

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2022.



Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Biociências de Botucatu



**ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO E  
DETERMINAÇÃO DA ELIMINAÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM TEMPOS  
LONGOS POR BIOSUSCEPTOMETRIA DE  
CORRENTE ALTERNADA**

**JOÃO VICTOR CARNEIRO FARIA**

**Orientador:** José Ricardo de Arruda Miranda

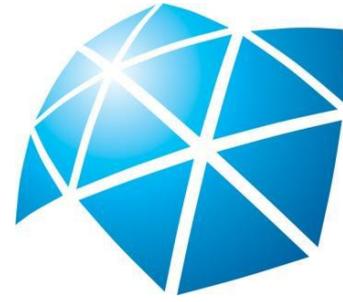
**Coorientador:** André Gonçalves Próspero

**Botucatu**

**2020**



Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Instituto de Biociências de Botucatu



**ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO E  
DETERMINAÇÃO DA ELIMINAÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM TEMPOS  
LONGOS POR BIOSUSCEPTOMETRIA DE  
CORRENTE ALTERNADA**

**Autor:** João Victor Carneiro Faria

**Orientador:** José Ricardo de Arruda Miranda

**Coorientador:** André Gonçalves Próspero

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de  
Botucatu para obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia e Biotecnologia

**Botucatu**

**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Faria, João Victor Carneiro.

Estudo da biodistribuição e determinação da eliminação de nanopartículas magnéticas em tempos longos por biosusceptometria de corrente alternada / João Victor Carneiro Faria. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Coorientador: André Gonçalves Prospero

Capes: 20903006

1. Nanopartículas. 2. Biomagnetismo. 3. Engenharia biomédica. 4. Biosusceptometria de Corrente Alternada.

Palavras-chave: Biodistribuição; Biomagnetismo; Biosusceptometria de Corrente Alternada; Engenharia biomédica; Nanopartículas magnéticas.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais, Evandro e Dacley, e minha irmã Ana Luísa pelo amor e suporte durante toda minha vida, graduação e mestrado, vocês são minha fonte diária de inspiração e sem vocês eu não estaria aqui.

Agradeço a minha namorada e companheira Mariah por todo o carinho, amor e reciprocidade na nossa relação, por não medir esforços para me ajudar no que for preciso mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu orientador José Ricardo de Arruda Miranda e ao meu coorientador André Gonçalves Próspero por todas as oportunidades a mim concedidas, pela confiança depositada em mim e por sempre dedicarem seu tempo e disposição para me ajudar desde as dúvidas mais simples até as mais complexas, muito obrigado!

Agradeço à República Bagudos por ter sido meu lar durante toda a graduação e grande parte do mestrado, em especial aqueles que compartilharam a casa durante minha jornada na casa por todas as conversas na madrugada, apoio, confraternizações e sentimento de irmandade, porém, não me esquecendo dos antigos moradores que me mostraram a importância da casa e de ser parte da história da Bagudos.

Agradeço aos meus amigos da “turma da sitiada” por redefinirem o conceito de amizade e provarem que a distância nunca foi e nunca será um fator importante quando se trata de uma amizade verdadeira.

Agradeço aos meus amigos Allan Alves, Guilherme Soares e Rodolfo Cicolin pela parceria fortalecida no ano passado por serem meus companheiros de moradia e por todas as conversas, risadas e confraternizações realizadas em volta da mesa redonda.

Agradeço aos meus irmãos da Banda Budapest por todos os shows, viagens e experiências adquiridos nos últimos anos e nos próximos que virão e também por provar que um sonho pode sim ser realizado se você for persistente o suficiente, apenas acreditando em si mesmo e aos que estão juntos na jornada

Agradeço aos meus companheiros de trabalho, tanto Laboratório de Biomagnetismo quanto LAFAR pelos cafés da manhã e pelo companheirismo dia após dia, tornando um ambiente de trabalho em um ambiente familiar.

Agradeço a CAPES pelo financiamento desta pesquisa e a todos que, de alguma forma, participaram da minha vida ao longo destes anos.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	7
Lista de Abreviaturas .....	9
Resumo .....	10
Abstract .....	12
1. Introdução .....	14
1.1 Nanopartículas Magnéticas .....	14
1.2 Biodistribuição e técnicas de detecção de NPMs .....	16
1.3 Motivação e Alvo .....	20
2. Objetivos .....	21
3. Materiais e Métodos .....	22
3.1 Biosusceptometria de Corrente Alternada .....	22
3.2 Espectroscopia de Partículas Magnéticas .....	25
3.3 Nanopartículas Magnéticas .....	27
3.4 Experimentação animal .....	28
3.5 Biodistribuição e Quantificações <i>ex vivo</i> .....	31
3.6 Forma de análise dos Resultados .....	33
4. Resultados .....	33
4.1 Caracterização das NPMs .....	33

4.2 Biodistribuição e Eliminação .....	36
5. Discussão .....	47
6. Conclusão .....	56
7. Referências .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de funcionamento do sistema BAC. Adaptado de Próspero <i>et al</i> , 2015 .....	23
Figura 2 - Representação de um sensor poço BAC. Adaptado de Quini <i>et al</i> , 2019 .....	24
Figura 3 - Comparação da sensibilidade entre o sensor convencional e sensor de cavidade. Adaptado de Próspero <i>et al</i> , 2019 .....	24
Figura 4 - Sensibilidade axial do sensor de cavidade. Adaptado de Próspero <i>et al</i> , 2019 .....	25
Figura 5 - Fluxograma da experimentação animal .....	32
Figura 6 - Distribuição de raios hidrodinâmicos das NPMs revestidas com citrato obtidos via experimento de DLS. ....	34
Figura 7 - Distribuição de raios hidrodinâmicos das NPMs revestidas com albumina obtidos via experimento de DLS. ....	35
Figura 8 - Curva de Calibração de NPMs revestidas com albumina e citrato em escala linear com ajustes lineares, onde foi obtido um $R^2 = 0,9931$ para NPMs revestidas com citrato e $R^2 = 0,9920$ para NPMs revestidas com citrato. (Inset) detalhe das curvas em escala logarítmica na região de baixas concentrações. ....	36
Figura 9 - Resultados de biodistribuição, para todos os órgãos de interesse, das NPMs revestidas com citrato ao longo do período avaliado. ....	37
Figura 10 - Resultados de biodistribuição, para todos os órgãos de interesse, das NPMs revestidas com albumina ao longo do período avaliado .....	38

