

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

MATHEUS RAMOS CALONI

**AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR EM LARVAS DE PEIXE-ZEBRA
EXPOSTAS A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO**

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR EM LARVAS DE
PEIXE-ZEBRA EXPOSTAS A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
FERRO**

MATHEUS RAMOS CALONI

BACHAREL EM FÍSICA

LICENCIADO EM FÍSICA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALÉO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Janeiro, 2021**

Ficha Catalográfica

C165a Caloni, Matheus Ramos

Avaliação da biodistribuição elementar em larvas de peixe-zebra expostas a nanopartículas de óxido de ferro / Matheus Ramos Caloni. – 2021.

72.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo.

Co-orientador: Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias.

1. PIXE. 2. Nanotoxicologia. 3. peixe-zebra. 4. nanopartículas de óxido de ferro. I. Papaléo, Ricardo Meurer. II. Dias, Johnny Ferraz. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 ESCOLA POLITÉCNICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR EM LARVAS DE PEIXE-ZEBRA EXPOSTAS A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

CANDIDATO: MATHEUS RAMOS CALONI

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - ORIENTADOR

DR. JOHNNY FERRAZ DIAS - COORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

DR. PEDRO LUIS GRANDE, DO INSTITUTO DE FÍSICA DA UFRGS

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - DO PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
 Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900
 Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
 E-mail: engenharia.pg.materials@pucrs.br
 www.pucrs.br/politecnica

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Inajara, que também sempre apoiou minhas escolhas e forneceu o suporte necessário para seguir em frente.

À minha companheira, Maria Luiza, que, sempre ao meu lado, me incentivou a realizar o mestrado e sempre apoiou o investimento na vida acadêmica, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha colega e amiga Elisa, que me acolheu no laboratório desde o início e sempre forneceu todo o suporte necessário para que esta pesquisa se concretizasse.

À professora Raquel, que me concedeu a oportunidade de trabalhar no NanoPUC e sempre esteve disposta a me ajudar.

Ao professor Johnny Dias, que desde o início desta pesquisa a recebeu com boa vontade e interesse, e sempre esteve disposto a me auxiliar e me ensinar os aspectos teóricos e operacionais das técnicas utilizadas no LII.

Ao professor Papaléo, cuja insistência no investimento nesta pesquisa foram fundamentais para que ela se desenvolvesse, e cujas discussões e análises trouxeram importantes aprendizados.

RESUMO

RAMOS CALONI, Matheus. **Avaliação da distribuição elementar em larvas de peixe-zebra expostas a nanopartículas de óxido de ferro.** Porto Alegre - Brasil. 2020. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Neste trabalho, foi realizada a avaliação de concentração e biodistribuição de ferro em larvas de peixes-zebra (*Danio rerio*) expostas a nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro revestidas com dextrana (SPION-DX) através da técnica de micro-PIXE. Foram comparados resultados de mapas elementares bidimensionais e quantificação de ferro de amostras obtidas por dois procedimentos diferentes de preparação de amostras: cortes sagitais realizados por criomicrotomia; e amostras inteiras de larvas desidratadas, sem seccionamento. Independentemente do método de preparação de amostras utilizado, a concentração de ferro nos tecidos das larvas expostas a SPION-DX é significativamente superior (até 140 ppm de ferro) do que larvas controle (inferior a 10 ppm), isto é, que não sofreram exposição às NPs. Contudo, o aumento da dose de SPION-DX não provocou aumento proporcional na quantidade de ferro medida nas larvas: as larvas expostas a 2 mM e 8 mM possuíam concentração semelhante. Além disso, os mapas bidimensionais demonstraram que a distribuição de ferro em larvas tratadas é homogênea, e somente algumas amostras apresentam sutil incremento do elemento na região abdominal. Através dos espectros de contagens elementares obtidos por micro-PIXE foi possível estabelecer uma curva de correlação entre dose de exposição (concentração de SPION-DX na água dos peixes) e concentração de ferro efetivamente incorporada nos animais, o que sugere saturação de ferro para doses altas. Essa informação foi sustentada por medidas complementares por ICP-MS, nas quais a tendência de pico para doses intermediárias e saturação para doses altas foi observada.

