

**AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CIRCULAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COM DIFERENTES TIPOS DE
REVESTIMENTO UTILIZANDO A TÉCNICA DE BIOSUSCEPTOMETRIA AC**

RODOLFO CICOLIN

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

**AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CIRCULAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COM DIFERENTES TIPOS DE
REVESTIMENTO UTILIZANDO A TÉCNICA DE BIOSUSCEPTOMETRIA AC**

RODOLFO CICOLIN

PROF. DR. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

DR. 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: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cicolin, Rodolfo.

Avaliação do tempo de circulação e biodistribuição de nanopartículas magnéticas com diferentes tipos de revestimentos utilizando a técnica de Biosusceptometria AC / Rodolfo Cicolin.
- 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 Próspero
Capes: 20900007

1. Nanopartículas. 2. Biosusceptometria de Corrente Alternada. 3. Farmacocinética. 4. Nanotecnologia. 5. Biomagnetismo.

Palavras-chave: Biodistribuição; Biosusceptometria AC; Nanopartículas Magnéticas ; Tempo de circulação.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente meus pais Luis Carlos e Sandra, por me ajudarem sempre. E a minha irmã Carla por todos os anos que vivemos juntos, meu cunhado Edelson e meu sobrinho Pietro.

Gostaria de agradecer minha namorada Larissa por esse 2 anos em que ela esteve junto na minha trajetória de mestrando desde o começo e me suportou sempre.

Quero agradecer ao meu orientador José Ricardo que me aceitou e sempre ajudou com tudo, e também ao meu coorientador que André o qual me aconselha sempre e me ajudou muito nesta etapa.

Agradeço às pessoas com quem convivi dia e noite, e morei junto Guilherme, Allan e João Victor, pela parceria, risadas, conversas de fim de noite e conselhos, assim como todas as alegrias e tristezas de morarmos juntos.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Biomag/LAFAR Prof. Diana, Deivid, Leonardo, Gustavo, Michael, Sergio, Marcelo, Laís, Gabriele, Gabriela, Abner, Gabriel e tantos outros, aos amigos da república RT Erik, Pedro, Bruno, Vinicius, João Miguel, Uelsen, Vitor, Jensen, Fernando, e aos amigos do futebol de terça.

Agradeço aos meus amigos de infância que sempre revejo e bebemos quando volto para minha cidade. E também aos meus amigos com que morei um dia e, devido ao trabalho, vejo poucas vezes.

E também agradeço a todos que, de uma forma ou outra, me ajudaram a trilhar este caminho, e com certeza a completar mais essa etapa da minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Nanopartículas Magnéticas (NPMs) são estruturas com grande potencial para inúmeras aplicações biomédicas. As NPMs podem ser revestidas, associando-as a moléculas, que além de aumentar sua biocompatibilidade, aumentam sua estabilidade coloidal e controlam suas dimensões. Para melhor entender o comportamento biológico e farmacocinético de NPMs com novos revestimentos é importante analisar alguns parâmetros como tempo de circulação e biodistribuição *in vivo*. Neste sentido, foi utilizada a técnica de Biosusceptometria AC (BAC), uma técnica de baixo custo e fácil manuseio, a fim de caracterizar e quantificar estes parâmetros farmacocinéticos para dois diferentes tipos de núcleos de NPMS (magnetitas e ferritas) com diferentes tipos de revestimento (Glicerol, Glicose, Glicose-Biotina, Glicerol-Biotina, Glicerol-Folato, Glicose-Folato, Dopamina, Tiron, Citrato e PEG). Assim, foram realizados experimentos envolvendo animais (ratos *Wistar*), divididos entre 11 diferentes grupos (de acordo com cada tipo de NPM). As NPMs foram administradas endovenosamente nos animais e monitoradas na circulação sanguínea *in vivo* e em tempo real. No final desse experimento, os animais foram sacrificados e coletados os órgãos para o estudo de biodistribuição *ex vivo*. Foram obtidos tempos de circulação na ordem de minutos na grande maioria das NPMs e o padrão de biodistribuição demonstrou uma preferência de acúmulo nos fígados e baços dos animais. Devido ao tamanho reduzido e rápida eliminação, as partículas apresentaram tempos curtos de circulação, porém foi possível caracterizar tanto este parâmetro quanto seu perfil de biodistribuição. Vale ressaltar que a grande maioria das NPMs utilizadas neste trabalho apresentam grande potencial para aplicações biomédicas e ainda não apresentam caracterização farmacocinética descrita na literatura. Desta forma, os dados aqui apresentados fornecem subsídios para futuras aplicações destes diferentes tipos de NPMs.

Abstract

Magnetic Nanoparticles (MNPs) are structures with great potential for numerous of biomedical applications. MNPs can be coated, binding with molecules, which increase their biocompatibility, increasing their colloidal stability and control their size. In order to understand the biological and pharmacokinetic behavior of the new coatings of MNPs, it is important to analyze a few parameters such as circulation time and *in vivo* biodistribution. In this study, the AC Biosusceptometry (ACB) technique was used, a low cost and easy handling technique, in order to characterize and quantify these pharmacokinetic parameters for two different type of MNPs core (magnetite and ferrites) with different types of coating (Glycerol, Glucose, Glycerol-Biotin, Glucose-Biotin, Glycerol-Folate, Glucose-Folate, Dopamine, Tiron, Citrate and PEG). Thus, experiments were carried out involving animals (*Wistar* rats), divided between 11 different groups (according to each type of MNPs). MNPs were administered intravenously to animals and monitored in blood circulation *in vivo* and in real time. At the end of this experimente, the animals were sacrificed and organs were collected for the study of biodistribution *ex vivo*. Circulation times in order of minutes were obtained in the majority of MNPs and the pattern of biodistribution demonstrated a preference for accumulation in the livers and spleens of the animals. Due to the small size and rapid elimination, the particles presented short circulation times, however it was possible to characterize both parameters, circulation times and biodistribution. It is worth mentioning that the vast majority os MNPs used in this study have great potential for biomedical applications and do not have pharmacokinetic characterization described in the literature yet. In that way, the data presented here provides subsidies for futures applications of these diferentes types of MNPs.

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	12
Lista de Abreviaturas.....	13
1.Introdução.....	14
2.Objetivos.....	21
3.Metodologica.....	22
3.1.Biosusceptometria.....	22
3.2.Nanopartículas Magnéticas.....	23
3.3.Curva de Calibração Seca.....	24
3.4.Grupos Experimentais.....	25
3.5.Experimentação Animal.....	26
3.6.Experimentação <i>in vivo</i>	27
3.7.Biodistribuição.....	28
3.8.NPMs em soro sanguíneo.....	29
3.9.Aquisição e quantificação dos dados.....	30
3.10.Análise e comparação dos dados.....	30

4.Resultados e Discussão.....	31
4.1.Curvas de calibração.....	31
4.2.Tempo de circulação.....	36
4.3.Biodistribuição.....	42
4.4.NPMs no soro sanguíneo.....	54
5.Conclusão.....	57
6.Referências.....	59

Lista de Figuras

- Figura 1: (a) Estrutura dos átomos de Magnetita e (b) estrutura dos átomos de Maghemita as estruturas pretas representa os Fe^{+2} , as estruturas verde são Fe^{+3} e as estruturas vermelhas são O^2 [1].....15
- Figura 2: Representação do sensor BAC, em azul são as bobinas de excitação e em vermelho as bobinas de detecção.....23
- Figura 3: Representação do sensor BAC Cavidade e exemplo do ganho de sensibilidade proporcionado por essa conformação. Imagem adaptada de Quini e colaboradores [2].....23
- Figura 4: Exemplo de posicionamento do sensor BAC e dos animais durante as medidas, imagem adaptada de [3].....28
- Figura 5: Esquema desde a obtenção do soro sanguíneo até a mensuração das NPMs no sensor Cavidade.....30
- Figura 6: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de óxido de ferro revestidas com Glicerol. A - Grupo 1 Glicerol; B - Grupo 2 Glicerol-Biotina; C - Grupo 3 Glicerol-Folato. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99; 0,99 e 0,99 respectivamente.....32
- Figura 7: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de óxido de ferro revestidas com Glicose, em escala logarítmica. A - Grupo 4 Glicose; B - Grupo 5 Glicose-Biotina; C - Grupo 6 Glicose-Folato. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99; 0,96 e 0,99 respectivamente.....33
- Figura 8: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de óxido de ferro revestidas com dopamina e tiron, em escala logarítmica. A - Grupo 7 Dopamina; B - Grupo 8 Tiron. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99 e 0,99 respectivamente.....34
- Figura 9: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de ferrita de manganês, em escala logarítmica. A - Grupo 9 Citrato; B - Grupo 10 Iônica; C - Grupo 11 PEG. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99, 0,99 e 0,99 respectivamente.....35

Figura 10: Exemplo de sinal original, sem filtro, da presença de NPMs no sangue, medido no coração do animal; a linha em vermelho representa o ajuste exponencial utilizado para as análises dos tempos de circulação.....37

Figura 11: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidos com glicerol, GCE é o Grupo Glicerol, GCEB é o Grupo Glicerol-Biotina e GCEF é o Grupo Glicerol-Folato. As barras representam a intensidade de sinal por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$43

Figura 12: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidos com glicerol, GCE é o Grupo Glicerol, GCEB é o Grupo Glicerol-Biotina e GCEF é o Grupo Glicerol-Folato. As barras representam a massa de partículas por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$44

Figura 13: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidas com glicose, GCO é o Grupo Glicose, GCOB é o Grupo Glicose-Biotina e GCOF é o Grupo Glicose-Folato. As barras representam a intensidade de sinal por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado. Foi considerado significativo para $p < 0,05$45

Figura 14: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidas com glicose, GCO é o Grupo Glicose, GCOB é o Grupo Glicose-Biotina e GCOF é o Grupo Glicose-Folato. As barras representam a massa de partículas por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$45

Figura 15: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo dopamina e tiron, referente à intensidade de sinal por grama de tecido seco, letras diferentes diferem estatisticamente entre si. O gráfico foi dividido em duas partes de eixo y, devido aos valores encontradas nos pulmões do grupo dopamina. Foi utilizado o teste T de Student não pareado e as letras diferentes diferem-se estatisticamente, foi considerado o $p < 0,05$46

Figura 16: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo dopamina e tiron, referente à massa de partículas por grama de tecido seco, letras diferentes diferem estatisticamente entre si. O gráfico foi dividido em duas partes de eixo y, devido aos valores encontradas nos pulmões do grupo dopamina. Foi utilizado o teste T de Student não pareado e as letras diferentes diferem-se estatisticamente, foi considerado o $p < 0,05$47

Figura 17: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo das NPMs de ferrita de manganês, PEG representa o Grupo PEG, Citrato o Grupo Citrato e Iônica o Grupo Iônica. As barras representam a intensidade de sinal por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$48

Figura 18: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo das NPMs de ferrita de manganês, PEG representa o Grupo PEG, Citrato o Grupo Citrato e Iônica o Grupo Iônica. As barras representam a massa de partículas por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$49

Figura 19: Gráfico demonstrando a intensidade de sinal BAC com o passar do tempo da interação das NPMs com soro sanguíneo, a linha preta representa o Grupo Citrato, a linha azul o Grupo Iônica e a linha vermelha o Grupo PEG.....54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Equação da reta encontrada para cada NPM, em estado sólido, utilizada no estudo.....36

Tabela 2: Valores do tempo de circulação para cada NPM utilizada no estudo. Letras diferentes representam diferenças entre as NPMs do mesmo grupo, com $p < 0,05$38

Lista de Abreviações

NPM – Nanopartícula Magnética

SPIONs - Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles

PEG - Polietileno Glicol

PVA - Álcool Polivinílico

USPIO - Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide

MRI - Imageamento por Ressonância Magnética

MPI - Imageamento de Partículas Magnéticas

ESR - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

ICP-MS - Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado

ESR - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

BAC - Biosusceptometria de Corrente Alternada

GCE - Glicerol

GCEB - Glicerol-Biotina

GCEF - Glicerol-Folato

GCO - Glicose

GCOB - Glicose-Biotina

GCOF - Glicose-Folato

DOPA - Dopamina

FDA – Food and Drug Administration

MRX – Magneto Relaxometria

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas Magnéticas (NPMs) são partículas de grande interesse para a comunidade científica, devido ao seu tamanho em escala nanométrica e suas propriedades magnéticas. Um dos fatores de interesse nas NPMs se dá ao fato que elas podem ser manipuladas utilizando campos magnéticos externo e, por isso podem ser utilizadas para inúmeras aplicações biomédicas [1].

NPMs são partículas formadas de materiais inorgânicos que apresentam propriedades físicas alteradas (em relação ao mesmo material em escala macroscópica) devido a sua escala nanométrica. Assim, possuem propriedades ópticas, elétricas, magnéticas e químicas e apresentam potencial para aplicações biomédicas. Áreas essas como o imageamento por Ressonância Magnética, sistema de *Drug delivery*, hipertermia magnética e separação de culturas celulares e de proteínas, dentre outras utilizações [4].

As NPMs são produzidas utilizando diferentes compostos como, por exemplo, metais puros como Fe, Co, Ti e Ni; ou óxidos de ferro como Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Também existem NPMs à base de ferritas como $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$, $\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$ e MFe_2O_4 (a letra M corresponde aos seguintes compostos: Cu, Ni, Mn, Mg e outros) e à base de ligas metálicas como CoPt e FePt [5, 6].

Em especial os óxidos de ferro chamados de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são os mais estudados e aplicados em técnicas biomédicas, principalmente por sua biocompatibilidade, comportamento superparamagnético e estabilidade química em temperatura ambiente [5].

A magnetita é um óxido de ferro que possui 2/3 dos sítios de ferro preenchidos com Fe^{+3} e 1/3 de Fe^{+2} como mostra a Figura 1a, com os oxigênios ocupando sítios

octaedros e tetraedros. Maghemita é um composto oxidado da magnetita com estruturas muito similares, mas com a preferência na maghemita dos sítios de Fe^{+3} permanecem octaedros, como mostra a Figura 1b [7, 8].

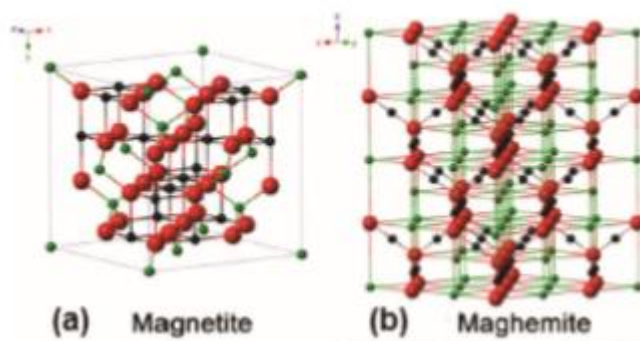


Figura 1: (a) Estrutura dos átomos de Magnetita e (b) estrutura dos átomos de Maghemita, as estruturas pretas representa os Fe^{+2} , as estruturas verde são Fe^{+3} e as estruturas vermelhas são O^{2-} [1].