Figura 11 - Resultados de biodistribuição, para fígado, das NPMs revestidas com citrato ao longo do período avaliado. * representa diferença significativa entre os revestimentos com $p < 0,05$ . .....	39
Figura 12 - Resultados de biodistribuição, para baço, das NPMs revestidas com citrato ao longo do período avaliado. * representa diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ . .....	40
Figura 13 – Regressão não linear utilizando a equação 1 para a obtenção das constantes de distribuição e eliminação para o fígado. onde foi obtido um $R^2 = 0,68$ para NPMs revestidas com citrato e um $R^2 = 0,87$ para NPMs revestidas com albumina. ....	42
Figura 14 - Regressão não linear utilizando a equação 1 para a obtenção das constantes de distribuição e eliminação para o baço. foi obtido um $R^2 = 0,94$ para NPMs revestidas com citrato e um $R^2 = 0,85$ para NPMs revestidas com albumina. ....	43
Figura 15 - Eliminação de NPMs via fezes a cada 5 dias. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ . .....	44
Figura 16 - Perfil de eliminação acumulado de NPMs revestidas com citrato e albumina via fezes, ao longo do período avaliado. ....	45
Figura 17 - Comportamento magnético das NPMs revestidas com citrato captadas pelo fígado e baço. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, e também dos grupos em relação aos valores de referência (Comportamento das NPMs líquidas e imobilizadas) com $p < 0,05$ .....	46

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACB - *Alternating Current Biosusceptometry*

BAC – Biosusceptometria de Corrente Alternada

CEUA – Comitê de ética no Uso de Animais

DLS – *Dynamic Light Scattering*

ESR – *Electron Spin Resonance*

FDA – *Food and drug administration*

ICP – MS – *Ion Coupled Plasma Mass Spectrometry*

MNPs – *Magnetic Nanoparticles*

MPI – *Magnetic Particle Imaging*

MPS – *Magnetic Particle Spectroscopy*

MRI – *Magnetic Resonance Imaging*

MRX – *Magnetorelaxometry*

NPMs – Nanopartículas Magnéticas

OPM – *Optically Pumped Magnetometers*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

SQUID – *Superconducting Quantum Interference Device*

## Resumo

Nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido alvo de vários estudos por conta de sua versatilidade, que se destaca quando comparadas a outros materiais. NPMs apresentam tamanho reduzido, alta susceptibilidade magnética e devido a possibilidade de alteração química de revestimento, apresentam um alto poder terapêutico. Entretanto, antes de aplicá-los clinicamente é de extrema importância conhecer seus destinos e possibilidades de interação no organismo. A quantificação da biodistribuição de NPMs por meio de suas características intrínsecas ainda se mostra como um desafio. A Biosusceptometria de corrente alternada (BAC) é uma técnica biomagnética que atua detectando a quantidade de materiais magnéticos em ambientes biológicos. Essa técnica, em relação às demais presentes no mercado, apresenta baixo custo e portabilidade. Baseado na problemática em torno da detecção e quantificação de NPMs, nesse estudo foi analisada a biodistribuição e eliminação de NPMs de ferrita de manganês revestidas com citrato e albumina via sistema BAC. Para isso, foram utilizados 100 ratos Wistar, separados em 2 grupos experimentais (NPMs revestidas com albumina e citrato) e 10 subgrupos, variando o tempo de eutanásia dos animais (1, 4, 12, 24 e 48 horas e 5, 10, 15, 30 e 60 dias após a administração). Para análise da biodistribuição, foram coletados 5 órgãos de interesse: fígado, pulmão, baço, rins e coração, além do sangue e, para análise da eliminação, foram coletadas as fezes dos animais. Foi possível observar a maior captação pelo baço e fígado (1 hora após a administração, o fígado apresentou uma concentração de  $0,782 \pm 0,08$  miligramas de NPMs por grama de tecido seco (mg/g) o baço  $0,643 \pm 0,06$  mg/g de NPMs revestidas com citrato. Para NPMs revestidas com albumina, no fígado foi detectado uma concentração de  $1,049 \pm 0,05$  mg/g de NPMs e, para o baço,  $0,723 \pm 0,06$  mg/g de NPMs). Apesar da alta captação do baço, a partir de 30 dias não foi possível detectar NPMs revestidas com citrato nesse órgão. Em 60 dias

foi comprovada a ausência de NPMs de ambos os revestimentos no baço e um decaimento significativo no fígado ( $0,01 \pm 0,009$  mg/g de NPMs para NPMs revestidas com citrato e  $0,03 \pm 0,01$  mg/g de NPMs para NPMs revestidas com albumina) demonstrando a existência de um mecanismo endógeno de metabolização e/ou agregação das NPMs. Através de um modelo farmacocinético, foi possível determinar o tempo de meia vida de distribuição e eliminação para fígado e baço, obtendo valores no fígado para NPMs revestidas com citrato de 1,95 minutos e 12,8 dias para distribuição e eliminação, respectivamente, e 1,85 minutos e 2,4 dias para NPMs revestidas com albumina. Já para o baço, para NPMs revestidas com citrato o tempo médio de distribuição foi de 36,4 minutos e de eliminação 1,4 dias, e para NPMs revestidas com albumina, 2 minutos e 2,6 dias respectivamente. Além da biodistribuição, foi possível determinar a eliminação de NPMs via fezes. O sistema BAC se mostrou eficiente para detecção de NPMs e estudos futuros serão realizados para melhor compreensão dos mecanismos de eliminação e/ou metabolização dessas partículas.