Palavras-Chaves: PIXE, nanotoxicologia, peixe-zebra, nanopartículas de óxido de ferro.

ABSTRACT

RAMOS CALONI, Matheus. **Elemental distribution evaluation of zebrafish larvae exposed to iron oxide nanoparticles.** Porto Alegre - Brasil. 2020. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

We report on the evaluation of iron content and biodistribution in zebrafish larvae (*Danio rerio*) exposed to dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION-DX) using the micro-PIXE technique. We compare results of elemental 2D maps and Fe quantification obtained from two different sample preparation procedures: one using sagittal slices prepared by cryo-sectioning and another using entire dehydrated larvae. Independently of the preparation method used, the Fe content in the tissues of exposed animals is significantly higher (up to 140 ppm of iron) than in the controls (less than 10 ppm), but the increase is not proportional to the exposure level. In addition, 2D elemental maps show a somewhat homogeneous Fe distribution in the larvae, with some samples showing a slight enhancement in Fe content near the gut. From the PIXE data a curve correlating the exposure (nanoparticle concentration in the fish water) to the iron content in the body was obtained, which suggests a trend of saturation at high exposure doses. Such data was supported by complementary measurements using ICP-MS technique, in which the peak concentration in the intermediate dose and saturation tendency for the maximum dose was also observed.

Keywords: PIXE, Nanotoxicology, Zebrafish, Iron oxide nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Representação de domínios magnéticos antes e após magnetização devido a campo externo. Imagem adaptada de <https://www.electrical4u.com/ferromagnetic-materials/>, em 01/08/2020

Figura 3.2. Nanopartícula com núcleo de óxido de ferro revestido com dextran, b) estrutura química do dextran. Imagem adaptada de Oliveira (2019), em 01/08/2020.

Figura 3.3. Peixe-zebra (Danio rerio) adulto. Fonte <https://en.wikipedia.org/wiki/Zebrafish>, acessado em 20/07/2020

Figura 3.4. Espectro de uma larva de peixe-zebra, adquirido em 12/2019, no Laboratório de Implantação Iônica da UFRGS.

Figura 3.5. a) etapas de aceleração e modulação do feixe no Tandem 3 MV; b) fotografia do acelerador, com as diferentes linhas de análise em evidência

Figura 4.3. Placa de poços usada no tratamento. As cores laranja e bordô das soluções de SPION-DX correspondem a, respectivamente, 2 e 8 mM de Fe.

Figura 4.4. representação do protocolo de tratamento das larvas. As exposições iniciam-se 2 horas após a fertilização, quando o animal se encontra em estágio embrionário, e é encerrado no quinto dia (5 dpf ou 120 hpf), quando é feita crio-eutanásia e as preparações de amostra são iniciadas.

Figura 4.5. vista sagital de uma larva. Esta foi a direção ao longo da qual os cortes foram realizados..

Figura 4.6. espessura de uma larva de peixe-zebra em 5 dpf

Figura 5.1. massa de ferro do *pool* de larvas (μg de Fe/*pool*), e massa de ferro por larva (ng de Fe/larva), em função da dose de tratamento, em mM

Figura 5.2. comparação de concentração de ferro soluções de tratamento, em mM, medidas por UV-VIS e ICP-MS

Figura 5.3. massa de ferro do *pool* de larvas, em μg , em função da dose de tratamento, em mM. Neste gráfico, a dose de tratamento foi medida por ICP-MS, posterior à exposição.