Ambos os óxidos de ferro apresentam comportamento ferrimagnético quando em dimensões maiores que 20 nm, entretanto quando apresentam dimensões menores que 20 nm, apresentam comportamento superparamagnético [9, 10]. O comportamento superparamagnético é mais benéfico do que o comportamento ferrimagnético, quando NPMs são sintetizadas para utilização clínica. Isso ocorre principalmente porque as nanopartículas mostram um momento magnético característico e tem uma resposta rápida quando são submetidas a um campo magnético externo. Além disso, não apresentam magnetização remanente, ou seja, assim que o campo aplicado é cessado, as partículas voltam ao seu estado de orientação magnético aleatório e o momento magnético coletivo é nulo [10]. Devido a essas características, esses materiais são então classificados como *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles* (SPIONs).

Como relatado anteriormente, é importante que ambas as partículas, a magnetita e a maghemita, apresentem tamanhos reduzidos. A estabilidade coloidal destes materiais magnéticos depende do equilíbrio entre forças atrativas e forças repulsivas. Uma vez que as NPMs podem sofrer interações magnéticas dipolares, que apresentam uma forte

componente direcional, essas interações favorecem agregação das NPMs, aumentando assim seu tamanho hidrodinâmico [11]. Outro tipo de força atrativa é a força de Van der Waals. Esse tipo de força induz fortes atrações isotrópicas de curto alcance entre as partículas. Além disso, ainda existem dois tipos de forças repulsivas: a estérica e a eletrostática. Controlar essas forças é a chave para preparar partículas com boa estabilidade [12].

A fim de solucionar esse problema, são utilizadas técnicas de revestimento que permitem a associação com compostos, orgânicos ou não, na superfície dos núcleos de óxido de ferro, a fim de garantir a redução no seu tamanho. Na maioria dos casos esses compostos não só estabilizam e protegem as NPMs da biodegradação e agregação, mas também conferem a ela uma maior biocompatibilidade, estabilidade coloidal e maior área de superfície para interação [13].

O processo de revestimento de NPMs com diferentes tipos de agentes possibilita o aumento da estabilidade e ainda a adição de novas funções para as NPMs. Assim, pode-se funcionalizar as partículas, ou seja, agregar novas terminações moleculares para maiores interações das NPMs com determinadas estruturas de interesse. Esses revestimentos são necessários uma vez que há intenção de utilizar as NPMs em ambientes biológicos. As NPMs revestidas de formas apropriadas podem ser utilizadas para diferentes tipos de aplicações *in vivo* como agentes de contraste em Ressonância Magnética, reparação celular e tecidual, hipertermia magnética, separação celular e para vetorização de fármacos (*Drug delivery*) [12, 14].

No caso dos núcleos de óxido de ferro, os átomos comportam-se como agentes redutores/oxidantes que doam seus pares de elétrons isolados. Em solução aquosa, os átomos de Fe se desassociam deixando a superfície do óxido de ferro com terminais

hidroxila. Estes grupos de hidroxila, por sua vez, são anfóteros, o que lhes permitem reagir com ácidos ou com bases, dependendo do pH do meio [15].

Alguns grupos funcionais incluindo carboxilas, fosfatos e sulfatos são conhecidos por se ligarem aos grupos hidroxila, assim como grupos inorgânicos como sílica, ouro e gadolínio [15]. Outros tipos de materiais também mostraram-se eficientes no revestimento das partículas, como o caso dos polímeros. Na literatura os polímeros mais comuns são o Dextrano, Polietileno Glicol (PEG), Álcool Polivinílico (PVA) e Poloxâmeros [16, 17]. Esses polímeros favorecem uma maior biocompatibilidade para a partícula, como por exemplo, o dextrano que facilita a ligação da partícula com grupamentos amino das proteínas [18], aumentam o tempo de circulação das NPMs como o PEG [19], previnem aglomeração e deixam a partícula monodispersa como o caso do PVA [20].

Alguns destes revestimentos têm por característica manter o tamanho das SPIONs o mais reduzido possível como o caso das glicoses, gliceróis, ácidos fólicos, dopamina e tiron.

O glicerol é um emulsificante, aromatizante e excipiente para antibióticos. Ele forma diferentes tipos de cristais líquidos liotrópicos que são dependentes de água e temperatura. A sua viscosidade e bioadesividade aumentam o tempo de contato com os tecidos alvo, oferecendo assim uma forma estável para a liberação de drogas associadas a essas moléculas, aumentando a eficiência da terapia por *Drug delivery* [20]. O glicerol é um composto de fácil revestimento da partícula devido à sua similaridade com os ácidos oléicos, comumente usados na formulação de NPMs. Sendo assim, no revestimento, o glicerol ocupa o lugar antes pertencente aos ácidos oléicos [21]. A estrutura heterogênea do glicerol em solução aquosa permite incorporação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas e não apresenta perda de magnetização.

Outro composto usado para revestimento de NPMs é a glicose cuja finalidade é a estabilidade coloidal e a manutenção do tamanho reduzido da partícula. Esse fenômeno da glicose de controlar o tamanho das nanopartículas é observado quando as SPIONs são revestidas com Dextran, em que o terminal de glicose da sua estrutura ajuda na estabilidade da partícula revestida com Dextran, levando-a a um estágio de *Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide* (USPIO).

Algumas alternativas para este tipo de revestimento com finalidade de manter o tamanho reduzido e estabilizado é a utilização de dispersantes de baixo peso molecular tais como a dopamina e o tiron [22]. Estes dispersantes aumentam a estabilidade da partícula e resulta em diminuição do tamanho hidrodinâmico da NPM. Isso ocorre, principalmente, devido à formação de uma camada fina, bem definida e estável que reveste cada partícula [22]. Apesar de todas essas características esses compostos ainda seguem sem uma grande gama de utilização, sendo reportados em poucos casos como Amstad e colaboradores (2009), por exemplo.

Além da estabilidade coloidal, um fator que muitos pesquisadores buscam quando revestem as NPMs é a vetorização. Essa é uma característica que é muito estudada em aplicações de NPMs, pelo fato de garantir uma eficiência quando se procura atingir um destino final das NPMs no organismo. Com a crescente popularidade da hipertermia magnética, mostra-se evidente a necessidade de vetorizar as NPMs para estas se concentrarem apenas nos tecidos alvo, levando a uma menor chance de ter efeitos adversos, como lesionar células saudáveis [22]. Um possível agente de vetorização é o ácido fólico (ou folato), cujos receptores aos quais se ligam são expressos em células tumorais humanas, incluindo os tumores de ovários, pulmão, tórax, endotelial, renal e câncer de colón. O folato é ligado a última camada da NPM com o seu terminal γ -

carboxil, possui um peso molecular baixo e sua ligação não aumenta consideravelmente o tamanho hidrodinâmico da partícula [23].

Assim como o folato, a biotina é de grande utilização quando o assunto é vetorização das NPMs. Essa vitamina não atua apenas como receptor de um único composto, ela pode estar associada a receptores Her2 em células tumorais, e tem afinidade com a proteína multifuncional estreptavidina, o que permite por meio da ligação estreptavidina-biotina, uma ponte para duas proteínas permanecerem na mesma molécula, uma vez que sem essa ponte as proteínas não conseguem fazer interação entre si [2, 24, 25]. Isto se dá pelo fato que a biotina pode se ligar em uma extremidade com as proteínas e na outra com a estreptavidina, a qual possui dois terminais para ligação com duas moléculas de biotinas diferentes, e ambas com uma proteína.

A partir da vasta gama de possibilidades de revestimento das NPMs e características específicas de cada uma, é importante realizar-se estudos mais aprofundados para observar seu comportamento quando em ambiente biológico, pois cada modificação feita na partícula pode gerar comportamentos diferentes no organismo. Alguns dos estudos primordiais para entender os parâmetros e comportamento biológico de novas partículas são determinar o tempo de circulação e também sua biodistribuição, e assim entender qual o destino final dessas partículas e os sítios onde tem maior afinidade.

Uma das principais utilizações das NPMs é como agentes de contraste, usadas juntamente a técnica de Imageamento por Ressonância Magnética (MRI do inglês, *Magnetic Ressonance Imaging*) [23]. Nesta modalidade, é importante garantir por quanto tempo a partícula injetada ficará presente na corrente sanguínea, para controlar o tempo do exame e também garantir a total eliminação das partículas.

Majoritariamente, o parâmetro de tempo de circulação das NPMs é determinado em estudos utilizando técnicas como o próprio MRI [26, 27], Imageamento de Partículas Magnéticas (MPI, do inglês *Magnetic Particle Imaging*) [28], Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (ESR, do inglês *Electron Spin Resonance Spectroscopy*) [29] e Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) em que o tempo de circulação é determinado pela concentração dos agentes de contraste (NPMs), quando estas diminuem sua quantidade pela metade nas análises do plasma [30]. Devido à limitada quantidade de técnicas, é importante a existência de outras técnicas para o suporte nesse tipo de parâmetro.

A determinação da biodistribuição das NPMs é essencial para a aplicação clínica das partículas [14]. Esse assunto é tema de muitos estudos, que inclusive determinam que partículas de óxido de ferro tendem a serem capturadas por macrófagos, e apresentam maiores acúmulos no fígado e baço [31]. As principais técnicas utilizadas para esses fins são o próprio MRI [32], o já citado MPI [28], Espectroscopia de Absorção Atômica (do inglês, *Atomic Absorption Spectrophotometer*) [33, 34], e por ESR [35].

Essas duas técnicas, MRI e MPI são as mais utilizadas tanto para a determinação do tempo de circulação das partículas, quanto para a biodistribuição por oferecerem uma boa resposta em tempo real e também em medidas com os órgãos fora do ambiente biológico. No entanto, essas técnicas possuem algumas limitações como o fato do MRI não detectar as NPMs diretamente, e sim a interação das partículas com os tecidos próximos a elas, tornando assim mais difícil de quantificar quando há pouca interação [36]. E o MPI é um sistema de custo e complexidade muito elevados e está disponível em poucos lugares no mundo, tornando-se inconvenientemente pouco acessível.

Dado esses fatos é de eminente necessidade uma alternativa para estudos de características primordiais como perfis do tempo de circulação e biodistribuição de novas NPMs sintetizadas, uma vez que mudando o revestimento das partículas elas apresentam novas propriedades em ambiente biológico e assim precisam de novos estudos para compreender seus comportamentos.

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma técnica já muito bem estabelecida na farmacotécnica [37] e vem crescendo cada vez mais no uso com matérias magnéticos nanoestruturados. Já foi utilizada para quantificação em tempo real do tempo de circulação [3] e também já foi validada como uma técnica capaz de quantificar a biodistribuição das NPMs de maneira *ex vivo* [38]. A BAC é uma técnica que apresenta como características versatilidade, baixo custo, fácil manuseio entre outras.

Desta forma, é necessário avaliar os perfis de circulação e biodistribuição de NPMs revestidas e funcionalizadas com diferentes tipos de materiais utilizando a técnica BAC como uma forma alternativa às demais técnicas padrão para o procedimento.

2. OBJETIVO

O objetivo deste projeto é utilizar a técnica BAC para avaliar os perfis de circulação e biodistribuição de diferentes tipos de NPMs.

Sendo objetivos específicos deste projeto:

- Aplicar as NPMs *in vivo* para a avaliação dos seus tempos de circulação utilizando a BAC;
- Mensurar o decaimento de sinal magnético das NPMs quando em contato com o soro sanguíneo;

- Construir uma curva de calibração das NPMs em estado sólido;
- Analisar a biodistribuição das NPMs, em órgãos de interesse, de forma *ex vivo*;

3. METODOLOGIA

3.1. Biosusceptometria AC

Para as análises dos tempos de circulação das NPMs foi utilizado o sensor de Biosusceptometria AC convencional. Este sistema dispõe de duas bobinas de excitação e duas bobinas de detecção. Utilizando um amplificador lock-in e um amplificador de áudio é aplicada uma corrente AC nas bobinas excitadoras, que geram um campo magnético, como mostra a Figura 2. Em cada extremidade do sensor há um par de bobinas formado por uma bobina de detecção e uma bobina de excitação. O par localizado perto da amostra é o sistema de detecção: este par detecta o campo magnético gerado pela bobina excitadora somado ao campo magnético gerado pelo material magnético. Já o par distante da amostra é chamado de referência, o qual somente detecta o campo magnético gerado pela bobina excitadora. As bobinas detectoras são construídas em configuração gradiométrica de primeira ordem o que possibilita a subtração do campo magnético externo, o gerado pela bobina de excitação, restando assim apenas o sinal do campo magnético gerado pela amostra.

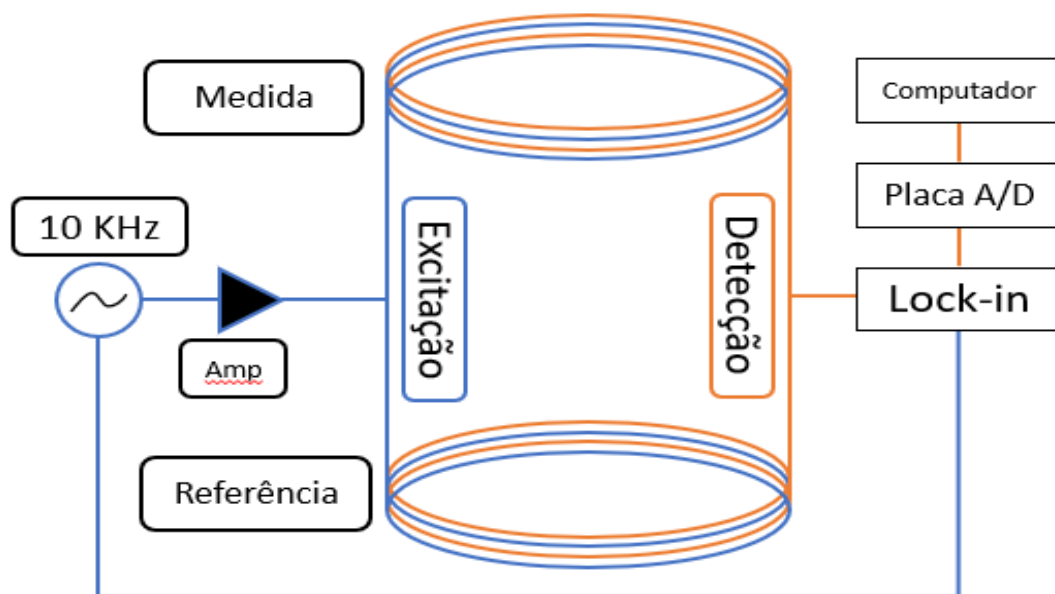


Figura 2: Representação do sensor BAC, em azul são as bobinas de excitação e em vermelho as bobinas de detecção.

Para as análises de biodistribuição foi utilizada uma outra conformação do sensor BAC, denominado sensor tipo cavidade, este sensor possui uma cavidade no centro geométrico do sensor, o que permite que as amostras sejam posicionadas nessa cavidade a fim de obter um ganho no sinal obtido dos materiais magnéticos como mostra a Figura 3 [39].