Palavras-chave: Biosusceptometria de Corrente Alternada, Nanopartículas Magnéticas, Biomagnetismo, Biodistribuição, Eliminação.

## Abstract

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been widely used in several studies due to their high versatility compared to other materials. MNPs presents small size, high magnetic susceptibility and, due to the possibility of biochemical alteration of its surface, enables a high level of theranostics applications. However, before applying them clinically, it is of paramount importance understand its destinations and possibilities of interaction in the organism. The biodistribution quantification of NPMs through their intrinsic characteristics still is a challenge. Alternating current biosusceptometry (ACB) is a biomagnetic technique that acts detecting a quantity of magnetic materials in biological samples. In comparison with the other techniques, ACB presents low cost and portability. Based on the lack of accessible techniques to study biodistribution and elimination process of MNPs, this work aimed to analyze the biodistribution and determine the elimination of manganese ferrite magnetic nanoparticles coated with citrate and albumin via BAC system. For this work, we used 100 Wistar rats, separated into 2 experimental groups (MNPs coated with albumin and citrate) and 10 subgroups, changing the euthanasia time point (1, 4, 12, 24 and 48 hours and 5, 10, 15, 30 and 60 days after administration). For biodistribution analysis, we collected the blood and 5 organs of interest: liver, lung, spleen, kidneys and heart, and, for elimination analysis, we collected the animal's feces. It was possible observe a higher uptake by the liver and the spleen due to their characteristics of retention and uptake (1 hour after administration, the liver showed a concentration of  $0.782 \pm 0.08$  mg/g of citrate-coated MNPs e and the spleen  $0.643 \pm 0.06$  mg/g of MNPs. For MNPs albumin-coated, in liver, we found a concentration of  $1.049 \pm 0.05$  mg/g of MNPs was detected and, for the spleen,  $0.723 \pm 0.06$  mg/g of MNPs). Despite the high uptake of the spleen, after 30 days it was not possible to detect NPMs coated with citrate in this organ. In 60 days, the absence of

NPMs, from both coatings, in the spleen and a significant decay in the liver was shown ( $0.01 \pm 0.009$  mg/g of MNPs for citrate-coated MNPs and  $0.03 \pm 0.01$  mg/g of MNPs for albumin-coated MNPs), demonstrating the presence of an endogenous mechanism of metabolism or aggregation of MNPs. Through a pharmacokinetic model, it was possible to determine the half-life of absorption and distribution for the liver and the spleen obtaining values in the liver for citrate-coated NPMs of 1.95 minutes and 12.8 days for absorption and elimination, respectively, and 1.85 minutes and 2.4 days for MNPs albumin-coated. For the spleen, citrate-coated MNPs showed an average time of absorption was 36.4 minutes and elimination 1.4 days, and for albumin-coated MNPs, 2 minutes and 2.6 days respectively. In addition to biodistribution, it was possible to determine the elimination of MNPs through feces. The ACB was efficient for the detection of MNPs and future studies will be carried out to better understand the mechanisms of removal or metabolizing of these particles inside the animal's body.

Keywords: Alternate Current Biosusceptometry, Magnetic Nanoparticles, Biomagnetism, Biodistribution, Elimination

# 1. Introdução

## 1.1 Nanopartículas Magnéticas

Materiais nanoestruturados têm tido grande atenção da comunidade científica e têm sido muito estudados. Isso é devido ao fato de que este tipo de material apresenta um número de átomos muito maior na sua superfície do que em seu núcleo [1, 2]. Isso faz com que esses materiais apresentem novas propriedades físicas, ou alterem bruscamente as propriedades encontradas no mesmo tipo de material quando em escalas macroscópicas. Uma série de alterações nas propriedades de um material podem ocorrer, apenas levando a escala dimensional deste material à escala nanométrica, como alterações no ponto de fusão, condutividade elétrica, fluorescência, reatividade química e comportamento magnético [3, 4].

Um dos tipos de materiais nanoestruturados mais interessantes são as nanopartículas magnéticas (NPMs). Esses materiais apresentam um comportamento magnético denominado superparamagnetismo, muito diferente do comportamento que o mesmo material apresenta quando em escala macroscópica. Devido a esse comportamento, descritos pela função de Langevin e modelo de Debye, esses materiais apresentam intensa e rápida resposta coletiva à campos magnéticos externos [5, 6]. Inclusive, ao mesmo tempo que têm resposta intensa à campos externos, não apresentam momento magnético coletivo ao se desligar o campo externo [5]. Uma vez que não permanecem magnetizadas após o campo magnético externo cessar, as NPMs não interagem entre si formando grandes aglomerados de partículas, que poderiam ser um problema em aplicações biológicas. Além disso, o comportamento superparamagnético também prevê a ausência de histerese magnética dentro de alguns limites. Assim, partículas com diâmetros entre 1 e 100 nm, podem ser seguramente associadas à campos magnéticos alternados moderados (na ordem de mT e até poucas dezenas de kHz) não

gerando aquecimento, o que favorece a exploração de suas propriedades de susceptibilidade magnética em aplicações biológicas.

