga); (F) fragmentação nuclear (seta branca larga); (G) arredondamento das células (seta preta fina) e (H) formação de “*blebs*” de membrana (seta branca fina). (E-H) aumento 200 vezes.

4.2 Nanopartículas magnéticas induzem alterações estruturais na superfície da membrana plasmática em SK-MEL-37

A análise das células em microscopia eletrônica de varredura (M. E. V) nos permitiu visualizar as mudanças na superfície das células, induzidas pelas nanopartículas de magnetita funcionalizadas com laurato/dodecilamina (MAGN/FBLD), complementando, dessa forma, os resultados, obtidos anteriormente, através da análise em microscopia de fluorescência.

Células que não receberam tratamento com nanopartículas possuem muitas projeções citoplasmáticas (Figura 4 A-B). Todavia, células tratadas com $7\mu\text{g/mL}$ nanopartículas

MAGN/FBLD, por um período de 2 horas, apresentaram redução destas projeções e formação de “blebs” na superfície da membrana plasmática (Figura 4 C-D), característica decorrente do processo apoptótico. Dessa forma, nossos resultados, obtidos através da análise de microscopia de fluorescência e M.E.V., indicam que as nanopartículas MAGN/FBLD, possivelmente, induzem morte celular por apoptose.

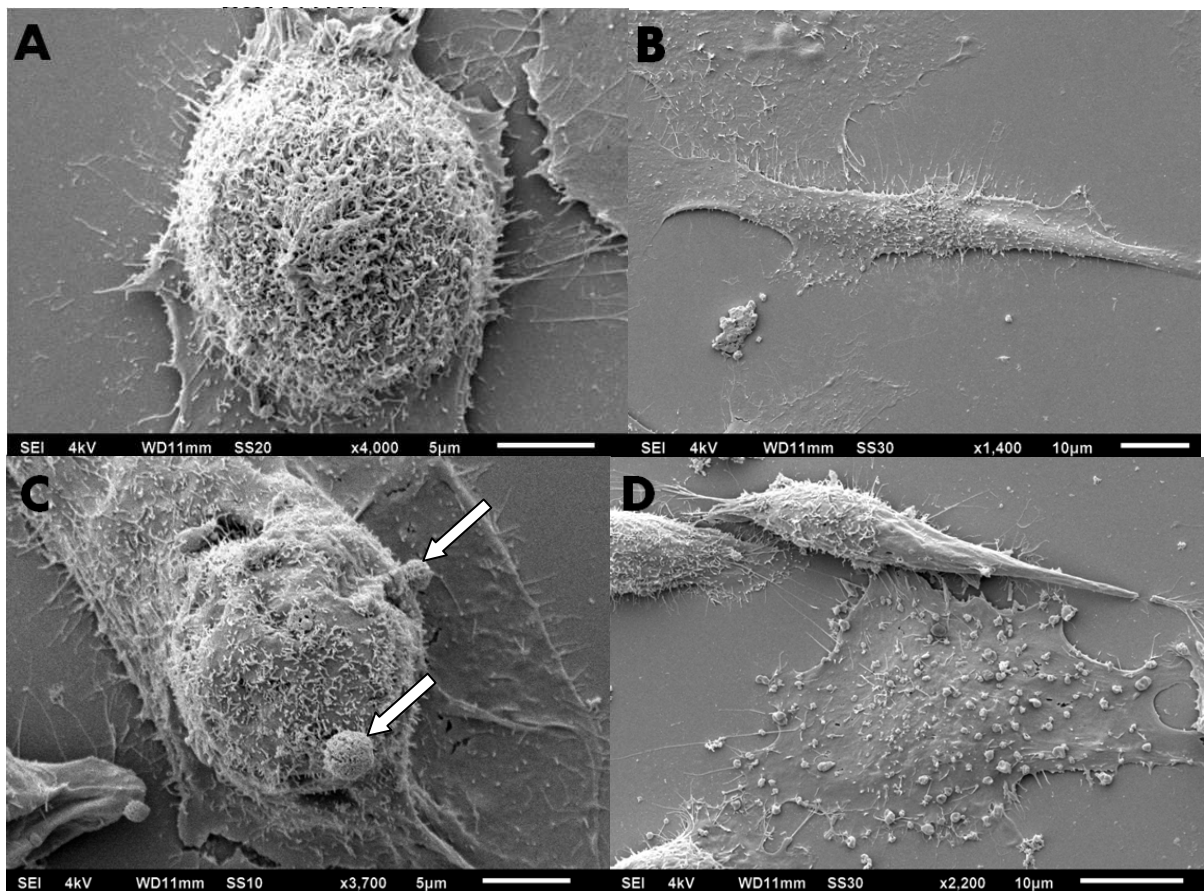


Figura 4: Micrografia eletrônica de varredura de células da linhagem SK-MEL-37 em cultura. As células foram incubadas por 2 horas na presença e ausência das nanopartículas MAGN/FBLD. (A e B) SK-MEL-37 na ausência das nanopartículas (controle) com projeções citoplasmáticas; (C e D) na presença de 7µg/mL das nanopartículas MAGN/FBLD, aparecimento de “blebs” na superfície da membrana plasmática (seta) e mudanças morfológicas na célula. (A-C) barra= 5µm; (B-D) barra= 10µm.