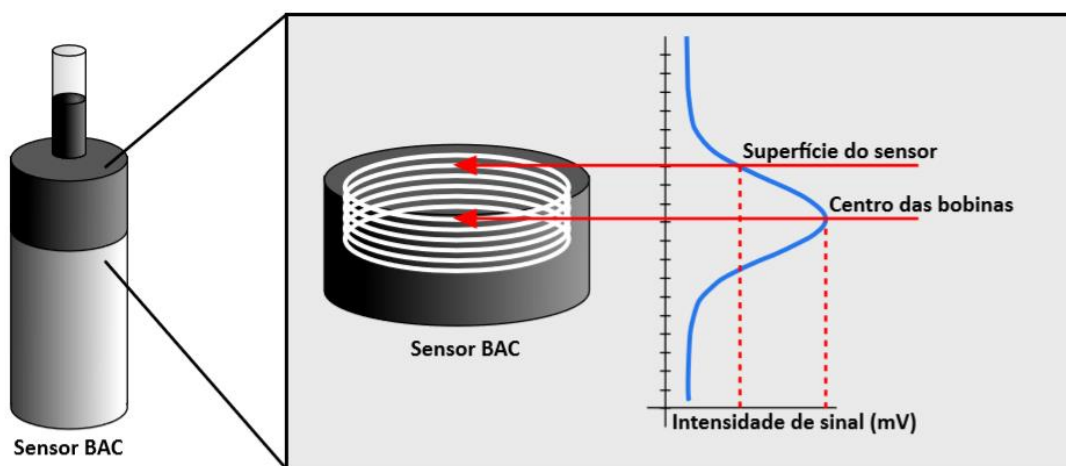


Figura 3: Representação do sensor BAC Cavidade e exemplo do ganho de sensibilidade proporcionado por essa conformação. Imagem adaptada de [38].

3.2. Nanopartículas Magnéticas

As NPMs utilizadas nesse estudo foram basicamente dois tipos: as com núcleo de óxido de ferro e com núcleo de ferrita de manganês.

As magnetitas foram sintetizadas pelo método de refluxo de complexos de ferro (III) e decomposição térmica descrito por [40, 41]. Essas NPMs foram revestidas com, glicerol, glicerol-biotina, glicerol-folato, glicose, glicose-biotina, glicose-folato, tiron e dopamina, e apresentavam tamanho hidrodinâmico com cerca de 6 nm. Seus potenciais zeta, em água, pH 7,4, em torno de +20 mV para a dopamina e -30 mV para as demais partículas. Suas concentrações eram de 30 mgFe/ml para dopamina, glicerol-biotina, glicose-biotina, glicose-folato e 35 mgFe/ml para glicerol, glicerol-folato, glicose, tiron. Todas as NPMs foram cedidas pelo Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Departamento de Química Fundamental da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Koiti Araki.

As NPMs com núcleo de ferrita de manganês, foram sintetizadas pelo método de coprecipitação descrito por [42], essas partículas foram utilizadas na sua forma iônica (sem revestimento e com carga superficial positiva), revestidas com citrato, e PEG, sendo que esses últimos revestimentos foram utilizados para recobrir as NPMs iônicas. As NPMs apresentavam tamanho médio de 13 nm, potencial zeta em água pH 7,4, de -42 mV. Suas concentrações eram de 58,8 mg/ml para a NPM revestida com citrato, 68 mg/ml para a NPM iônica e 23,75 mg/ml para a NPM revestida com PEG. As NPMs foram fornecidas pelo laboratório de Ressonância Ferromagnética e Nanomagnetismo do Departamento de Física da Universidade Federal de Goiânia, sob orientação do Prof. Dr. Andris Bakuzis.

3.3. Curva de Calibração Seca

A fim de simular o comportamento magnético das NPMs quando retiradas em órgãos e tecidos e nas mesmas situações de mensuração das amostras biológicas, foi realizada uma calibração do sinal do sistema frente às NPMs secas. Este passo faz-se necessário uma vez que quando nessas situações a NPM se encontra imobilizada e não apresenta movimento browniano, o que pode ter consequências na sua resposta magnética [43]. Para a calibração, foi necessária a construção de um fantoma. Para o procedimento de criação do fantoma foram utilizados os seguintes materiais: gesso em pó, água destilada e NPM. Em um tubo de 1,5 ml tipo eppendorf foi adicionada uma quantidade de 0,15 gramas de gesso em pó, uma quantidade de água (20 μ l) e uma quantidade de NPM (10 μ l).

Após todos os procedimentos de solidificação do fantoma os respectivos eppendorfs de cada amostra foram posicionados no sensor Cavidade para a quantificação dos sinais magnéticos. A partir do fato de que o sistema BAC apresenta resposta linear [38, 39], e de que as quantidades de amostra de NPM eram limitadas, foi construído apenas um fantoma de calibração para cada NPM. Os demais pontos foram estipulados, lembrando que a resposta do sensor BAC é linear, é possível utilizar os valores intensidade de sinal adquirida no sensor para calcular a massa de partículas presente na amostra.

Apesar de o sistema BAC convencional apresentar variações de sinal em função do volume da amostra, o sensor utilizado (Cavidade) permite que todo o volume da amostra seja posicionado no interior da bobina de detecção, diminuindo a dependência com o volume. Assim, os sinais detectados são proporcionais às quantidades de material magnético na amostra.

3.4. Grupos Experimentais

Os grupos do projeto foram separados de acordo com cada partícula totalizando 11 grupos, sendo eles:

Com núcleo de Óxido de ferro:

- Grupo 1 – Glicerol (GCE);
- Grupo 2 – Glicerol-Biotina (GCEB);
- Grupo 3 – Glicerol-Folato (GCEF);
- Grupo 4 – Glicose (GCO);
- Grupo 5 – Glicose-Biotina (GCOB);
- Grupo 6 – Glicose-Folato (GCOF);
- Grupo 7 – Dopamina (DOPA);
- Grupo 8 – Tiron.

E com núcleo de Ferrita de manganês:

- Grupo 9 – Citrato;
- Grupo 10 – Iônica;
- Grupo 11 – PEG.

Todos os grupos foram utilizados para as medidas de tempo de circulação, biodistribuição, assim como construídas suas respectivas curvas de calibração. Para as quantificações utilizando o soro sanguíneo foram utilizados apenas os Grupos 9, 10 e 11.

3.5. Experimentação Animal

Para este estudo foram utilizados 48 ratos, machos da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central da Unesp - Campus de Botucatu/SP (protocolo CEUA nº 1189).

3.6. Experimentação *in vivo*

Para esse experimento, foram utilizados 44 animais. Os animais foram divididos igualmente em 11 grupos (4 animais por grupo), sendo cada grupo referente a um tipo diferente de NPM descrito no item 3.2. Os animais foram previamente anestesiados com Uretano (99% - 1,5 mg/kg), submetidos a um processo cirúrgico para a canulação da veia femoral e recepção da administração intravenosa das NPMs. Com a cânula devidamente inserida na veia femoral e o animal em posição de decúbito dorsal, o sensor BAC convencional foi posicionado na altura do coração do animal para o início do experimento como exemplifica a Figura 4. Foi injetado 200 µl intravenosamente na veia femoral do animal, e em seguida uma administração de solução salina que assegura que toda quantidade de NPM injetada atingiu a circulação do animal. Com as NPMs na circulação elas passaram pelo coração, e com o sensor posicionado nesta região, foi possível registrar os sinais magnéticos das NPMs quando presente no coração, seguindo a metodologia desenvolvida e descrita anteriormente por este laboratório [3].

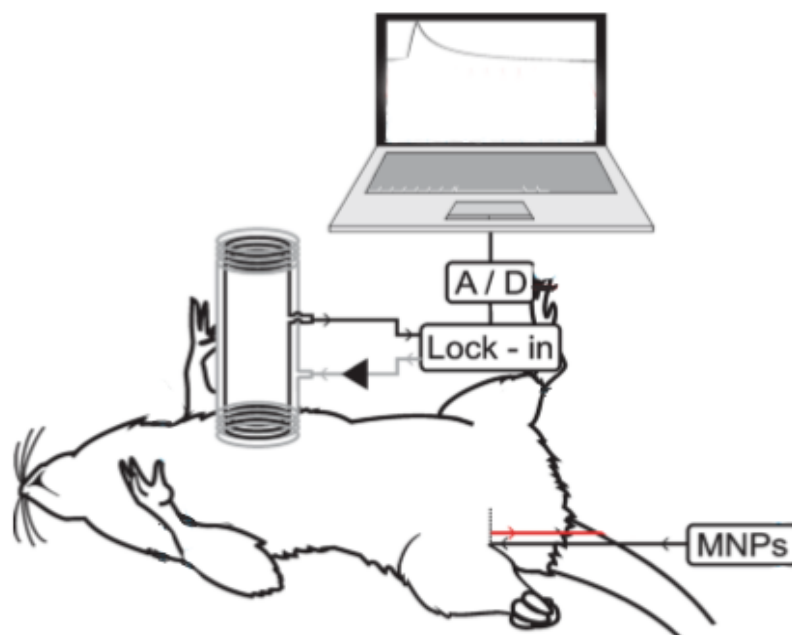


Figura 4: Exemplo de posicionamento do sensor BAC e dos animais durante as medidas, imagem adaptada de [3].

Ao final do experimento, após 40 minutos de análise e registro do sinal magnético os animais foram retirados de contato com o sensor e foram sacrificados 4 horas após o momento da administração das NPMs, pelo método de decapitação para a coleta dos órgãos de interesse (fígado, baço, pulmão, rim, coração e sangue), e posterior análise de biodistribuição das NPMs.

3.7. Biodistribuição

Todos os órgãos coletados ao final da experimentação animal foram separados individualmente em tubos de 15 ml do tipo falcon e foram mantidos em um freezer a uma temperatura de -22 °C para o congelamento. Após congelados, os órgãos foram postos para a secagem em um liofilizador, onde foram mantidos por dois dias para a secagem total. Quando retirados do liofilizador, utilizando um almofariz e pistilo, os órgãos foram triturados até ficarem homogêneos em forma de pó.

Com os órgãos em pó foi possível normalizar seus pesos, utilizando uma balança de precisão, para as medidas no sensor Cavidade. Neste processo, o órgão de menor peso (baço) é utilizado como peso de referência para os órgãos do mesmo animal. Após padronização dos órgãos, essa quantidade de amostra foi transferida para um tubo de 1,5 ml tipo eppendorf para melhor manuseio e quantificação dos dados.

Os tubos de 1,5 ml com as amostras de cada órgão foram posicionados na cavidade do sensor para a mensuração do sinal magnético da amostra.

3.8. NPMs em soro sanguíneo

Neste experimento, foram utilizados 4 ratos. Os animais foram anestesiados com Isoflurano e sacrificados por método de decapitação. Após a decapitação foram coletadas amostras de sangue, por método de rompimento dos vasos superiores. Primeiramente as amostras de sangue foram distribuídas em tubos de 15 ml tipo falcon e postas na geladeira -22 °C por 20 minutos, e em seguida foram levadas à centrifuga por 20 minutos com 4500 rpm e uma temperatura de 4 °C a fim de obter o soro sanguíneo. Com o soro coletado e utilizando um tubo de 1,5 ml foram realizadas as medidas como exemplifica a Figura 5. Em cada tubo foram adicionados 1 ml de soro e 0,2 ml de NPMs e medido os sinais no sensor Cavidade. Essa mensuração foi realizada em tempos pré-determinados de 10 min, 20 min, 30 min, 1 hora, 1 hora e 30 min e 2 horas após o primeiro contato do soro com as NPMs. Devido à quantidade limitada de partículas dos Grupos GCE, GCEB, GCEF, GCO, GCOB, GCOF, DOPA e Tiron, e por este estudo ter priorizado as análises de tempo de circulação e biodistribuição, nesta etapa foram utilizadas apenas as NPMs do Grupo Citrato, do Grupo Iônica e do grupo PEG.

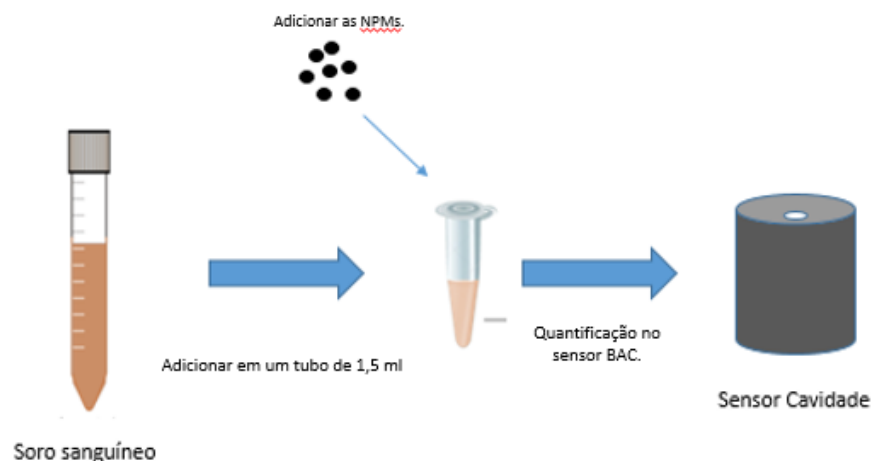


Figura 5: Esquema desde a obtenção do soro sanguíneo até a mensuração das NPMs no sensor Cavidade.

3.9. Aquisição e quantificação dos dados

A aquisição dos dados do tempo de circulação em tempo real foi feita por *Lock-in* (Standford Research System® modelo DSP SR830) e uma placa A/D Biopac® (Amplificador Biopac Systems modelos MP150) com uma frequência de aquisição de 20 Hz, os valores obtidos pelo sensor BAC são expressos em mV.

Para as outras medidas (biodistribuição, curva de calibração seca e sinal das NPMs no soro sanguíneo em tempos pré-determinados) as aquisições foram feitas por *Lock-in* (Standford Research System® modelo DSP SR830) e os valores encontrados, em mV, foram anotados manualmente em triplicata e foram quantificados em ambiente GraphPad Prism 6.

3.10. Análise e comparação dos dados

Todos os dados foram calculados média $\pm$ desvio padrão da média. Foi utilizado o teste T de Student não pareado para as análises de biodistribuição utilizando animais diferentes e o mesmo órgão e também para os dados de tempo de circulação. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Foi calculada a porcentagem que cada órgão acumulou de NPMs, referente ao total injetado. Para isso foi pesada a massa total dos órgãos depois de liofilizados e multiplicada essa massa total pela quantidade de partículas presentes por grama de tecido seco. Assim, foi possível obter a quantidade de NPMs que cada órgão captou. Após esse processo esses valores foram comparados com o total de massa de partículas injetado no animal e calculado as porcentagens da dose injetada que foi captada por cada órgão. Os dados foram calculados pela média $\pm$ desvio padrão da média.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Curvas de calibração

Como descrito no item 3.3, foram mensurados pontos para a curva de calibração a partir de um fantoma construído para cada NPM, a fim de obter a equação que descreve a resposta do sensor BAC para cada tipo de NPM. A Figura 6 apresenta a curva de calibração feita para obter a resposta do sistema BAC para as partículas do Grupo GCE, GCEB e GCEF. Para a obtenção dessas curvas, os valores foram calculados a partir da relação entre a curva de calibração das NPMs suspensas em líquido e do sinal e massa do fantoma produzido neste estudo. Desta forma foi possível obter a resposta do sistema BAC frente a diferentes massas de NPMs imobilizadas.