Nanopartículas magnéticas tem ganhado cada vez mais interesse no meio científico devido às suas características intrínsecas, que conferem grande versatilidade e uma gama de diferentes aplicações a esses materiais [4, 7]. Com seu tamanho reduzido, esses materiais se tornam uma interessante ferramenta para estudos biológicos, principalmente quando aliadas à possibilidade de alterar quimicamente o seu revestimento, utilizando moléculas biocompatíveis específicas [8].

Além da possibilidade de alteração de revestimentos químicos, existe também a possibilidade de alteração do núcleo da partícula. Ao longo dos anos, vários núcleos magnéticos foram sintetizados a fim de melhorar o potencial das NPMs para suas diversas aplicações. Os núcleos comumente utilizados são magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maguemita ( $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) e ouro (Au). Entretanto, existem também os núcleos de ferrita ( $\text{MeFe}_2\text{O}_4$ ), que apesar de pouco estudados, apresentam interessantes propriedades magnéticas, e biocompatibilidade [1, 9, 10]. Dentre as NPMs de ferrita, destaca-se a ferrita de manganês. NPMs de ferrita de manganês demonstraram uma melhor resposta quando submetidas a um campo magnético externo, isso se deve ao fato de que o manganês aumenta a susceptibilidade do material, aumentando assim o potencial de resposta desses materiais [11-13].

Algumas NPMs já são comercializadas e utilizadas na medicina, essas partículas podem ser aplicadas no tratamento de células cancerígenas como agentes de entrega de calor no sistema de hipertermia magnética, vetorização de fármacos em *drug delivery systems*, marcação celular e biossensores [14-18]. Um exemplo é a NPM Nanotherm®, que através da excitação externa (aplicando-se um campo magnético alternado de amplitude e frequência acima dos limites comentados anteriormente) é possível aumentar

a temperatura desses materiais, com alta seletividade espacial, provocando morte celular [19]. Um outro exemplo é o Feraheme®, que possibilita tratar alguns tipos de anemia, ligadas à doenças crônicas renais, com a administração intravenosa de NPMs com um revestimento biodegradável [20]. NPMs também são utilizadas como marcadores em terapias com células tronco, associado a técnicas como o imageamento por ressonância magnética (MRI) ou microscopia, com o intuito de estudar a chegada dessas partículas em seu alvo ou sítio de interesse [21].

Atualmente já existem uma série de protocolos de imageamento via ressonância magnética que utilizam NPMs como meio de contraste. Nesse caso, sua utilização é justificada em relação à toxicidade apresentada por outros contrastes usuais já comercializados, como no caso do gadolínio [22]. Além disso, existe a possibilidade de alteração química do revestimento das NPMs, tornando possível o controle do tempo de circulação das partículas no sistema circulatório, como é o caso do Feridex® e do Resovist®, o que pode otimizar o protocolo de aquisição de imagens [22, 23].

Vale ressaltar que devido a essas propriedades, uma mesma NPM pode ser utilizada para ambos tratamento e diagnóstico ao mesmo tempo, tornando-a um material teranóstico. [24]. Além disso, devido à sua potencial interação com praticamente qualquer estrutura biológica, através de alterações químicas de revestimento e carga superficial, esses materiais possuem uma enorme perspectiva de expansão na ciência e medicina [7, 25].

## **1.2 Biodistribuição e técnicas de detecção de NPMs**

Antes desses materiais serem utilizados clinicamente, é de extrema importância conhecer a fundo as suas possibilidades de interação e destinos no organismo. Nesse cenário, os estudos utilizando animais têm papel fundamental, onde é possível analisar a

toxicidade e biodistribuição em situações *in vivo* e *ex vivo*. Ao serem aplicadas em situações *in vivo*, diversos fatores tanto do organismo (fisiologia, morfologia) como da partícula (tamanho, carga superficial, potencial zeta, núcleo da partícula, revestimento químico) contribuem para os diferentes tipos de interação no organismo [26, 27]. O revestimento químico da partícula é a camada de primeiro contato com o ambiente biológico, e assim, estudos de biodistribuição e farmacocinética de diferentes tipos de revestimento de NPMs possibilitam uma análise do comportamento e possível diferenciação na retenção e eliminação das partículas do organismo em função do revestimento utilizado [28].

Existem basicamente três princípios de detecção e quantificação de NPMs em órgãos e sistemas. O primeiro se baseia em métodos indiretos, onde a partícula é marcada com um material radioativo ou fluorescente, e o traçador é detectado (via atividade radioativa ou técnicas óticas) [29-31]. O segundo é baseada na detecção elementar das NPMs, como íons e átomos presentes nesses materiais, como o ICP-MS (*Ion Coupled Plasma Mass Spectrometry*) [32] e o ESR (*Electron Spin Resonance*) [33, 34]. O terceiro se baseia na detecção das partículas de maneira direta, ou seja, por suas propriedades magnéticas. A detecção e quantificação da biodistribuição de NPMs por meio de suas características intrínsecas, é uma das maneiras mais confiáveis e almejadas pela comunidade científica, uma vez que não dependem da marcação das NPMs com moléculas rastreáveis (o que implica em incerteza, uma vez que a ligação entre a molécula e a NPM pode se quebrar durante processos biológicos), e também não têm influências de íons e átomos normalmente presentes no organismo. Entretanto essa maneira de detecção ainda se mostra como um desafio. Algumas técnicas estão sendo otimizadas e aplicadas para esse propósito, como o MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) [35], MPI (*Magnetic Particle Imaging*) [36], MPS (*Magnetic Particle Spectroscopy*) [37], MRX

(*Magnetorelaxometry*) [38] e atualmente o sistema BAC (Biosusceptometria de Corrente Alternada) [39].