LISTA DE SÍMBOLOS

CLIO	<i>cross-linked iron oxide</i>
Ca	cálcio
Cl	cloro
dE/dx	poder de freamento
DLS	do inglês <i>Dynamic light scattering</i>
DRX	difração de raios-X
dpf	dias pós-fertilização
Fe	ferro
Fe ₃ O ₄	magnetita
γ-Fe ₂ O ₃	maguemita
SiO ₂	sílica/dióxido de silício
PEG	polietileno glicol
hpf	horas pós-fertilização
K	potássio
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectroscopy
LII	Laboratório de Implantação Iônica
MRI	magnetic resonance imaging
NP	nanopartícula
NPOFe	nanopartícula de óxido de ferro
nm	nanômetro
P	fósforo
PIXE	particle induced x-ray emission
pH	potencial hidrogeniônico
RBS	do inglês, Rutherford backscattering spectrometry
SEM	scanning electronic microscopy
SIMS	secondary ion mass spectrometry
S	enxofre
Si(Li)	silício dopado com lítio
HP-Ge	germânio hiperpuro
SPION	superparamagnetic iron oxide nanoparticles
TEM	transmission electronic microscopy

UV-VIS	ultraviolet-visible light spectroscopy
VSM	vibrating sample magnetometer
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
μm	micrômetro
XRF	x-ray fluorescence
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
\vec{M}	magnetização
\vec{H}	campo magnético
χ	susceptibilidade magnética

SUMÁRIO

APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA	3
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE SÍMBOLOS	10
SUMÁRIO	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. Nanopartículas de óxido de ferro – aplicações	18
3.2. Nanopartículas do tipo SPION – características fundamentais	20
3.3. Dextrana como revestimento de SPIONs	22
3.4. Interação de nanopartículas com sistemas biológicos	23
3.5. Peixe zebra como animal modelo em estudos toxicológicos	26
3.6. Técnicas de caracterização da biodistribuição em sistemas biológicos	27
3.7. Emissão de raios-X estimulada por partículas (PIXE).....	29
3.7.1. Interação de íons carregados com a matéria	29
3.7.2. Fundamentos da técnica	30
3.7.3. Instrumentação básica	32
3.7.4. Aspectos experimentais	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Síntese das SPION-DX	35
4.2. Técnicas de caracterização das SPION-DX.....	36
4.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	36
4.2.2. Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta (DLS e ELS).....	37
4.2.3. Espectroscopia ultravioleta (UV-VIS)	38

4.2.4. Espectroscopia de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).....	39
4.3. Tratamento das larvas com SPION-DX.....	40
4.4. Preparação de amostras de peixe zebra	42
4.4.1. Protocolo A – obtenção de cortes micrométricos sagitais através de ultramicrotomia para análise por micro-PIXE.....	43
4.4.2. Protocolo B – amostras de larvas inteiras para análise por micro-PIXE	44
4.4.3. Protocolo de preparação de amostras para ICP-MS.....	44
4.5. Procedimentos de caracterização dos peixes-zebra.....	45
4.5.1. Caracterização por micro-PIXE.....	45
4.5.1.1. Quantificação elementar através do GUPIXWIN®.....	46
4.5.2. Análise de peixes-zebra por micro-PIXE.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1. Publicação da pesquisa em periódico.....	49
5.2. Dados complementares – quantificação do ferro das larvas por ICP-MS...56	
5.2.1. Massa de ferro dos <i>pools</i> de larvas em função da dose de tratamento	56
5.2.2. Concentração de ferro nas soluções de tratamento.....	58
6. CONCLUSÕES.....	60
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	61
7.1. Preparação de amostras para micro-PIXE	61
7.2. Aspectos de instrumentação do micro-PIXE e uso de técnicas complementares.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

O uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) no contexto biológico tem aumentado progressivamente, devido a suas características físico-químicas únicas permitirem uma vasta gama de aplicações terapêuticas e diagnósticas ^{1,2}. Dentre as diferentes variedades de NPMs, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (do inglês, superparamagnetic iron oxide nanoparticles - SPIONs) são uma das mais prevalentes no contexto biomédico ^{3,4}. Elas são amplamente utilizadas em diagnóstico por imagem como agente de contraste em ressonância magnética ^{5,6} e são aplicáveis no tratamento de tumores como centros de aquecimento em terapia por hipertermia magnética ^{7,8}. As SPIONs consistem em um núcleo composto por magnetita ou maguemita, com superfície recoberta por camada estabilizante, geralmente um material biocompatível, que pode ser alterado para adicionar diferentes funcionalidades ao sistema ⁹. Apesar de nanopartículas de óxido de ferro serem absorvíveis pelo corpo humano e, de serem com frequência apontadas como tendo baixa toxicidade, a segurança relativa à administração desses materiais em seres humanos ainda é tema de investigação ¹⁰⁻¹³.

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo animal empregado de forma abundante na investigação de toxicidade *in vivo* de nanomateriais, pois substâncias químicas adicionadas ao seu meio aquoso são rapidamente incorporadas nos tecidos e no sistema nervoso central desses animais.¹⁴⁻²¹ Sua taxa de fecundação é alta e o rápido desenvolvimento permite aquisição de grande volume de dados em pouco tempo. Além disso, o desenvolvimento embrionário e a similaridade genômica (aproximadamente 70%)²² entre seres humanos e o peixe-zebra os tornam, em princípio, suficientemente relacionáveis aos humanos ^{23,24}.

Em estudos toxicológicos um importante parâmetro de investigação é a acumulação do princípio ativo em tecidos após exposição. No entanto, limitações de caráter experimental restringem muitas pesquisas a somente correlacionar a

concentração da substância no meio aquoso com os efeitos toxicológicos resultantes, sem explorar concentrações elementares ou biodistribuição. O crescente uso de nanomateriais exige dados mais consistentes acerca de processos de absorção, distribuição e eliminação de NPs por seres vivos. O presente trabalho é focado em avaliar a absorção e a biodistribuição de ferro em larvas de peixe-zebra expostas a nanopartículas de óxido de ferro do tipo SPION. Diversas técnicas de caracterização analítica têm sido aplicadas dentro de tal contexto de pesquisa ²⁵⁻²⁹, e a técnica de emissão de raios-X estimulada por micro-feixe de prótons (micro-PIXE) ³⁰⁻³³ foi utilizada para o mapeamento bidimensional de amostras das larvas. Essa técnica é interessante para o contexto de nanotoxicidade, pois além da caracterização do ferro em larvas tratadas e controle, é possível, simultaneamente, analisar a distribuição e a concentração de elementos com $Z > 11$. Isso permite uma avaliação mais profunda dos mecanismos de absorção das nanopartículas, isto é, como as concentrações de elementos endógenos como o fósforo, o sódio, cloro e o cálcio variam em função da incorporação do ferro no organismo das larvas.

O presente trabalho integra o grupo de projetos desenvolvidos no Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia em colaboração com o Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso (PUCRS), utilizando o peixe-zebra para ensaios de nanotoxicidade *in vivo* de SPIONs ¹⁴ com enfoque em alterações comportamentais e morfológicas em larvas. Este projeto visa à complementação desses ensaios com dados relativos à absorção e à biodistribuição das NPs no modelo animal descrito. Esta pesquisa foi publicada no periódico *Nuclear Instruments and Material Section B*, sob título “*Use of micro-PIXE for elemental characterization and iron uptake evaluation in zebrafish larvae exposed to iron oxide nanoparticles*” (M.R. Caloni et al, 2019). A pesquisa foi uma colaboração entre Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia da PUCRS, o Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso da PUCRS e o Laboratório de Implantação Iônica (Instituto de Física da UFRGS). O trabalho publicado contemplou a análise por micro-PIXE de amostras de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações de SPION, em dois protocolos de preparação de amostras: larvas inteiras e cortadas por ultra-microtomia. Para ambos os protocolos, obtiveram-se mapas multielementares bidimensionais e quantificação do ferro presente nas larvas

controle e tratadas. Complementarmente, a técnica ICP-MS foi utilizada em medidas de quantificação de ferro das soluções de tratamento e das larvas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a concentração e biodistribuição de ferro em larvas de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de ferro do tipo SPION-DX através da técnica de caracterização elementar micro-PIXE.