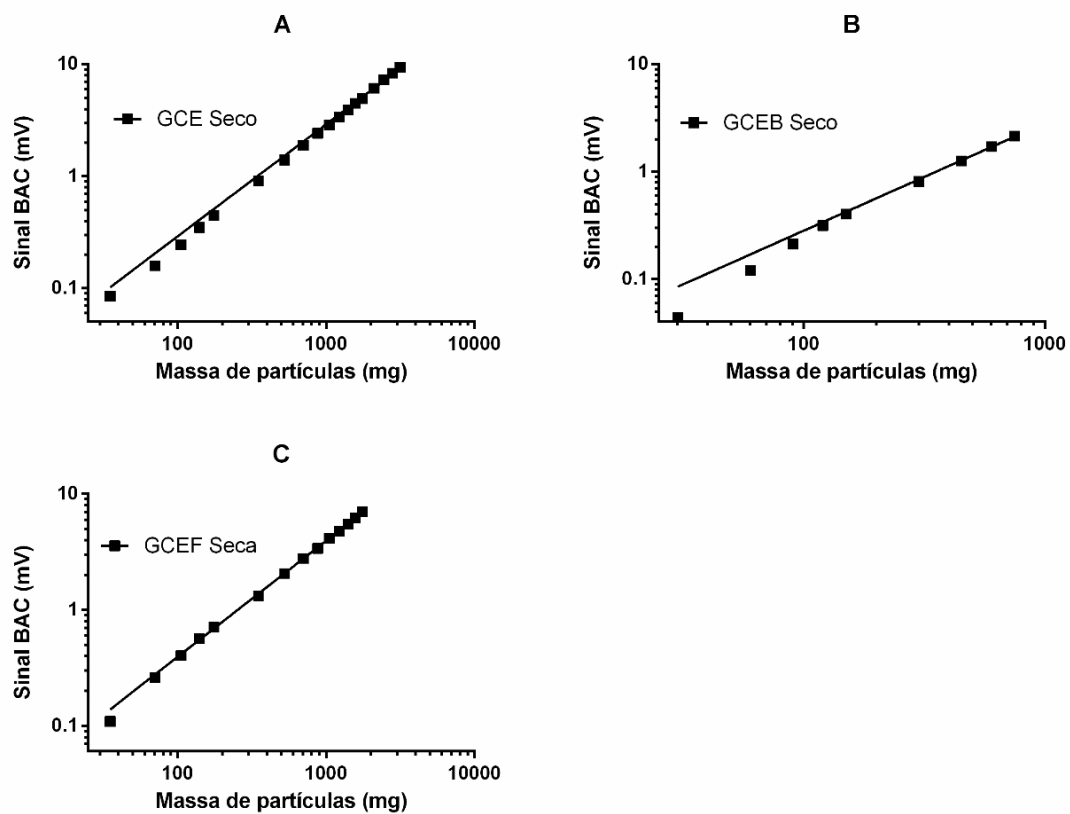


Figura 6: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de óxido de ferro revestidas com Glicerol. A - Grupo 1 Glicerol; B - Grupo 2 Glicerol-Biotina; C - Grupo 3 Glicerol-Folato. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99; 0,99 e 0,99 respectivamente.

A Figura 7 apresenta as curvas de calibração feitas para as partículas do Grupo GCO, GCOB e GCOF, onde os dados foram obtidos da mesma forma que os dados apresentados na Figura 6. Devido à quantidade limitada de partículas, os dados referentes ao grupo GCOB apresentaram uma menor quantidade de pontos para a curva de calibração calculados no gráfico. Entretanto, essa limitação não impossibilitou a criação da curva de calibração, e foi possível calcular um ajuste linear para este grupo.

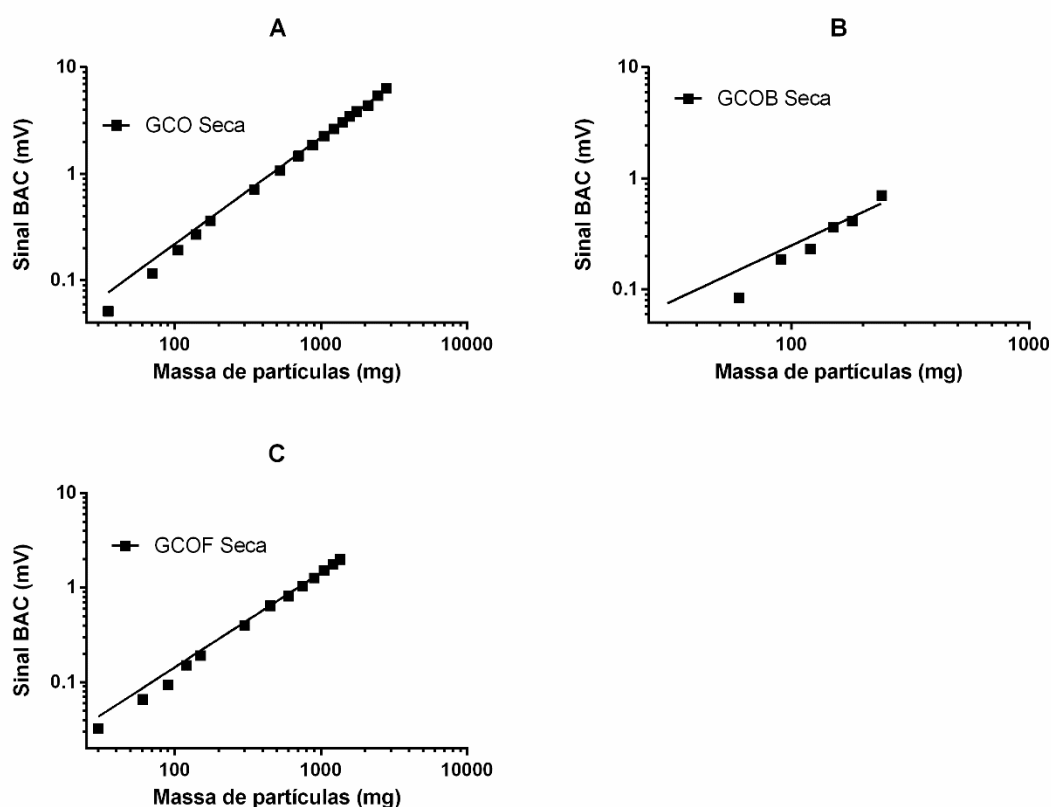


Figura 7: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de óxido de ferro revestidas com Glicose, em escala logarítmica. A - Grupo 4 Glicose; B - Grupo 5 Glicose-Biotina; C - Grupo 6 Glicose-Folato. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99; 0,96 e 0,99 respectivamente.

A Figura 8 apresenta a curva de calibração feita para as partículas do Grupo DOPA e Tiron em que foram calculados os valores a partir da massa e sinal BAC mensurados do fantoma que foi construído para cada NPM.

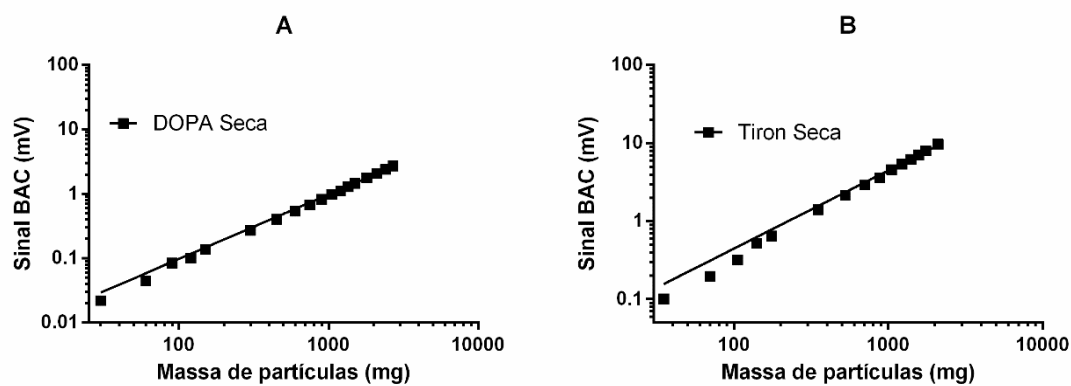


Figura 8: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de óxido de ferro revestidas com dopamina e tiron, em escala logarítmica. A - Grupo 7 DOPA; B - Grupo 8 Tiron. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99 e 0,99 respectivamente.

A curva de calibração do último grande grupo está exemplificada na Figura 9 contendo os Grupos Citrato, Iônica e PEG. O gráfico foi construído do mesmo modo já descrito para as Figuras anteriores.

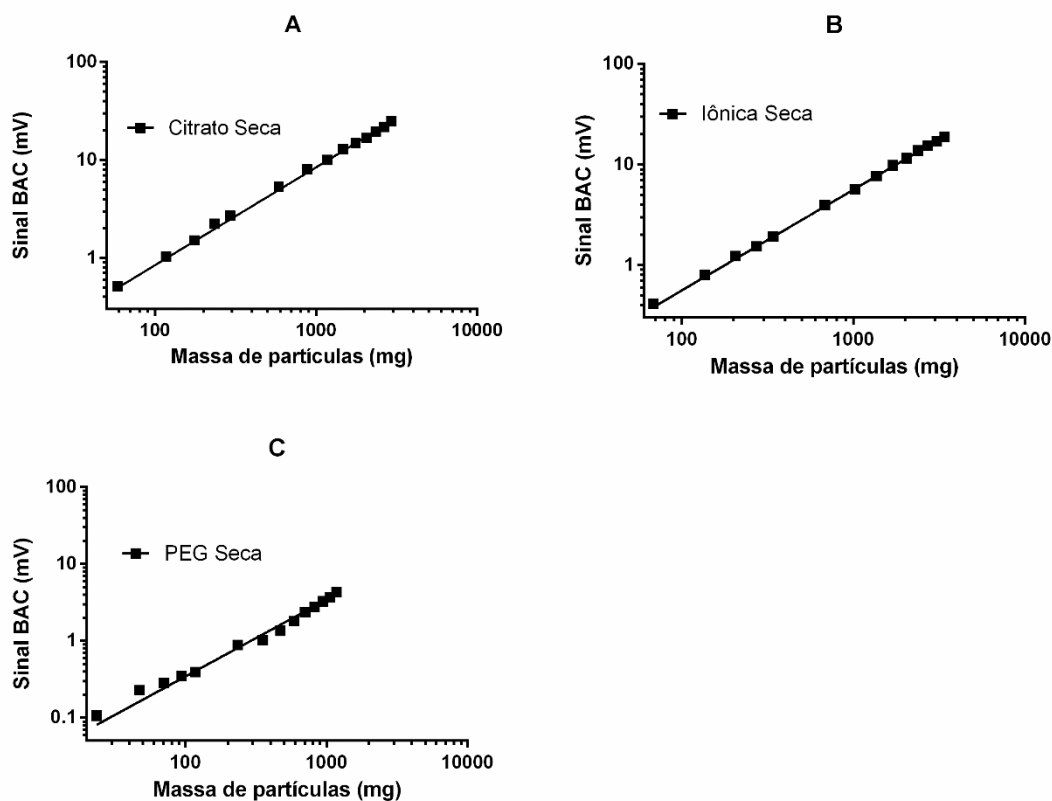


Figura 9: Curva de calibração para o Grupo das NPMs de ferrita de manganês, em escala logarítmica. A - Grupo 9 Citrato; B - Grupo 10 Iônica; C - Grupo 11 PEG. O ajuste utilizado apresentou um R^2 de 0,99, 0,99 e 0,99 respectivamente.

Foram feitas medidas de diferentes massas de NPMs, de cada grupo, a fim de estabelecer o parâmetro que correlaciona a quantidade de NPMs com o sinal obtido no sensor BAC. Assim, obteve-se uma equação da reta que representa o comportamento de cada NPM. Todos os parâmetros obtidos apresentam um comportamento semelhante, como mostrados nas Figuras 6, 7, 8 e 9. Esses sinais apresentam um comportamento linear, reforçando que os sinais obtidos pelo sistema BAC crescem linearmente com o aumento de massa de NPMs.

As equações da reta para todas as partículas estão expostas na Tabela 1:

Tabela 1: Equação da reta encontrada para cada NPM, em estado sólido, utilizada no estudo.

Nanopartícula Magnética	Equação da reta
Glicerol	$Y = 0,0029 * X - 0,0$
Glicerol-Biotina	$Y = 0,0028 * X - 0,0$
Glicerol-Folato	$Y = 0,0039 * X - 0,0$
Glicose	$Y = 0,0021 * X - 0,0$
Glicose-Biotina	$Y = 0,0024 * X - 0,0$
Glicose-Folato	$Y = 0,0014 * X - 0,0$
Dopamina	$Y = 0,0009 * X - 0,0$
Tiron	$Y = 0,0044 * X - 0,0$
Citrato	$Y = 0,0084 * X - 0,0$
Iônica	$Y = 0,0056 * X - 0,0$
PEG	$Y = 0,0034 * X - 0,0$

A curva de calibração seca foi adquirida com a massa de partículas presente no fantoma e feita correção linear. Dessa forma foi possível obter mais pontos via extrapolação dos dados e criado um fator de calibração a partir dos sinais obtidos de amostras das partículas líquidas, para correlacionar o valor do sinal obtido com a quantidade de NPMs.

4.2. Tempo de circulação

O perfil de sinal obtido pelas análises dos tempos de circulação das NPMs está exemplificado na Figura 10. Nesta figura, é analisado o pico máximo de intensidade de sinal e é realizado um ajuste exponencial, como mostra a Figura 10, para determinar o tempo de circulação de cada tipo de NPM.

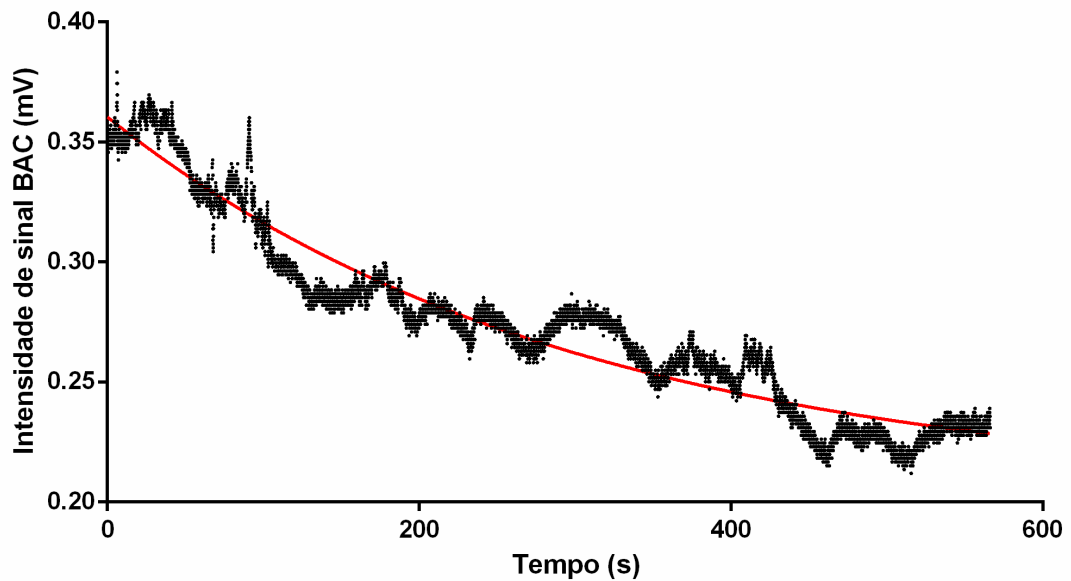


Figura 10: Exemplo de sinal original, sem filtro, da presença de NPMs no sangue, medido no coração do animal; a linha em vermelho representa o ajuste exponencial utilizado para as análises dos tempos de circulação.