Em relação à forma de detecção das técnicas magnéticas citadas, o MRI detecta e quantifica a diferença de resposta causada pela presença de NPMs nas vizinhanças dos núcleos dos átomos de hidrogênio presentes em tecidos e materiais quando submetidos a um campo magnético externo e excitados por ondas de radiofrequência. O MPI usa campos magnéticos de corrente contínua (gerados por dois ímãs em configuração norte-norte) para produzir uma região livre de campo, saturando magneticamente as partículas fora da região de interesse, e posteriormente aplica um campo magnético alternado dentro da região livre de campo. Assim, o MPI utiliza da não linearidade da magnetização das NPMs para detectá-las através de bobinas de detecção, via lei de indução de Faraday. O ICP-MS utiliza plasma para ionizar a amostra e através de seu espectrômetro de massa separar e quantificar os íons presentes. O MPS é um sistema dedicado para detecção e determinação de características de nanopartículas magnéticas, composto por uma bobina de geração de campo magnético e uma bobina de detecção que exploram a curva de magnetização não linear de NPMs quando expostas a um campo magnético sinusoidal. A uma dada frequência e amplitude de campo de excitação, o espectro do MPS avalia o desempenho das NPMs durante a excitação através de alterações no momento magnético espectral das NPMs para estudar processos biológicos como agregação e aglomeração. O ESR é baseado na alteração dos níveis de energia de íons ou átomos através da distribuição da radiação quando submetidos a um campo magnético externo variável. A MRX é uma técnica que utiliza SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) e OPM (*Optically Pumped Magnetometers*) para detectar o decaimento de magnetização de MNPs após uma rápida exposição a um campo magnético [32, 35-38, 40-44].

A Biosusceptometria de corrente alternada (BAC) é uma técnica biomagnética regida pelo eletromagnetismo clássico que basicamente atua como um detector de materiais com alta susceptibilidade magnética. Essa técnica já é muito bem estabelecida para avaliação da contratilidade e motilidade gástrica em animais e humanos [45, 46] e avaliação da desintegração, trânsito, e controle de qualidade de comprimidos magnéticos em animais e humanos [47-49].

Mais recentemente, a técnica BAC vem sendo utilizada para detecção e quantificação de NPMs com núcleo de ferrita de manganês, sendo utilizada para a análise *ex vivo* do perfil de acúmulo nos órgãos [40], internalização celular e captação [50]. Também foi utilizada no monitoramento *in vivo* de NPMs na corrente sanguínea [51] e captação pelo fígado [40] e avaliações de perfusão renal [52] e cerebral [39] e inclusive para a formação de imagens planares de NPMs em tempo real [53].

Nesse contexto, a técnica BAC aparece como uma alternativa para o estudo da biodistribuição de diferentes tipos de NPMs. Vale ressaltar que esta técnica já foi comparada e validada com técnicas estabelecidas para estudos de biodistribuição como o ESR [40].

Em relação a outras técnicas *gold standard*, a técnica BAC apresenta vantagem na sua portabilidade, baixo custo, simplicidade na utilização e eficiência na detecção de materiais magnéticos nanoestruturados com baixa concentração de material magnético, sendo possível realizar aquisições em tempo real, tornando-se uma potente ferramenta a ser empregada tanto no monitoramento dinâmico *online in vivo*, quanto em quantificações *ex vivo* de biodistribuição das NPMs [45, 51].

### 1.3 Motivação e Alvo

Nanopartículas magnéticas são materiais de extrema versatilidade e, devido às suas características intrínsecas e propriedades magnéticas, vêm sendo alvo de diversos estudos na comunidade científica. Visto que esses materiais apresentam inúmeras aplicações (aplicabilidades, funcionalidades, finalidade, utilidade) e possíveis aplicações clínicas, já que possuem um potencial teranóstico, ensaios pré-clínicos são de extrema importância para conhecer a fundo todas suas possibilidades de interação.

Uma vez que materiais nanoestruturados são administrados em um organismo, é de fundamental importância entender suas possíveis interações e perfis de retenção e eliminação. Estudos de biodistribuição em tempos longos são essenciais para o entendimento dessas possíveis interações e posterior metabolização e/ou eliminação, principalmente para novos tipos de NPMs. Estudos de eliminação de NPMs são tão importantes quanto estudos de biodistribuição. Nesse sentido, Lacava *et al.*, 2012, realizaram estudos de biodistribuição e eliminação de NPMs em tempos longos (até 180 dias após a administração) e a partir dos dados obtidos, propuseram um modelo compartimental, em que as equações descreviam o perfil de decaimento do sinal, e permitiam a obtenção do tempo de meia vida de distribuição e eliminação de NPMs de magnetita revestidas com dextrano [41, 54]. Vale ressaltar que graças a trabalhos deste gênero, o FDA (*Food and Drug Administration*) retirou do mercado algumas NPMs já utilizadas em rotinas clínicas, que até recentemente eram comercializadas como o Resovist®, o Feruglose® e o SENEREM®, devido a sua dificuldade de eliminação. Entretanto, ao mesmo tempo que determinou a retirada dessas estruturas citadas, o FDA também foi responsável por aprovar, no mesmo ano, mais 77 medicamentos à base de nanopartículas para aplicações clínicas [55, 56].

Vale ressaltar que as nanopartículas que serão analisadas neste trabalho apresentam manganês em sua composição. Excessos de manganês no organismo podem desencadear uma doença neurodegenerativa chamada manganismo. Sendo assim, é de extrema importância o estudo da retenção e eliminação deste tipo de NPM do organismo. Definir suas vias de captação, eliminação e o tempo associado a esses processos, pode gerar dados importantes que podem contribuir a definir protocolos de administração, intervalo entre repetição de exames e tratamentos, entre outros fatores de interesse clínico. Apesar deste fato, nosso grupo tem trabalhado com doses de manganês muito abaixo dos limites tóxicos, e até o momento não observou efeitos neurodegenerativos nos animais estudados.