5. DISCUSSÃO

Devido à quimiorresistência adquirida pelos tumores, graves efeitos colaterais e limitada eficiência das terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia), como no tratamento do

melanoma cutâneo, tem sido estudados tratamentos alternativos através da nanociência e nanotecnologia. A nanotecnologia vem contribuindo com avanços na nanotecnologia biomédica, que explora nanoestruturas para aplicações terapêuticas, como as nanopartículas magnéticas. Elas podem ter aplicação na área biomédica na forma de fluídos magnéticos para carregamento de drogas (PAVON e OKAMOTO, 2007). Quando as nanopartículas magnéticas são cobertas por camadas de íons específicos, nucleotídeos e peptídeos podem possibilitar numerosas aplicações e melhores resultados no tratamento de câncer (SHUBAYEV *et. al.*, 2009).

Os primeiros métodos utilizados para avaliação de compostos são os testes *in vitro* que empregam material vivo, geralmente cultura de células de origem humana. A simplicidade desses testes facilita a interpretação e a dedução dos mecanismos de ação a nível celular e molecular, o que se torna muito complexo no organismo (GRUBER e HARTURNG, 2004). Para selecionar compostos com ação anti-neoplásica, os critérios são a inibição da proliferação celular *in vitro* e indução da morte celular por apoptose em resposta a esses compostos, sem adquirir resistência (ZHENG *et. al.*, 2004).

Sendo a apoptose um tipo de morte programada das células e o principal processo pelo qual as células danificadas e prejudiciais são eliminadas, que é caracterizada por uma série de mudanças morfológicas e estruturais nas células, dentre elas, podemos citar alterações no citoesqueleto celular, contração do volume citoplasmático, alterações mitocondriais, condensação da cromatina, formação de vesículas membranosas denominadas de corpos apoptóticos, surgimento de “*blebbing*” da membrana, perda da adesão celular e fragmentação nuclear, seguida de fragmentação do DNA (HUERTA *et. al.*, 2007).

A análise das células em microscopia eletrônica de varredura nos permitiu visualizar as mudanças na superfície das células, induzidas pela nanopartícula MAGN/FBLD, complementando os resultados obtidos através da análise em microscopia de fluorescência através do DAPI. Os resultados com microscopia de fluorescência demonstram que a cobertura laurato/dodecilemina das nanopartículas de magnetita induz aparecimento de vacúolos citoplasmáticos, porém não causou morte celular significativa, em estudo realizado por Moura e Guillo 2010, evidenciou-se que as coberturas laurato/laurato, laurato/dodecilamina e laurto/pluronic das nanopartículas magnéticas maghemita e magnetita não apresentaram citotoxicidade. Já os resultados com células tratadas com as nanopartículas de magnetita funcionalizadas com laurato e dodecelamina induziu alterações morfológicas e estruturais, tais como arredondamento da célula, formação de “*blebbings*” da membrana, formação de corpos apoptóticos, perda da aderência celular e fragmentação nuclear.

Paralelamente, a análise das células em microscopia eletrônica de varredura corroborou os resultados obtidos em microscopia de fluorescência, visto que também se observou a presença de “*blebbings*” na superfície da membrana plasmática, arredondamento das células e perda da aderência celular, características essas que evidenciam que a ação das nanopartículas magnéticas e pelo processo de morte celular por apoptose em SK-MEL-37, lembrando que a indução da apoptose contribui para inibição da progressão de neoplasias. Foram evidenciadas tais alterações em estudos realizados por Huerta *et. al.*, 2007, para detectar apoptose. Carneiro, 2007, obteve resultados semelhantes onde evidenciou alterações morfológicas e estruturais induzidas por um componente do açafrão (*Curcuma longa* L.), a curcumina, em células de melanoma humano. Martines *et. al.*, 2007, também constatou as mudanças morfológicas nas células de carcinoma de traquéia humano (linhagem Hep-2) após Terapia Fotodinâmica utilizando o agente fotossensibilizante ZnPc, sugerindo que as células Hep-2 sofrem morte celular por apoptose.

De acordo com Santos e Lima, 2008, sugere-se que a ação das nanopartículas nas células de melanoma cutâneo pode ser devido à interação eletrostática entre as nanopartículas carregadas positivamente, pode-se dizer funcionalizadas, e a superfície das células de melanoma SK-MEL-37, que possui sítios de carga negativa, esse é um fator decisivo na internalização das nanopartículas pelas células cultivadas *in vitro*.