Todos os animais apresentaram o mesmo perfil de sinal *in vivo* e em tempo real da presença de NPMs na circulação, como o exemplo apresentado na Figura 10. Este sinal apresenta um pico máximo após um sinal basal, representando a chegada da NPM no coração e depois um decaimento acentuado que representa a saída das NPMs da circulação e possível captação pelos órgãos responsáveis. O valor encontrado de tempo de circulação para cada NPM está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Valores do tempo de circulação para cada NPM utilizada no estudo. Letras diferentes representam diferenças entre as NPMs do mesmo grupo, com $p < 0,05$.

Nanopartícula Magnética	Tempo de circulação (s)
Glicerol	$40,35 \pm 14,56$
Glicerol-Biotina	$31,26 \pm 3,35$
Glicerol-Folato	$24,24 \pm 11,64$
Glicose	$50,08 \pm 9,62$
Glicose-Biotina	$48,34 \pm 8,21$
Glicose-Folato	$31,97 \pm 15,81$
Dopamina	$13,87 \pm 11,57$ (a)
Tiron	$34,10 \pm 6,67$ (b)
Citrato	$398,84 \pm 211,03$ (a)
PEG	$57,09 \pm 10,87$ (b)

Os tempos encontrados para as NPMs com núcleo de óxido de ferro do grupo Glicerol, Glicerol – Biotina, Glicerol – Folato, Glicose, Glicose – Biotina e Glicose – Folato, DOPA, Tiron e também para a ferrita revestida com PEG foram menores do que minutos.

Na literatura, é muito bem descrito que o tempo de circulação é influenciado diretamente pelo tamanho que as NPMs apresentam, entre outros fatores [3, 44]. Já foi reportado que nanopartículas maiores de 200 nm são rapidamente retiradas da circulação sanguínea via fígado e, principalmente, baço [45, 46]. Além disso, Choi e colaboradores (2007), reportam que NPMs menores que 6 nm são rapidamente retiradas da circulação sanguínea e filtradas pelos rins, sendo assim eliminadas, de modo acelerado, do organismo [47]. Apesar de este estudo limitar o tamanho da nanopartícula

para excreção renal, em torno de 6 nm, existem outros fatores que podem influenciar neste processo, e é bem aceito que este limite de filtração renal se aproxime de 10 nm [48]. Dessa forma, NPMs com diâmetros em torno de 10 nm ou menores são rapidamente retiradas da circulação via depuração renal, e além disso, nanopartículas com aproximadamente 200 nm, ou maiores, também são rapidamente retiradas da circulação sanguínea via captação hepática e esplênica (inclusive com maior velocidade do que NPMs que são sujeitas à filtração renal) [46]. Neste sentido, NPMs podem apresentar diversos valores de tempos de circulação, porém é bem estabelecido que partículas muito pequenas (10 nm ou menores) ou muito grande (200 nm ou maiores) apresentem tempos de circulação muito baixos. Assim, a fim de encontrar NPMs com valores de tempos de circulação relativamente altos, as partículas devem apresentar tamanhos que variam entre 10 e 200 nm.

As partículas dos Grupos GCE, GCEB, GCEF, GCO, GCOB, GCOF, DOPA e Tiron apresentavam um tamanho hidrodinâmico médio de 6 nm, e, dessa forma, são rapidamente removidas da circulação via depuração renal [49]. Vale ressaltar que o tamanho hidrodinâmico é muito importante para a avaliação do tempo de circulação da partícula, porém outros fatores também apresentam um papel importante quando analisado o tempo de circulação, estes parâmetros são o formato da partícula, revestimento, carga superficial, biocompatibilidade e interação com proteínas plasmáticas [44, 47].

Além desses fatores, deve-se lembrar que nas situações *in vivo* foram utilizadas doses baixas de NPMs (doses variando de 6 mg de Fe à 7 mg de Fe para as NPMs de óxido de ferro, e 13 à 11 mg de partículas para as NPMs de ferrita de manganês), e a presença de NPMs foi avaliada via sinal obtido pelo sistema BAC (que depende linearmente da massa de NPM). Além disso, o sistema trabalha como um transformador

de fluxo magnético, e uma série de fatores podem influenciar no sinal adquirido *in vivo*. Como o sistema se baseia na aplicação e detecção de campos magnéticos, o sinal do sistema apresenta certa dependência com a distância da amostra.

Assim, o baixo tempo de circulação encontrado, pode ser devido à baixa relação sinal ruído que o sistema BAC apresenta para alguns tipos de NPMs, fazendo com que o sinal detectado apresente níveis de sinal perto do ruído, e, conseqüentemente prejudique a detecção de alguns tipos de partículas *in vivo*. Essa relação sinal ruído também está relacionada com o fato de que as NPMs de menores diâmetros demonstram menores momentos magnéticos, e conseqüentemente geram menor intensidade de sinal no sistema BAC. Adicionado a esse efeito, quando as NPMs são introduzidas intravenosamente entram em contato com os fluidos biológicos, como o sangue, e podem sofrer interações prejudiciais às NPMs, exemplo disso é a interação com as proteínas plasmáticas descrita na seção 4.4. Nesse sentido, as NPMs podem diminuir sua mobilidade no fluido, e dependendo do revestimento, até desestabilizar e gerar a formação de pequenos agregados de NPMs. Esse efeito de diminuição de mobilidade (e conseqüente diminuição do movimento browniano) e de geração de agregado (relacionado com a geração de *flux-closures* – efeito onde as NPMs no interior dos agregados não contribuem para o momento magnético total do agregado) pode ter grande influência na capacidade da NPM gerar altas intensidades de sinal magnético em baixas amplitudes de campo excitador [38, 50, 51]. Todos esses fatores podem estar relacionados com o fato de que foi possível obter bons resultados para todos os tipos de partículas utilizados neste trabalho em situações *in vitro*, porém em situações *in vivo* podem ter limitado a sensibilidade de detecção de alguns tipos de NPM. Apesar desses fatores, vale lembrar que para NPMs de maiores diâmetros (entre 13 nm e 200 nm), o

sistema demonstra boa relação sinal ruído, e inclusive já foi aplicado com sucesso para a detecção *in vivo* de diferentes tipos de NPMs em diferentes situações [3, 38, 52].

Para as partículas de ferrita revestidas com citrato foram encontrados valores condizentes com a literatura. Próspero e colaboradores [3], utilizando a técnica BAC e NPMs semelhantes (ferrita de manganês revestidas com citrato, porém com concentração de 45 mg/ml, - e tamanho hidrodinâmico de 15 nm) encontraram tempos aproximados de 580 ± 66 s. As NPMs revestidas com citrato foram administradas com o mesmo volume que as demais, mas apresentam um maior sinal para a mesma massa de partículas, como amostrado na Figura 17.

As NPMs revestidas com tiron apresentaram um valor, estatisticamente diferente, do tempo de circulação comparada ao Grupo DOPA, que evidenciou o menor tempo de circulação entre todas as NPMs apresentadas neste estudo. Uma hipótese é referente a biodistribuição das NPMs revestidas com dopamina, que apresentam um grande acúmulo no pulmão. Após a primeira passagem pelo coração, mais de 50% da massa de partículas injetadas encontram-se no pulmão como mostra a seção 4.3, diminuindo assim a disponibilidade de NPMs na corrente sanguínea.

O grupo tiron não apresentou um acúmulo maior que 2% em nenhum órgão como será mostrado na seção 4.3. Assim, é possível que as partículas ficaram disponíveis por mais tempo na circulação até serem totalmente eliminadas.

Os desvios padrão dos dados aqui apresentados demonstraram valores relativamente altos, fato esse que pode estar associado ao fato de que as NPMs apresentavam quantidades limitadas e consequentemente o número de animais utilizados foi muito pequeno, apenas 4 animais. Outro aspecto que pode ter influenciado estes valores é o fato de que as medidas são dependentes do posicionamento do sensor

BAC exatamente na altura do coração, e tanto pode ocorrer erro de posicionamento pelo operador, quanto os animais podem apresentar diferenças nas posições morfológicas dos órgãos.

Para o grupo das NPMs de ferrita lônica não foi possível estipular um tempo de circulação, devido à baixa relação sinal-ruído do sinal magnético gerado pelas partículas no sistema BAC.

4.3. Biodistribuição

Para as análises de biodistribuição foram realizadas comparações em quatro grandes grupos. Sendo o primeiro, referente às NPMs de óxido de ferro revestidos com Glicerol, o segundo, referente às NPMs de óxido de ferro revestidas com Glicose, o terceiro, referente às NPMs de óxido de ferro revestidas com dispersantes dopamina e tiron e o quarto, referente às NPMs com núcleo de ferrita de manganês. Foram criados dois gráficos para cada grande grupo, um em que os valores dos sinais obtidos pela BAC não passam por nenhuma correção a partir de uma curva de calibração, e outro que é utilizada a curva seca para correlacionar o sinal obtido com a massa de partículas presente nas amostras.

A Figura 11 representa a intensidade de sinal adquirida pelo sensor BAC para as NPMs dos Grupos GCE, GCEB e GCEF. É possível observar que os maiores picos de sinal pertencem ao baço do Grupo GCE e Grupo GCEB, em seguida, é possível observar os picos de intensidade nos fígados dos Grupos GCE e GCEB.

Na Figura 12, em que os valores totais de intensidade de sinal são convertidos para massa de partícula por grama de tecido, é mostrado que os órgãos com maior acúmulo de partículas foram baços e fígados. Quando convertido pelo peso total do órgão o Grupo GCE apresenta um acúmulo de 46% do total injetado no fígado dos

animais o Grupo GCEB 36% e o Grupo GCEF 16%. Apesar da intensidade de sinal do baço observado na Figura 11 ser maior que o fígado, o baço é um órgão pequeno e apresentou um total de 1,4%, 1,8% e 1,3% do total injetado para os Grupos GCE, GCEB e GCEF respectivamente.

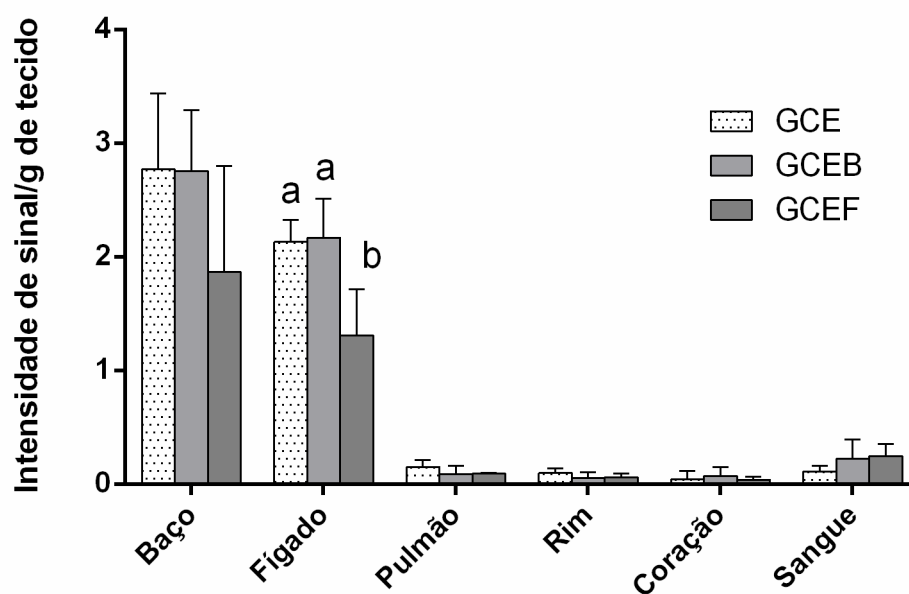


Figura 11: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidos com glicerol, GCE é o Grupo Glicerol, GCEB é o Grupo Glicerol-Biotina e GCEF é o Grupo Glicerol-Folato. As barras representam a intensidade de sinal por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$.

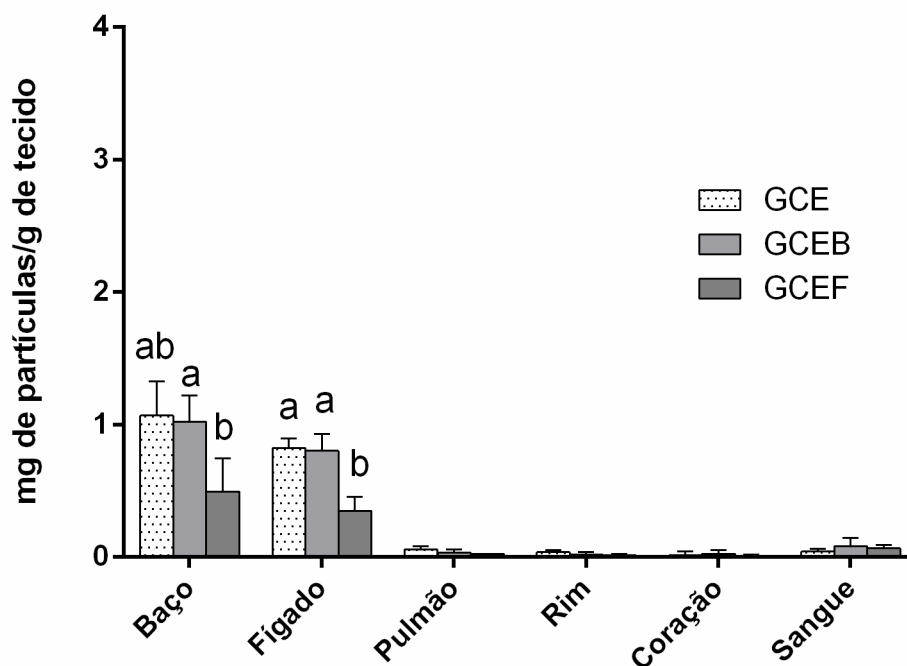


Figura 12: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidos com glicerol, GCE é o Grupo Glicerol, GCEB é o Grupo Glicerol-Biotina e GCEF é o Grupo Glicerol-Folato. As barras representam a massa de partículas por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$.