A técnica BAC apresenta baixo custo e demonstrou eficiência na detecção e quantificação de nanopartículas tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, tornando-se uma ótima alternativa para estudos de biodistribuição. Desta forma, baseado em estudos prévios desse laboratório e na problemática apresentada em torno da retenção e eliminação de partículas do organismo, bem como nas técnicas atualmente utilizadas para esse tipo de estudo, o objetivo deste trabalho é aplicar o sistema BAC para estudar a biodistribuição e eliminação de NPMs de ferrita de manganês revestidas com citrato e albumina do soro bovino em tempos longos, visando o entendimento e determinação das vias de retenção, possível metabolização e eliminação das partículas.

## **2. Objetivos**

Em termos gerais, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de distribuição e eliminação, em tempos longos, através da administração intravenosa de NPMs revestidas com citrato e albumina do soro bovino.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o perfil de retenção de NPMs de ferrita de manganês revestidas com citrato;
- Avaliar o perfil de retenção de NPMs de ferrita de manganês revestidas com albumina do soro bovino;
- Avaliar o perfil de eliminação de NPMs de ferrita de manganês revestidas com citrato;
- Avaliar o perfil de eliminação de NPMs de ferrita de manganês revestidas com albumina do soro bovino;
- Determinação do tempo médio de distribuição e eliminação de NPMs no fígado;
- Determinação do tempo médio de distribuição e eliminação de NPMs no baço.

## **6. Conclusão**

Neste estudo, realizamos a determinação do perfil de biodistribuição de NPMs de ferrita de manganês revestidas com citrato e albumina, do tempo de meia vida de distribuição e distribuição de órgãos como fígado e baço e eliminação via fezes de NPMs administradas via intravenosa via sistema BAC. O sistema BAC obteve bons resultados para a detecção de NPMs tanto em órgãos quanto nas fezes, mesmo com pequenas concentrações de NPMs.

O perfil de biodistribuição demonstrou uma maior captação no fígado e baço para ambos os revestimentos devido as características morfológicas e fisiológicas destes órgãos. Através dos dados obtidos, foi possível observar um perfil de decaimento de concentração ao longo dos 60 dias no fígado, a ausência de NPMs revestidas com citrato em 30 dias após a administração e a ausência de NPMs revestidas com albumina 60 dias após a administração. Este perfil sugere que além da eliminação via fezes, exista um mecanismo endógeno de metabolização ou possível aglomeração das NPMs, resultando na perda da intensidade de sinal. Paralelamente aos dados de biodistribuição, foi possível determinar através de um modelo farmacocinético descrito na literatura, o tempo de meia vida de distribuição e eliminação para os órgãos que demonstraram a maior captação de NPMs: fígado e baço.

Através dos dados de eliminação via fezes das NPMs, foi possível traçar um perfil de eliminação de NPMs ao longo dos 60 dias analisados. Em determinados períodos, foi possível realizar uma correlação entre a diminuição de concentração presente nos órgãos e a eliminação via fezes, mostrando ser um dos mecanismos responsáveis de maior importância para eliminação de NPMs do organismo.

Conclui-se então que o sistema BAC oferece uma alternativa de baixo custo, portátil e versátil para avaliação da biodistribuição e eliminação de NPMs mesmo em baixas concentrações. Em relação a eliminação, os dados apresentados neste trabalho sugerem que as NPMs utilizadas demonstraram uma boa taxa de eliminação quando comparadas com NPMs e metodologias similares na literatura, sendo eliminadas via fezes a partir de 24 horas. Devido as características magnéticas e a boa taxa de eliminação, as NPMs apresentadas neste trabalho sugerem potencial para utilizações como agentes de contraste e hipertermia magnética.

Mesmo com dados de eliminação via fezes neste trabalho, estudos futuros utilizando a associação com outras técnicas de detecção de NPMs através das suas características intrínsecas são necessários para melhor elucidação da toxicidade, mecanismos de eliminação, agregação e/ou metabolização de NPMs.

## 7. Referências

1. Verde, E.L., et al., *Field dependent transition to the non-linear regime in magnetic hyperthermia experiments: Comparison between maghemite, copper, zinc, nickel and cobalt ferrite nanoparticles of similar sizes*. Aip Advances, 2012. **2**(3): p. 032120.
2. Kodama, R., *Magnetic nanoparticles*. Journal of magnetism and magnetic materials, 1999. **200**(1-3): p. 359-372.
3. Teja, A.S. and P.-Y. Koh, *Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles*. Progress in crystal growth and characterization of materials, 2009. **55**(1-2): p. 22-45.
4. Vatta, L.L., R.D. Sanderson, and K.R. Koch, *Magnetic nanoparticles: Properties and potential applications*. Pure and applied chemistry, 2006. **78**(9): p. 1793-1801.
5. Respaud, M., *Magnetization process of noninteracting ferromagnetic cobalt nanoparticles in the superparamagnetic regime: Deviation from Langevin law*. Journal of applied physics, 1999. **86**(1): p. 556-561.
6. Biederer, S., et al., *Magnetization response spectroscopy of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2009. **42**(20): p. 205007.
7. Pankhurst, Q.A., et al., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of physics D: Applied physics, 2003. **36**(13): p. R167.
8. Lübke, A.S., C. Alexiou, and C. Bergemann, *Clinical applications of magnetic drug targeting*. Journal of Surgical Research, 2001. **95**(2): p. 200-206.
9. Revia, R.A. and M. Zhang, *Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances*. Materials Today, 2016. **19**(3): p. 157-168.
10. Kandasamy, G. and D. Maity, *Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics*. International journal of pharmaceutics, 2015. **496**(2): p. 191-218.
11. Nunes, A.D., et al., *Manganese ferrite-based nanoparticles induce ex vivo, but not in vivo, cardiovascular effects*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 3299.
12. Zhen, Z. and J. Xie, *Development of manganese-based nanoparticles as contrast probes for magnetic resonance imaging*. Theranostics, 2012. **2**(1): p. 45.
13. Bakuzis, A., P. Morais, and F. Tourinho, *Investigation of the magnetic anisotropy in manganese ferrite nanoparticles using magnetic resonance*. Journal of Magnetic Resonance, Series A, 1996. **122**(1): p. 100-103.
14. Jose, J., et al., *Magnetic nanoparticles for hyperthermia in cancer treatment: an emerging tool*. Environmental Science and Pollution Research, 2019: p. 1-12.
15. Arruebo, M., et al., *Magnetic nanoparticles for drug delivery*. Nano today, 2007. **2**(3): p. 22-32.
16. Zasonska, B.A., et al., *Surface-Modified Magnetic Nanoparticles for Cell Labeling*, in *The Chemistry and Physics of Engineering Materials*. 2018, Apple Academic Press. p. 165-184.