No presente estudo, as nanopartículas magnéticas MAGN/FBLD mostrou-se interferir na progressão das células no ciclo celular e induzir apoptose nas células de melanoma cutâneo. Outros estudos sugerem que as nanopartículas de maghemita revestida com ácido láurico pode induzir a morte celular através da apoptose e dever ser um promissor contra o melanoma cutâneo (FREITAS *et. al.*, 2008).

Porém, novos estudos com nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com laurato e dodecilamina, são necessários para compreender claramente o seu efeito anti-neoplásico e seus mecanismos moleculares nas células neoplásicas, afim de que depois de rigorosas análises pré-clínicas *in vitro* e *in vivo* o uso das nanopartículas de magnetita poderá torna-se possível como uso clínico para o tratamento de neoplasias malignas e benignas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência, as nanopartículas de magnetita funcionalizadas com laurato e dodecilamina induzem alterações morfológicas e estruturais interferindo na progressão das

células de melanoma (linhagem SK-MEL-37), induzindo morte celular por apoptose, nas concentrações 12,8µg/mL e 7µg/mL , Contudo, novos experimentos rigorosos utilizando outras linhagens celulares, animais de laboratório são necessários a fim de que tumores quimioresistentes como o melanoma, se tornem mais susceptíveis à ativação da morte celular programada. A busca por novos quimioterápicos que exerçam atividade antitumoral devem ser continuamente estudadas e estimulada.

7. REFERÊNCIAS

CARNEIRO, MARCELLA LEMOS BRETTAS. Alterações morfológicas e estruturais induzidas por um componente do açafrão (*Curcuma longa* L.) em células de melanoma humano em cultura. **Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular**, Instituto de Ciências Biológicas, UFG. 2007.

FREITAS, E. R.; SOARES, P. R.; SANTOS, R. P.; SANTOS, R. L.; SILVA, J. R.; PORFÍRIO, E. P.; BAO, S. N.; LIMA, E. C. O.; MORAIS, P. C.; GUILLO, L. A. *In vitro* biological activities of anionic γ -Fe₂O₃ nanoparticles on human Melanoma cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 2385-2391, 2008.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature** (445), p. 851 -857, 2007.

HUERTA, S.; GOULET, E. J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E. H. Screening and detection of apoptosis. **Journal of Surgigal Research**, v. 139, p. 143-156, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), Ministério da Saúde.

Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. São Paulo (Brasil). 2010. Disponível em <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 30/05/2011.

KHALAFALLA, S. E.; REIMERS, G. W. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. mag-16, n. 2, p. 178-183, 1980.

LAVACA, Z. G. M.; MORAIS, P. C. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas. **Revista eletrônica Parcerias Estratégicas do CGEE do Ministério da Ciência e Tecnologia**,

publicado em 08/10/2004. Disponível em <<http://www.universia.com.br>> Acesso em 30/05/2011.

MARTINES, N. S.; MACHADO, A. H. A.; SILVA, N. S. S.; TEDESCO, A. C.; ZÂNGARO, A.; PACHECO-SOARES, C. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. **Arquivos Catarinenses de Medicina - ACM**, v. 36, n° 1, p. 59-64, 2007.

MOHR, P.; EGGERMONT, A. M. M.; HAUSCHILD, A.; BUZAID, A. Staging of cutaneous melanoma. **Annals of Oncology**, v. 20, ed. 6, p.14–21, 2009.

MOURA, L. R. e GUILLO, L. A. Análise comparativa do efeito citotóxico de nanopartículas magnéticas revestidas com três diferentes coberturas. **VII Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão (CONPEEX)**. Conhecimento e Desenvolvimento Sustentável. p. 2694-2705, 2010.

PAVON, L. F.; OKAMOTO, O. K. Aplicações de recursos nanobiotecnológicos em câncer. **Einstein**, v. 5 (1), p. 74-77, 2007.

SANTOS, M. C.; LIMA, E. C. O. Estudo do efeito do potencial de superfície na internalização de nanopartículas de magnetita em células cultivadas. **Anais do V Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão (CONPEEX)**. XVI Seminário de Iniciação Científica. "Produção do conhecimento e transformação social". 2008. Disponível em: <<http://www.ufg.br/this2/uploads/files/84/modelo1.pdf>>. Acesso em: 2/05/2011.

SHUBAYEV, V. I.; PISANIC II, T. R.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, ed. 6, p. 467-477, 2009.

SOARES, PAULA ROBERTA OTAVIANO. Atividade Antiproliferativa de Benzaldeído Canfeno Tiossemicarbazonas em células de Melanoma Humano (SK-MEL-37). **Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular**, Instituto de Ciências Biológicas, UFG. 2008.

THIERRY, A. R; DRITSCHILO, A.; RAHMAN, A. Effect of liposomes on P-glycoprotein function in multidrug resistant cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, ed. 2, p. 1098-1105, 1992.

ZHANG, Y.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. **Biomaterials**, v. 23, p. 1553-1561, 2002.