A Figura 13 nos mostra a intensidade de sinal obtida em cada órgão dos Grupos GCO, GCOB e GCOF em que apresenta um maior sinal para fígado e baço do Grupo GCOB seguido dos mesmos órgãos dos demais grupos. Para a quantificação da massa de NPMs por grama de tecido, a Figura 14 mostra que o grupo com a maior quantidade de partículas é o Grupo GCOF, que apresenta no fígado 59% da massa total de NPMs que foi injetada nos animais, e 3% no baço. Apesar da maior intensidade de sinal o Grupo GCOB apresentou 37% do total de NPMs no fígado e 1,4% no baço. O Grupo GCO teve um acúmulo de 30% do total injetado no fígado e 1,38% no baço. Para todos os demais órgãos dos 3 grupos a porcentagem foi menor de 1% para cada órgão.

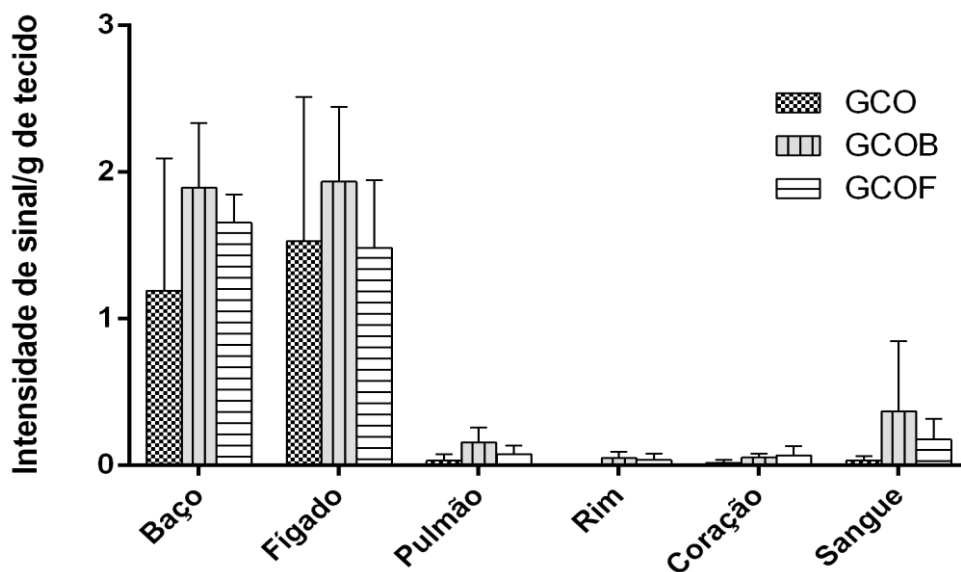


Figura 13: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidas com glicose, GCO é o Grupo Glicose, GCOB é o Grupo Glicose-Biotina e GCOF é o Grupo Glicose-Folato. As barras representam a intensidade de sinal por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado. Foi considerado significativo para $p < 0,05$.

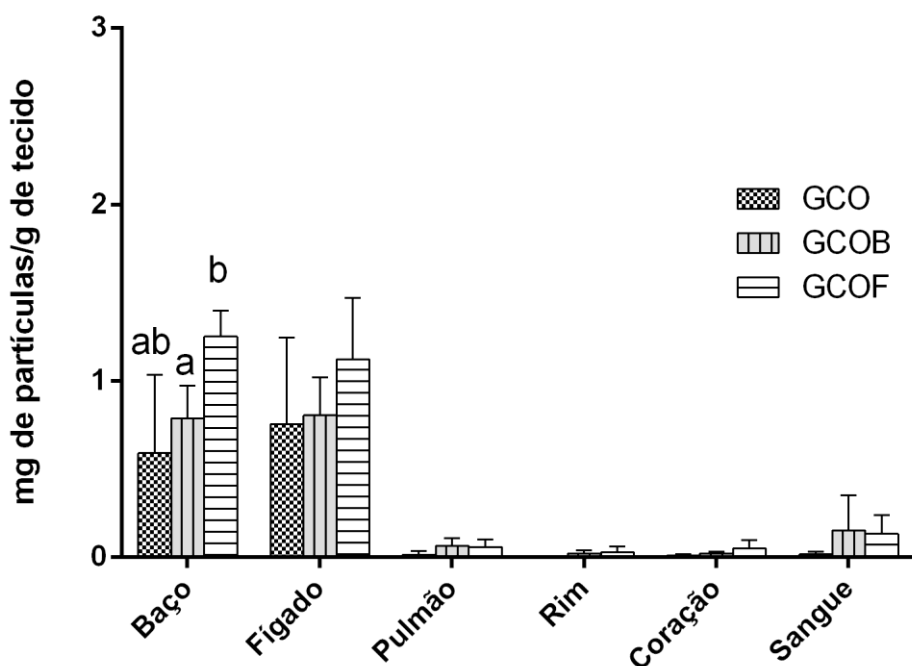


Figura 14: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo de NPMs de óxido de ferro revestidas com glicose, GCO é o Grupo Glicose, GCOB é o Grupo Glicose-Biotina e GCOF é o Grupo Glicose-Folato. As barras representam a massa de partículas por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$.

Os Grupos DOPA e Tiron foram quantificados e a Figura 15 nos mostra a intensidade de sinal por grama de tecido dos grupos, em que o pico máximo de sinal foi encontrado no pulmão do Grupo DOPA, seguido pelo sangue do mesmo grupo. A Figura 16 apresenta a quantidade de NPMs por grama de tecido para os Grupos DOPA e Tiron em que apresentou um maior acúmulo no pulmão do Grupo DOPA totalizando 53% do total injetado nos animais, seguida por 13% encontrado no sangue. O Grupo Tiron não apresentou um grande acúmulo apresentando 5% do total injetado quando somado todos os órgãos.

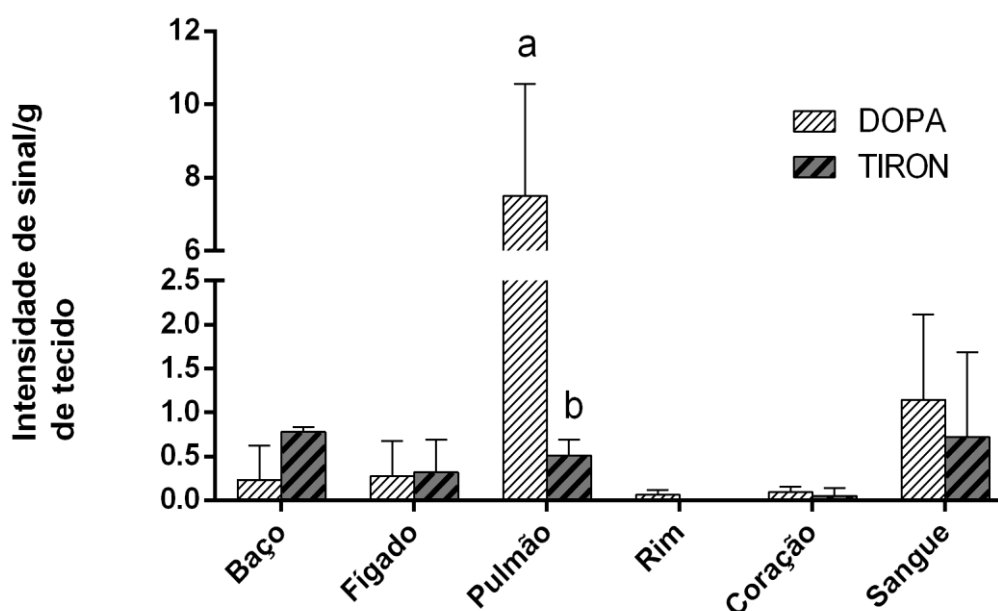


Figura 15: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo dopamina e tiron, referente à intensidade de sinal por grama de tecido seco, letras diferentes diferem estatisticamente entre si. O gráfico foi dividido em duas partes de eixo y, devido aos valores encontrados nos pulmões do grupo dopamina. Foi utilizado o teste T de Student não pareado e as letras diferentes diferem-se estatisticamente, foi considerado o $p < 0,05$.

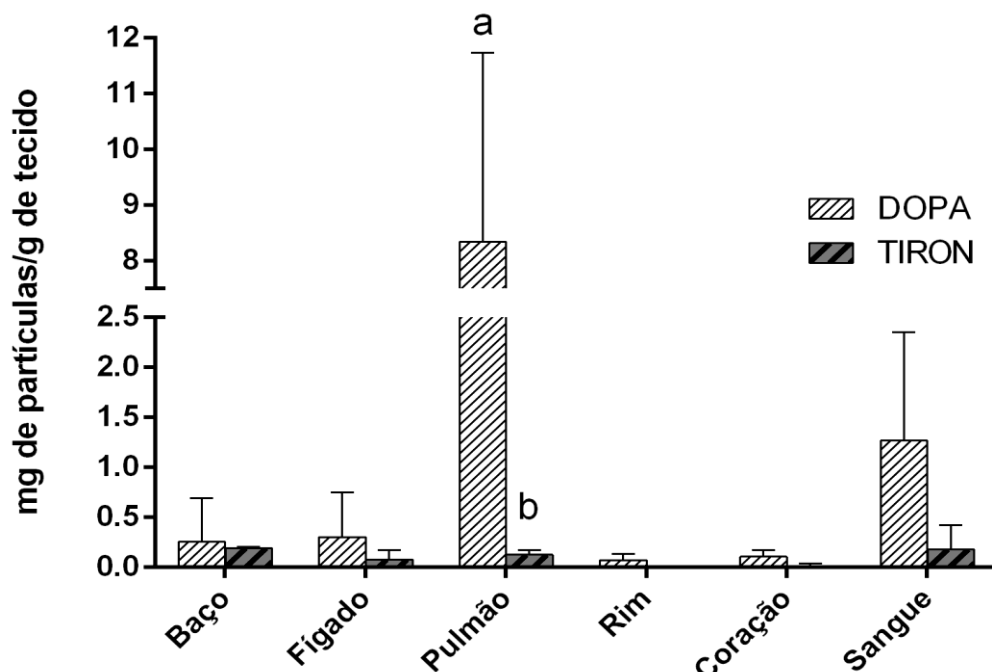


Figura 16: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo dopamina e tiron, referente à massa de partículas por grama de tecido seco, letras diferentes diferem estatisticamente entre si. O gráfico foi dividido em duas partes de eixo y, devido aos valores encontrados nos pulmões do grupo dopamina. Foi utilizado o teste T de Student não pareado e as letras diferentes diferem-se estatisticamente, foi considerado o $p < 0,05$.

A Figura 17 mostra a intensidade de sinal para as NPMs do grupo das ferritas em que a maior intensidade de sinal é dada pelo fígado do Grupo Iônica, seguido pelo fígado do Grupo Citrato. Em quantificação de sinal (mV) o Grupo Citrato e o Grupo Iônica apresentam a maior intensidade de sinal mensuradas por todos os grupos presentes neste estudo.

Quando calculada a massa de partículas por grama de tecido, exemplificado na Figura 18, o Grupo Iônica apresenta os dois maiores picos, no fígado e baço, seguido pelo fígado do Grupo Citrato e fígado do Grupo PEG. Quando analisada a quantidade de partículas injetadas que foram captadas pelos órgãos o Grupo Citrato apresentou um acúmulo de 20% no fígado e 1% no baço, enquanto o Grupo Iônica obteve um acúmulo de 27% no fígado e 1,3% no baço, e por fim o Grupo PEG apesar da intensidade baixa

de sinal apresentou um acúmulo de 65% no fígado e 1% no baço, do total de NPMs injetadas nos animais do grupo.

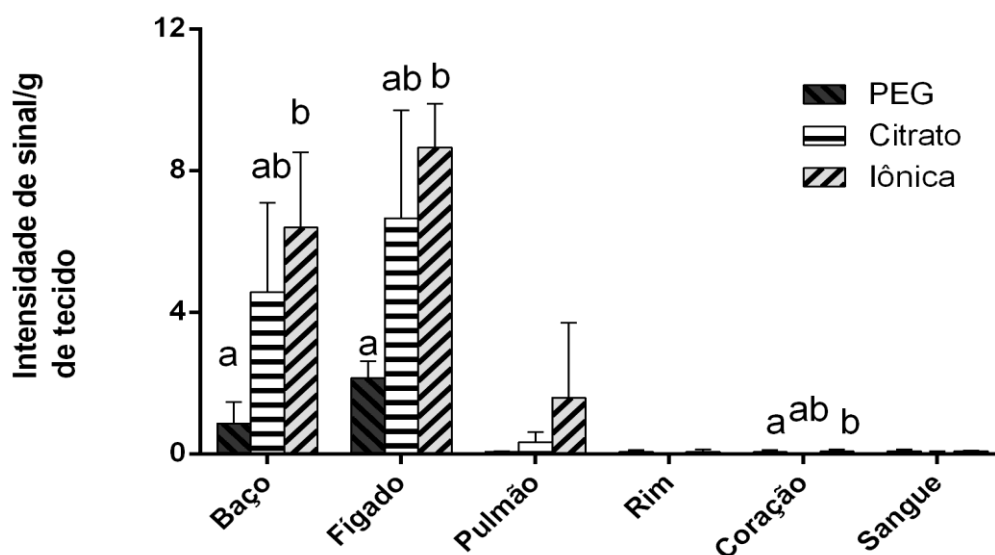


Figura 17: Gráfico de barras não corrigido por nenhuma curva de calibração do Grupo das NPMs de ferrita de manganês, PEG representa o Grupo PEG, Citrato o Grupo Citrato e Iônica o Grupo Iônica. As barras representam a intensidade de sinal por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$.

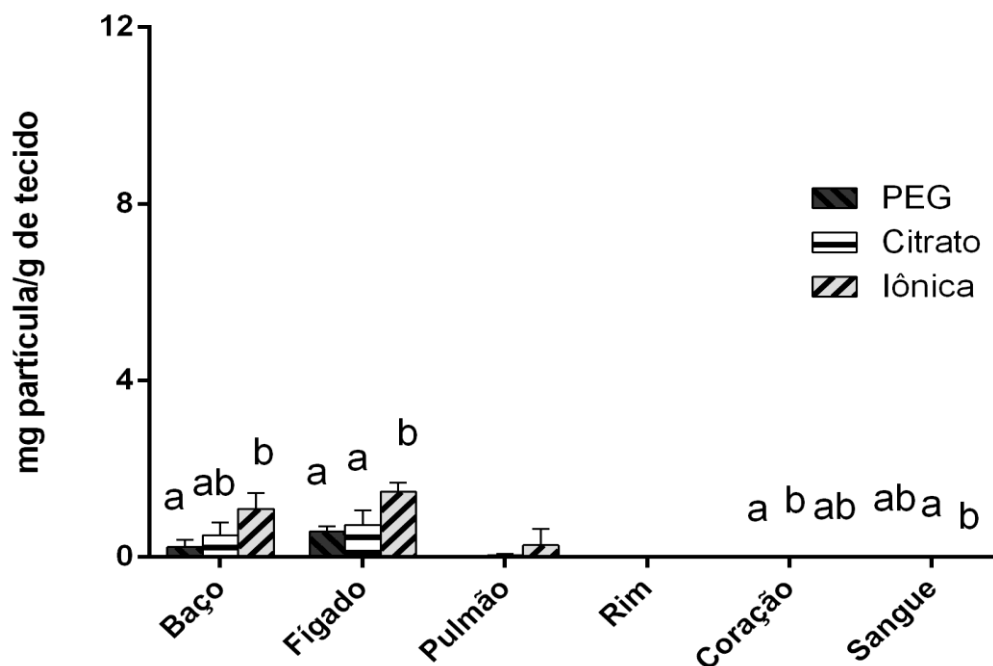


Figura 18: Gráfico de barras corrigido pela curva seca do Grupo das NPMs de ferrita de manganês, PEG representa o Grupo PEG, Citrato o Grupo Citrato e Lônica o Grupo Lônica. As barras representam a massa de partículas por grama de tecido seco, foi utilizado o teste T de Student não pareado, as letras diferentes diferem estatisticamente entre si com $p < 0,05$.