17. Andreas, K., et al., *Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking*. Biomaterials, 2012. **33**(18): p. 4515-25.
18. Dzudzevic Cancar, H., et al., *A novel acetylcholinesterase biosensor: core-shell magnetic nanoparticles incorporating a conjugated polymer for the detection of organophosphorus pesticides*. ACS applied materials & interfaces, 2016. **8**(12): p. 8058-8067.
19. Jordan, A., *NanoTherm® Therapy*. Biomed Tech, 2011. **56**: p. 1.
20. Bullivant, J.P., et al., *Materials characterization of Feraheme/ferumoxytol and preliminary evaluation of its potential for magnetic fluid hyperthermia*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 17501-10.
21. Lewin, M., et al., *Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells*. Nature biotechnology, 2000. **18**(4): p. 410.
22. Thomsen, H.S., *Gadolinium-based contrast media may be nephrotoxic even at approved doses*. European radiology, 2004. **14**(9): p. 1654-1656.
23. Wang, Y.-X.J., *Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application*. Quantitative imaging in medicine and surgery, 2011. **1**(1): p. 35.
24. Chandra, S., S. Nigam, and D. Bahadur, *Combining unique properties of dendrimers and magnetic nanoparticles towards cancer theranostics*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(1): p. 32-49.
25. Rodrigues, H.F., et al., *Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration*. Int J Hyperthermia, 2013. **29**(8): p. 752-67.
26. De Jong, W.H., et al., *Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration*. Biomaterials, 2008. **29**(12): p. 1912-1919.
27. Poller, W.C., et al., *Magnetic particle spectroscopy reveals dynamic changes in the magnetic behavior of very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles during cellular uptake and enables determination of cell-labeling efficacy*. Journal of biomedical nanotechnology, 2016. **12**(2): p. 337-346.
28. Karimi, Z., L. Karimi, and H. Shokrollahi, *Nano-magnetic particles used in biomedicine: core and coating materials*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(5): p. 2465-2475.
29. Kumar, R., et al., *In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles*. ACS nano, 2010. **4**(2): p. 699-708.
30. Ding, H. and F. Wu, *Image guided biodistribution and pharmacokinetic studies of theranostics*. Theranostics, 2012. **2**(11): p. 1040.
31. Tate, J.A., M.D. Savellano, and P.J. Hoopes. *Biodistribution and imaging of fluorescently-tagged iron oxide nanoparticles in a breast cancer mouse model*. in *Energy-based Treatment of Tissue and Assessment VII*. 2013. International Society for Optics and Photonics.
32. Arakawa, A., et al., *High-resolution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry used to study transport of metallic nanoparticles through collagen-rich microstructures in fibroblast multicellular spheroids*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2019: p. 1-10.

33. Gamarra, L., et al., *Quantitative ferromagnetic resonance analysis of CD 133 stem cells labeled with iron oxide nanoparticles*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2008. **20**(20): p. 204150.
34. Chertok, B., et al., *Comparison of electron spin resonance spectroscopy and inductively-coupled plasma optical emission spectroscopy for biodistribution analysis of iron-oxide nanoparticles*. Molecular pharmaceutics, 2010. **7**(2): p. 375-385.
35. Wagner, S., et al., *Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization*. Investigative radiology, 2002. **37**(4): p. 167-177.
36. Arami, H., et al., *In vivo multimodal magnetic particle imaging (MPI) with tailored magneto/optical contrast agents*. Biomaterials, 2015. **52**: p. 251-261.
37. Loewa, N., et al., *Cellular uptake of magnetic nanoparticles quantified by magnetic particle spectroscopy*. IEEE Transactions on Magnetics, 2012. **49**(1): p. 275-278.
38. Wiekhorst, F., et al., *Magnetorelaxometry assisting biomedical applications of magnetic nanoparticles*. Pharmaceutical research, 2012. **29**(5): p. 1189-1202.
39. Próspero, A.G., et al., *Dynamic cerebral perfusion parameters and magnetic nanoparticle accumulation assessed by AC biosusceptometry*. Biomedical Engineering/Biomedizinische Technik, 2019.
40. Quini, C.C., et al., *Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry*. Nanomedicine, 2017. **13**(4): p. 1519-1529.
41. Estevanato, L.L., et al., *Long-term biodistribution and biocompatibility investigation of dextran-coated magnetite nanoparticle using mice as the animal model*. Journal of biomedical nanotechnology, 2012. **8**(2): p. 301-308.
42. Yu, E.Y., et al., *Magnetic particle imaging: a novel in vivo imaging platform for cancer detection*. Nano letters, 2017. **17**(3): p. 1648-1654.
43. Ladino, E.H., et al., *Detection of magnetic nanoparticles with a large scale AC superconducting susceptometer*. Superconductor Science and Technology, 2017. **30**(8): p. 084007.
44. Baffa, O., et al., *Development of an optical pumped gradiometric system to detect magnetic relaxation of magnetic nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2019. **475**: p. 533-538.
45. Miranda, J.R., et al., *A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions*. Phys Med Biol, 1997. **42**(9): p. 1791-9.
46. Andreis, U., et al., *Gastric motility evaluated by electrogastrography and alternating current biosusceptometry in dogs*. Physiol Meas, 2008. **29**(9): p. 1023-31.
47. Corá, L.A., et al., *Gastrointestinal transit and disintegration of enteric coated magnetic tablets assessed by ac biosusceptometry*. european journal of pharmaceutical sciences, 2006. **27**(1): p. 1-8.
48. Corá, L., et al., *Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by ac biosusceptometry*. Physics in Medicine & Biology, 2005. **50**(23): p. 5523.

49. Corá, L.A., et al., *Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current Biosusceptometry*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2003. **56**(3): p. 413-420.
50. Quini, C.C., et al., *Development of a protocol to assess cell internalization and tissue uptake of magnetic nanoparticles by AC Biosusceptometry*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2019. **473**: p. 527-533.
51. Prospero, A.G., et al., *Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry*. J Nanobiotechnology, 2017. **15**(1): p. 22.
52. Quini, C.C., et al., *Renal perfusion evaluation by alternating current biosusceptometry of magnetic nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2015. **380**: p. 2-6.
53. Soares, G.A., et al., *Multichannel AC Biosusceptometry System to Map Biodistribution and Assess the Pharmacokinetic Profile of Magnetic Nanoparticles by Imaging*. IEEE Trans Nanobioscience, 2019. **18**(3): p. 456-462.
54. Mejías, R., et al., *Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications*. Journal of Controlled Release, 2013. **171**(2): p. 225-233.
55. Kendall, M. and I. Lynch, *Long-term monitoring for nanomedicine implants and drugs*. Nature nanotechnology, 2016. **11**(3): p. 206.
56. Bobo, D., et al., *Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date*. Pharmaceutical research, 2016. **33**(10): p. 2373-2387.
57. Moraes, R., et al., *Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of AC biosusceptometry*. Physiol Meas, 2003. **24**(2): p. 337-45.
58. Corá, L., et al. *Magnetic multiparticulate colonic delivery systems evaluated by AC Biosusceptometry*. in *International Congress Series*. 2007. Elsevier.
59. Próspero, A.G., *Aplicação do sistema de biosusceptometria AC para monitoramento de nanopartículas magnéticas na circulação sanguínea*. 2015.
60. Nunes, A.D., et al., *Albumin Coating Prevents Cardiac Effect of the Magnetic Nanoparticles*. IEEE transactions on nanobioscience, 2019. **18**(4): p. 640-650.
61. Wagner, S., et al., *Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization*. International journal of nanomedicine, 2013. **8**: p. 767.
62. Elzoghby, A.O., W.M. Samy, and N.A. Elgindy, *Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems*. J Control Release, 2012. **157**(2): p. 168-82.
63. Wilhelm, C., et al., *Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating*. Biomaterials, 2003. **24**(6): p. 1001-11.
64. Brown, W., *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Vol. 313. 1993: Clarendon Press Oxford.
65. Xie, G., et al., *Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice*. Archives of toxicology, 2010. **84**(3): p. 183-190.
66. Yang, L., et al., *Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice*. Nanoscale, 2015. **7**(2): p. 625-636.

67. Bouabid, S., et al., *Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission*. Journal of neurochemistry, 2016. **136**(4): p. 677-691.
68. Schmitz, A.E., et al., *Interaction of curcumin with manganese may compromise metal and neurotransmitter homeostasis in the hippocampus of young mice*. Biological trace element research, 2014. **158**(3): p. 399-409.
69. Silva, A.C. and N.A. Bock, *Manganese-enhanced MRI: an exceptional tool in translational neuroimaging*. Schizophrenia bulletin, 2008. **34**(4): p. 595-604.
70. Knopp, T. and T.M. Buzug, *Magnetic particle imaging: an introduction to imaging principles and scanner instrumentation*. 2012: Springer Science & Business Media.
71. Denoual, M., et al., *Magnetorelaxometry using improved giant magnetoresistance magnetometer*. Sensors and Actuators A: Physical, 2010. **159**(2): p. 184-188.
72. Goel, R., et al., *Biodistribution of TNF- $\alpha$ -coated gold nanoparticles in an in vivo model system*. Nanomedicine, 2009. **4**(4): p. 401-410.
73. Sadauskas, E., et al., *Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2009. **5**(2): p. 162-169.
74. Tate, J.A., et al. *In vivo biodistribution of iron oxide nanoparticles: an overview*. in *Energy-based Treatment of Tissue and Assessment VI*. 2011. International Society for Optics and Photonics.
75. He, Q., et al., *In vivo biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: effects of particle size and PEGylation*. small, 2011. **7**(2): p. 271-280.
76. Keselman, P., et al., *Tracking short-term biodistribution and long-term clearance of SPIO tracers in magnetic particle imaging*. Physics in Medicine & Biology, 2017. **62**(9): p. 3440.
77. Choi, H.S., et al., *Renal clearance of quantum dots*. Nature biotechnology, 2007. **25**(10): p. 1165-1170.