Os resultados apresentados neste presente estudo podem servir como subsídio para futuras pesquisas que visam à utilização de NPMs com as mesmas propriedades apresentadas aqui, isto pelo fato de as NPMs serem materiais muito visados para utilização para aplicações biomédicas dos mais diversos tipos. Aqui realizou-se uma caracterização do comportamento biológico de diferentes tipos de NPMs. Para isso, empregou-se a técnica de Biosusceptometria AC, uma técnica alternativa às técnicas padrão. Embora a técnica já tenha sido aplicada com sucesso em trabalhos anteriormente publicados pelo grupo [17, 38], esta foi a primeira vez em que foi obtido o comportamento do sensor BAC para NPMs menores do que 6 nm. Além disso, as NPMs apresentadas neste estudo, em sua grande maioria, são NPMs desenvolvidas recentemente (com foco de aplicações biomédicas) e até o momento não existe caracterização do seu perfil de biodistribuição e tempo de circulação reportados na

literatura. Assim, esse trabalho tem um caráter de caracterização e exploratório, com o objetivo final de determinar a distribuição dessas NPMs no organismo dos animais.

Para todas as NPMs estudadas, encontramos uma tendência de acúmulo hepático e esplênico. Os dados apresentados nesta seção mostram que os grupos que apresentaram a maior quantidade de massa de partícula injetada acumulada nos órgãos foram o Grupo GCE com 46% do valor injetado acumulado no fígado e o Grupo PEG com 65%, tendo assim mais chance de serem encontradas no fígado que partículas de outros grupos. Outro grupo que apresentou uma afinidade com um órgão foi o Grupo DOPA que obteve um acúmulo de 53% do total injetado presente no pulmão, sendo assim um indicativo para o uso como contraste para detecção de doenças e tumores no pulmão.

Devido à facilidade de acúmulo das NPMs no fígado, relacionado ao processo de captura por macrófagos ou filtração nos hepatócitos, uma grande quantidade de NPMs são propostas como agentes de contraste para detecção de doenças e até mesmos tumores neste órgão [53]. Inclusive, as primeiras aplicações clínicas de NPMs tinham este objetivo, e foi assim que NPMs como o Resovist®, Ferocarbotran® e Feridex® ganharam mercado e foram muito utilizadas em procedimentos de MRI [54, 55]. Apesar deste fato, deve-se ressaltar que devido aos tamanhos dessas partículas (aproximadamente 70 nm) elas apresentam grande dificuldade de metabolização e eliminação do organismo, permanecendo no fígado por meses [56]. Isto foi determinante para a decisão do FDA (*Food and Drug Administration*) em 2014, de retirada desses materiais do mercado. Entretanto, apesar disso, no mesmo ano o FDA aprovou a utilização de mais de 77 medicamentos à base de nanopartículas para utilização clínicas [57]. Sendo assim, cada vez mais a comunidade científica têm direcionado seus esforços para a utilização de NPMs de menores diâmetros, como as utilizadas neste estudo. Essas NPMs geralmente apresentam maior facilidade de

metabolização e eliminação do organismo, e consequentemente maior biocompartibilidade [48].

Em estudo utilizando nanopartículas não magnéticas de quitosana revestidas com biotina e um complexo biotina-avidina, Bu e colaboradores (2013), avaliaram a eficiência de tal partícula para vetorização de fármacos, observando sua farmacocinética e chegada ao fígado dos animais. Quando a partícula estava revestida apenas com biotina, apresentou uma demora a ser retirada da circulação pelo fígado e depois disso apresentou pouco acúmulo no órgão. Entretanto quando adicionado avidina a partícula revelou rápida saída da circulação e passagem direta para o fígado, promovendo um alto acúmulo no órgão. As nanopartículas utilizadas por Bu e colaboradores, apresentavam um tamanho médio de 260 nm, o que é reportado ser altamente captadas pelo sistema mononuclear fagocitário. Assim, Bu e colaboradores concluíram que a biotina ajuda a atrasar a captura das NPMs, deixando-as disponíveis na circulação por maior tempo [58]. No entanto, as NPMs aqui estudadas apresentavam tamanhos médios de 6 nm, o que diminui sua captura pelo sistema mononuclear fagocitário. Desta forma, o tamanho muito reduzido (6 nm) também influencia no tempo de circulação da NPM, como já comentado (eliminação via depuração renal). Em relação à biodistribuição no fígado, os grupos com biotina apresentam uma queda de captação hepática quando comparados a grupos sem a biotina, como o caso do Grupo GCE e GCO.

Apesar da tendência de acúmulo no fígado e as possibilidades de utilizar essa característica como fator positivo para as NPMs, como no caso da utilização como agentes de contraste no fígado em ressonância magnética, é sabido que as NPMs podem causar mal funcionamento, estresse oxidativo e peroxidação lipídica neste órgão [59]. Em um estudo conduzido por Morgan e colaboradores (2018), foram utilizadas NPMs de dióxido de titânio *in vivo*, o que aumenta o estresse oxidativo no fígado. A fim de

diminuir esses efeitos, os pesquisadores conjugaram as nanopartículas com tiron, uma molécula que tem características antioxidantes. Quando comparado os grupos utilizando tiron e sem sua utilização, foi observada uma diminuição de necroses no fígado e apoptose celular indesejada, levando assim a uma menor taxa de acúmulo das NPMs no fígado [60].

Apesar de neste estudo utilizarmos NPMs de magnetita (diferentemente do estudo citado acima), a Figura 16, assim como os dados do cálculo da porcentagem de acúmulo da dose total injetada no animal, mostram-nos que a quantidade total acumulada nos órgãos do Grupo Tiron foi de apenas 5%, sendo o grupo com menor acúmulo no fígado. Este fato, leva à hipótese de ser o tipo de NPM que apresenta melhores características de biocompatibilidade e menor taxa de retirada da circulação via sistema mononuclear fagocitário, de acordo com os resultados obtidos por Morgan e colaboradores.

Algumas utilizações das NPMs não dependem exclusivamente de seu destino final, mas sim da intensidade da sua resposta em relação ao sistema utilizado. A literatura reporta uma série dessas aplicações em situações em que as NPMs foram empregadas para estudar diferentes processos biofísicos e biológicos, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. Assim, técnicas como Relaxação Magnética (MRX), ensaios imunológicos e separação magnética, são exemplos deste tipo de aplicação que priorizam a resposta magnética das NPMs. Empregando biossensores como a BAC, é necessário que a partícula apresente uma alta susceptibilidade magnética, para ser detectada pelo sistema. O grupo com a melhor resposta quando analisada a intensidade de sinal foi o Grupo Citrato, que, por sua vez, já foi utilizada por nosso grupo, para desempenhar diferentes funções. Entre essas funções, podemos citar modelagem farmacocinética da passagem das NPMs da corrente sanguínea para o fígado, construção de imagens da chegada das partículas no coração e fígado e avaliação da perfusão renal

das NPMs, *in vivo*, utilizando modelos de doença renal e animais saudáveis (dados em processo de publicação) [61, 62]. Uma proposta recente e em alta na comunidade científica para as NPMs é o rastreamento celular. Devido ao fato de que neste caso são utilizadas baixas doses de NPMs, é importante que a NPM apresente resposta magnética intensa [63]. Portanto quando a finalidade do experimento é a mensuração da intensidade de sinal, as partículas com revestimento de citrato apresentam a melhor resposta.

Outra forma comum de usar as NPMs é para o *drug delivery*. Nesta aplicação, a NPMs é revestida com alguma molécula, seja ela um fármaco, peptídeo, anticorpo ou outros, com a finalidade de dar um destino final à maioria das NPMs injetadas. Essa vetorização, normalmente se dá por questão de afinidade entre essas moléculas e o alvo. Este processo é então utilizado para melhorar a chegada de um agente terapêutico no alvo. Inclusive pode-se otimizar esses processos utilizando campos magnéticos externos para atrair a partícula até seu destino desejado [64]. Geralmente, tumores e células cancerígenas são o alvo mais desejado como destino final das NPMs no organismo, tanto para diagnósticos com imagem (localização tumoral), quanto para o tratamento utilizando hipertermia magnética.

Alguns tipos de células cancerígenas comumente expressam receptores da vitamina folato [65]. Stella e colaboradores (2000), em estudos *in vitro*, comparando NPMs revestidas com folato e NPMs revestidas com PEG, observou que as partículas com folato apresentavam a habilidade de se ligarem a células cancerígenas enquanto as NPMs com PEG não, mostrando a eficiência de tais partículas no processo de *Drug delivery* [66].

Sendo assim, as NPMs aqui estudadas apresentam grande potencial para aplicações biomédicas, e a caracterização farmacocinética aqui disponibilizada pode vir a

contribuir com a otimização de estratégias de utilização dessas NPMs para diferentes finalidades, desde utilizações como agentes para diagnóstico, quanto para terapia.

4.4. NPMs no soro sanguíneo

Para este experimento, as NPMs foram adicionadas em um tubo contendo soro sanguíneo, e foram coletadas amostras dessa solução (NPMs + soro) com o passar do tempo. Este experimento foi realizado, com o objetivo de observar mudanças no sinal magnético obtido pelo sensor BAC (Cavidade) devido à interação das NPMs com proteínas presentes no soro. Os valores obtidos para as NPMs de ferrita de manganês suspensas em soro sanguíneo estão apresentados na Figura 19.

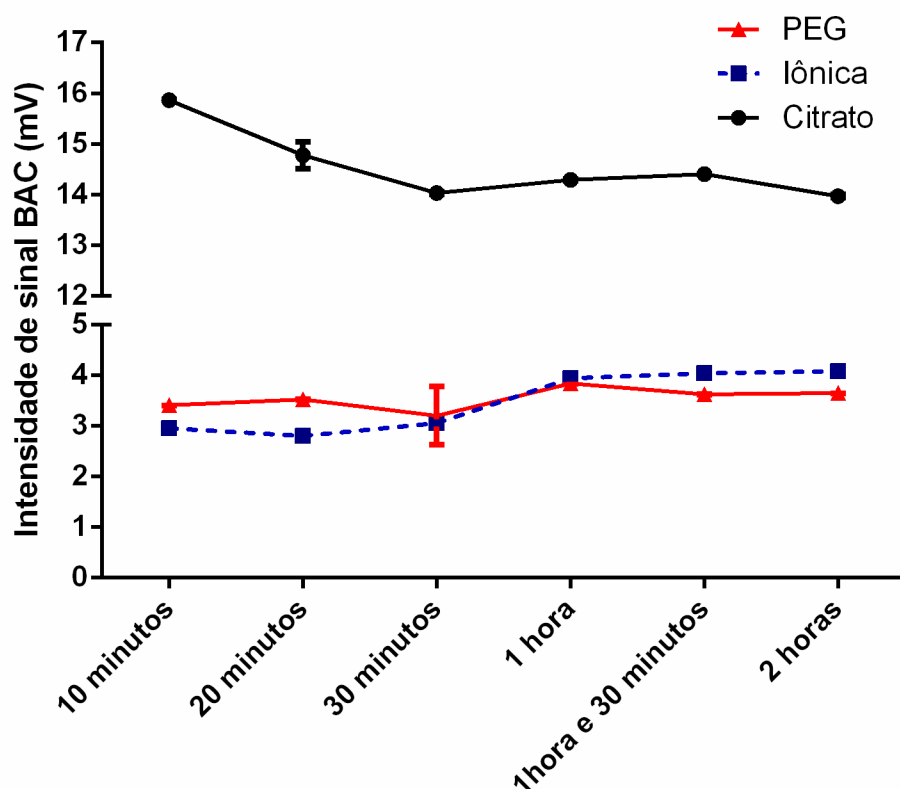


Figura 19: Gráfico demonstrando a intensidade de sinal BAC com o passar do tempo da interação das NPMs com soro sanguíneo, a linha preta representa o Grupo Citrato, a linha azul o Grupo Lônica e a linha vermelha o Grupo PEG.

Como relatado anteriormente, a grande utilidade das NPMs é para uso biomédico e com isso elas entram em contato com o corpo majoritariamente através de vias intravenosas. Essas vias, por sua vez, levam as NPMs a entrarem em contato diretamente com o sangue e proteínas circulantes presente no plasma [51]. As proteínas plasmáticas são a primeira barreira que as NPMs enfrentam, onde as proteínas interagem com as NPMs alterando algumas de suas características como a carga superficial ou estado de agregação. Além disso, as proteínas podem degradar o revestimento e ligações fracas entre compostos.

Essa interação entre as proteínas e as NPMs formam uma camada na superfície das partículas contendo inúmeras moléculas como uma forma de revestimento, e esse fenômeno é denominado de efeito corona [67]. Esse efeito depende de alguns fatores presentes nas NPMs como o revestimento utilizado, o tipo de ligação, o tamanho das partículas e também a carga superficial. Além disso, ele altera o tamanho e a composição da superfície das NPMs provendo a elas uma nova identidade biológica [68].

Piellaa e colaboradores (2016) observaram vários tamanhos de nanopartículas de ouro revestidas com citrato interagindo com proteínas do soro e o efeito corona, as nanopartículas possuíam potencial zeta semelhantes às NPMs de citrato utilizadas neste estudo. Como resultado observaram que as nanopartículas de tamanho entre 10 nm e 20 nm eram as que mais apresentavam uma mudança do potencial zeta de -42 mV para aproximadamente -30 mV após 1 horas e -20 mV após 24 horas, resultando assim em uma interação de proteínas na superfície das partículas [69].

Safi e colaboradores (2011) utilizando NPMs de óxido de ferro revestidas com citrato observaram que em contato com o soro sanguíneo, rapidamente as partículas dobravam seus tamanho hidrodinâmico e em poucas horas era possível observar

partículas segmentadas no fundo dos tubos de ensaio. Esses resultados levam ao entendimento da formação do efeito corona nestas partículas [70]. Quanto a este tipo de interação é observado também uma queda no sinal magnético das NPMs, devido à agregação (aumento do tamanho hidrodinâmico). Isto é observado na Figura 19 no grupo citrato, em que com o passar do tempo a intensidade do sinal BAC diminui, levando assim à hipótese do efeito corona.

A técnica BAC mensura a susceptibilidade AC das NPMs. Quando em contato com as proteínas esta susceptibilidade AC das NPMs pode diminuir [71], minimizando dessa forma a intensidade de sinal obtida pelo sensor. No presente estudo a partícula que apresentou uma maior queda de sinal foi a revestida com citrato, este resultado sugere que a NPM que mais interagiu com as proteínas do soro foram as revestidas com citrato. Este queda de sinal pode estar relacionado aos dados obtidos nas medidas do tempo de circulação. Outros estudos já avaliaram os impactos do efeito corona nas propriedades magnéticas, e da resposta frente a diferentes técnicas, e encontram que este efeito tem grande influência na MRX e na capacidade da NPM ser usada como meio de contraste em MRI. Inclusive, esse efeito pode ser mensurado e quantificado via essas alterações [72].

Além disso, o efeito corona facilita a captação das NPMs em processos fagocitários, atuando como agentes de sinalização para macrófagos (entre outras células do sistema mononuclear fagocitário) e influenciando a biodistribuição das partículas. Estudos reportam à influência que as proteínas do efeito corona provocam na biodistribuição das partículas. Chinen e colaboradores (2017) utilizando nanopartículas e observando a interação com as proteínas do efeito corona, evidenciaram que certas proteínas levam a um processo de reconhecimento proteico e facilitam o processo de captura por macrófagos, eliminando as partículas da circulação [54]. Na corrente

sanguínea existem diversas proteínas que podem interagir com as nanopartículas, mudando assim sua biodistribuição e biocompartibilidade.

O PEG é um polímero utilizado para revestimento, seu principal uso é para prover estabilidade coloidal para a partícula e evitar interações adversas com proteínas e células [73]. Qin Dai e colaboradores (2014) utilizaram PEG para revestir as nanopartículas de ouro e observaram a interação das nanopartículas com o soro e como o PEG reagiria com as proteínas, foi observado que as proteínas não interagem com o PEG e nem o degradam. Entretanto, dependendo da densidade e condições do revestimento, as proteínas podem interagir com espaços que não foram ocupados pelo polímero. No mesmo trabalho quando feito outro teste, aumentando a quantidade de PEG obteve-se uma redução nas interações com proteínas [50].

Neste presente estudo o Grupo PEG apresentou uma intensidade de sinal constante, sugerindo que a partícula não sofreu alterações em suas propriedades magnéticas. Dessa forma, foi a NPM que menos interagiu com as proteínas plasmáticas e entidades biológicas presentes no soro sanguíneo. Esses dados obtidos *in vitro*, levam-nos à hipótese de que o PEG protegeu as NPMs bloqueando interações com demais proteínas e células.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi proposta a avaliação dos parâmetros de tempo de circulação e biodistribuição de 11 deferentes NPMs, assim como avaliação do comportamento de algumas NPMs quando em contato com o soro sanguíneo, utilizando a técnica BAC.

A técnica BAC já vem sendo utilizada juntamente com NPMs para diferentes finalidades, uma vez que a BAC é capaz de determinar tanto o tempo de circulação de NPMs *in vivo* e em tempo real como também sua posterior biodistribuição, de forma *ex*

vivo. Aqui, pela primeira vez, foram utilizadas partículas com um tamanho hidrodinâmico de 6 nm, tamanho esse que apresenta diferentes comportamentos magnéticos e farmacocinéticos, quando comparadas às partículas de tamanhos entre 10 e 200 nm. Apesar da baixa relação sinal ruído, apresentados por tais partículas, foi possível medir os tempos de circulação das NPMs com tamanho médio de 6 nm. Novos estudos com utilização de maiores quantidades de NPMs, e otimização do sistema BAC para este tamanho de NPMs, podem ser realizados a fim de trazer novas perspectivas para a utilização deste tipo de NPM em aplicações biológicas.

Os perfis de biodistribuição apresentaram certa similaridade, com maior captação no fígado seguido de baço. Entretanto existiram, algumas exceções, onde o Grupo DOPA apresentou acúmulo no pulmão, e o Grupo Tiron que não apresentou acúmulo significativo (apenas 5% da dose injetada, somando todos os órgãos), com uma possível eliminação pela urina.

Quanto aos dados de interação das NPMs com soro sanguíneo, é possível concluir que esta interação acontece, e altera propriedades das NPMs, como no caso do citrato, onde foi observada uma queda na intensidade de sinal gerada pela partícula. Entretanto no caso do PEG, que é proposta como um revestimento para diminuir a interação das proteínas com a partícula é possível concluir que a interação é menor, mantendo a integridade da partícula, e com isso sua intensidade de sinal detectada pelo sensor BAC é estável.

Através dos dados aqui encontrados, foi possível estabelecer uma caracterização do tempo de circulação e biodistribuição de diferentes tipos de NPMs, além do perfil de alteração no sinal detectado via sistema BAC por possível efeito corona. Assim, os dados aqui apresentados dão subsídio para futuros estudos utilizando esses tipos de

NPMs, uma vez que, diferentes tipos de revestimentos providenciam diferentes finalidades para as NPMs.

6. REFERÊNCIAS

1. Hedayatnasab, Z., F. Abnisa, and W.M.A.W. Daud, *Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application*. Materials & Design, 2017. **123**: p. 174-196.
2. Artemov, D., et al., *MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles*. Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2003. **49**(3): p. 403-408.
3. Próspero, A.G., et al., *Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry*. Journal of nanobiotechnology, 2017. **15**(1): p. 22.
4. Zeinali Sehgig, F., et al., *Magnetic nanoparticles as potential candidates for biomedical and biological applications*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2016. **44**(3): p. 918-927.
5. Li, X., et al., *Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016. **104**(5): p. 1285-1296.
6. Majidi, S., et al., *Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2016. **44**(2): p. 722-734.
7. Cornell, R.M. and U. Schwertmann, *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. 2003: John Wiley & Sons.
8. Cardoso, V.F., et al., *Advances in magnetic nanoparticles for biomedical applications*. Advanced healthcare materials, 2018. **7**(5): p. 1700845.
9. Li, L., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking*. Theranostics, 2013. **3**(8): p. 595.
10. Subhankar, B. and K. Wolfgang, *Supermagnetism*. J. Phys. D, 2009. **42**: p. 013001.
11. Kantorovich, S., et al., *Nonmonotonic magnetic susceptibility of dipolar hard-spheres at low temperature and density*. Physical review letters, 2013. **110**(14): p. 148306.
12. Champagne, P.-O., et al., *Colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the central nervous system: a review*. Nanomedicine, 2018. **13**(11): p. 1385-1400.
13. Mørup, S., M.F. Hansen, and C. Frandsen, *Magnetic interactions between nanoparticles*. Beilstein journal of nanotechnology, 2010. **1**(1): p. 182-190.
14. Hotze, E.M., T. Phenrat, and G.V. Lowry, *Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment*. Journal of environmental quality, 2010. **39**(6): p. 1909-1924.
15. Lefebure, S., et al., *Monodisperse magnetic nanoparticles: preparation and dispersion in water and oils*. Journal of Materials research, 1998. **13**(10): p. 2975-2981.
16. Zhang, Y., N. Kohler, and M. Zhang, *Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake*. Biomaterials, 2002. **23**(7): p. 1553-1561.
17. Lacava, L., et al., *Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice*. Biophysical journal, 2001. **80**(5): p. 2483-2486.

18. Molday, R.S. and D. Mackenzie, *Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells*. Journal of immunological methods, 1982. **52**(3): p. 353-367.
19. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacological reviews, 2001. **53**(2): p. 283-318.
20. Sallam, A.-S., et al., *Formulation of an oral dosage form utilizing the properties of cubic liquid crystalline phases of glyceryl monooleate*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2002. **53**(3): p. 343-352.
21. Gupta, A.K., et al., *Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis*. IEEE transactions on nanobioscience, 2003. **2**(4): p. 255-261.
22. Amstad, E., et al., *Surface functionalization of single superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted magnetic resonance imaging*. small, 2009. **5**(11): p. 1334-1342.
23. Sun, C., R. Sze, and M. Zhang, *Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2006. **78**(3): p. 550-557.
24. Jung, H.-i., et al., *Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin I*. Bioconjugate chemistry, 2004. **15**(5): p. 983-987.
25. Hodenius, M., et al., *Biotinylated stealth® magnetoliposomes*. Chemistry and physics of lipids, 2002. **120**(1-2): p. 75-85.
26. Desser, T.S., et al., *Dynamics of tumor imaging with Gd-DTPA—polyethylene glycol polymers: Dependence on molecular weight*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1994. **4**(3): p. 467-472.
27. Nakamura, E., et al., *A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity*. Journal of controlled release, 2006. **114**(3): p. 325-333.
28. Arami, H., et al., *In vivo multimodal magnetic particle imaging (MPI) with tailored magneto/optical contrast agents*. Biomaterials, 2015. **52**: p. 251-261.
29. Cole, A.J., et al., *Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting*. Biomaterials, 2011. **32**(8): p. 2183-2193.
30. Liu, Z.-j., et al., *Biocompatible KMnF₃ nanoparticulate contrast agent with proper plasma retention time for in vivo magnetic resonance imaging*. Nanotechnology, 2014. **25**(15): p. 155101.
31. Chouly, C., et al., *Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution*. Journal of microencapsulation, 1996. **13**(3): p. 245-255.
32. 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.
33. Yang, L., et al., *Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice*. Nanoscale, 2015. **7**(2): p. 625-636.
34. Wang, Q., et al., *Low toxicity and long circulation time of polyampholyte-coated magnetic nanoparticles for blood pool contrast agents*. Scientific reports, 2015. **5**(1): p. 1-8.
35. Cole, A.J., et al., *Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(26): p. 6291-6301.
36. Zheng, B., et al., *Magnetic particle imaging tracks the long-term fate of in vivo neural cell implants with high image contrast*. Scientific reports, 2015. **5**: p. 14055.

37. Moraes, R., et al., *Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of AC biosusceptometry*. Physiological measurement, 2003. **24**(2): p. 337.
38. Quini, C.C., et al., *Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2017. **13**(4): p. 1519-1529.
39. Próspero, A.G., et al., *Dynamic cerebral perfusion parameters and magnetic nanoparticle accumulation assessed by AC biosusceptometry*. Biomedical Engineering/Biomedizinische Technik, 2019.
40. Uchiyama, M.K., et al., *Ultrasmall cationic superparamagnetic iron oxide nanoparticles as nontoxic and efficient MRI contrast agent and magnetic-targeting tool*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 4731.
41. de Souza Albernaz, M., et al., *Decorated superparamagnetic iron oxide nanoparticles with monoclonal antibody and diethylene-triamine-pentaacetic acid labeled with thechnetium-99m and gallium-68 for breast cancer imaging*. Pharmaceutical research, 2018. **35**(1): p. 24.
42. Branquinho, L.C., et al., *Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia*. Scientific reports, 2013. **3**: p. 2887.
43. Leliaert, J., et al., *Interpreting the magnetorelaxometry signal of suspended magnetic nanoparticles with Kaczmarz'algorithm*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2017. **50**(19): p. 195002.
44. Almeida, J.P.M., et al., *In vivo biodistribution of nanoparticles*. Nanomedicine, 2011. **6**(5): p. 815-835.
45. Sun, C., J.S. Lee, and M. Zhang, *Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2008. **60**(11): p. 1252-1265.
46. Yoo, J.-W., E. Chambers, and S. Mitragotri, *Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects*. Current pharmaceutical design, 2010. **16**(21): p. 2298-2307.
47. Choi, H.S., et al., *Renal clearance of nanoparticles*. Nature biotechnology, 2007. **25**(10): p. 1165.
48. Longmire, M., P.L. Choyke, and H. Kobayashi, *Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats*. 2008.
49. Laurent, S., et al., *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications*. Chemical reviews, 2008. **108**(6): p. 2064-2110.
50. Dai, Q., C. Walkey, and W.C. Chan, *Polyethylene glycol backfilling mitigates the negative impact of the protein corona on nanoparticle cell targeting*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(20): p. 5093-5096.
51. Ehrenberg, M.S., et al., *The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells*. Biomaterials, 2009. **30**(4): p. 603-610.
52. Quini, C.C., et al., *Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats*. Journal of biological engineering, 2012. **6**(1): p. 6.
53. Qiao, R., C. Yang, and M. Gao, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(35): p. 6274-6293.
54. Briley-Saebo, K.C., et al., *Fractionated Feridex and positive contrast: in vivo MR imaging of atherosclerosis*. Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2008. **59**(4): p. 721-730.
55. Reimer, P. and T. Balzer, *Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications*. European radiology, 2003. **13**(6): p. 1266-1276.
56. Reimer, P., et al., *Clinical results with Resovist: a phase 2 clinical trial*. Radiology, 1995. **195**(2): p. 489-496.

57. 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.
58. Bu, L., et al., *Trans-resveratrol loaded chitosan nanoparticles modified with biotin and avidin to target hepatic carcinoma*. International journal of pharmaceutics, 2013. **452**(1-2): p. 355-362.
59. Cui, Y., et al., *Gene expression in liver injury caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in mice*. Toxicological Sciences, 2012. **128**(1): p. 171-185.
60. Morgan, A., et al., *Innovative perception on using Tiron to modulate the hepatotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in male rats*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018. **103**: p. 553-561.
61. Soares, G., et al., *Multichannel AC Biosusceptometry system to map biodistribution and assess the pharmacokinetic profile of magnetic nanoparticles by imaging*. IEEE transactions on nanobioscience, 2019.
62. Próspero, A.G., *Biosusceptometria AC e nanopartículas magnéticas para avaliação de parâmetros biofísicos: renais, cerebrais e efeito corona*. 2019.
63. 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.
64. Suwa, T., et al., *Magnetic resonance imaging of esophageal squamous cell carcinoma using magnetite particles coated with anti-epidermal growth factor receptor antibody*. International Journal of Cancer, 1998. **75**(4): p. 626-634.
65. Weitman, S.D., et al., *Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues*. Cancer research, 1992. **52**(12): p. 3396-3401.
66. Stella, B., et al., *Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting*. Journal of pharmaceutical sciences, 2000. **89**(11): p. 1452-1464.
67. Mahmoudi, M., et al., *Protein–nanoparticle interactions: opportunities and challenges*. Chemical reviews, 2011. **111**(9): p. 5610-5637.
68. Casals, E. and V.F. Puentes, *Inorganic nanoparticle biomolecular corona: formation, evolution and biological impact*. Nanomedicine, 2012. **7**(12): p. 1917-1930.
69. Piella, J., N.G. Bastús, and V. Puentes, *Size-dependent protein–nanoparticle interactions in citrate-stabilized gold nanoparticles: the emergence of the protein corona*. Bioconjugate chemistry, 2017. **28**(1): p. 88-97.
70. Safi, M., et al., *The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(35): p. 9353-9363.
71. Salvador, M.A., et al., *Characterization, nanoparticle self-organization, and Monte Carlo simulation of magnetoliposomes*. Physical Review E, 2016. **93**(2): p. 022609.
72. Amiri, H., et al., *Protein corona affects the relaxivity and MRI contrast efficiency of magnetic nanoparticles*. Nanoscale, 2013. **5**(18): p. 8656-8665.
73. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.