2.1. Objetivos específicos

- Medir a concentração elementar em larvas de peixe-zebra através da técnica de micro-PIXE;
- Comparar medidas de concentração elementar de Fe obtidas por micro-PIXE com técnicas auxiliares como ICP-MS e EDS;
- Obter uma curva de concentração de ferro endógeno em função de diferentes doses de exposição às SPIONs;
- Verificar se a exposição às SPIONs altera as concentrações e biodistribuições em elementos naturalmente presentes nas larvas, como Ca, S, P e Cl;
- Avaliar o impacto de diferentes técnicas de preparação de amostra das larvas tratadas e controle para análise com micro-PIXE da composição e distribuição elementar dos animais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo é dividido em cinco assuntos fundamentais: (1) nanopartículas de óxido de ferro do tipo SPION: aplicações e fundamentos teóricos; (2) interação de SPIONs com o meio biológico; (3) peixe-zebra como modelo animal em estudos de nanotoxicidade; (4) micro-PIXE como técnica de caracterização de sistemas *ex vivo*; e (5) impacto da preparação de amostras na análise. No primeiro tema, são introduzidos aspectos essenciais de nanopartículas de óxido de ferro e sua aplicação no contexto de ciências biomédicas, com foco em nanopartículas do tipo SPION. No segundo assunto, discorre-se sobre como SPIONs interagem com sistemas biológicos e os aspectos toxicológicos associados a tal interação. No terceiro tópico é justificado o uso de larvas de peixes-zebra como animal modelo. No quarto, a técnica de micro-PIXE é introduzida, apresentando suas vantagens e desvantagens como método de análise proposto neste trabalho. Por fim, no quinto tópico, são discutidos os impactos que técnicas de preparação de amostras podem provocar nos dados obtidos.

3.1. Nanopartículas de óxido de ferro – aplicações

Uma nanopartícula (NP) pode ser classificada como qualquer grão com uma de suas dimensões inferior a 100 nm³⁴. Atualmente é mais comum trabalhar com nanopartículas projetadas em laboratório (*engineered nanoparticles*), as quais com frequência possuem, além do núcleo central de um composto determinado, outros elementos estabilizantes ou funcionais acoplados à sua estrutura, como polímeros, óxidos metálicos e fármacos, o que permite uma vasta gama de aplicações em ciências biomédicas e engenharias^{35,36}. As nanopartículas de óxido de ferro (NPOFe) são constituídas principalmente por núcleos cristalinos de magnetita, Fe₃O₄, ou maguemita, γ -Fe₂O₃, e apresentam comportamento magnético dependente do

tamanho e da composição do material. O ferro, por sua vez, é um metal pesado que participa de importantes processos metabólicos dos seres vivos, estando presente em hemoglobinas – metaloproteínas que atuam no transporte de oxigênio através de hemácias- sendo um elemento fundamental na respiração dos seres vivos³⁷. Isso torna as NPOFe consideravelmente biocompatíveis, o que, aliado às propriedades magnéticas dessa classe de nanomateriais, resulta em diferentes aplicações no contexto biomédico. Uma dessas áreas é o diagnóstico por imagem, onde podem atuar, por exemplo, na ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*) como agentes de contraste aumentando a diferenciação radiológica entre estruturas internas de um organismo)³⁶, ou como fonte do sinal de imagem, como na técnica de *Magnetic Particle Imaging* (MPI)³⁸. Essa modalidade de agentes de contraste para MRI possui alguns exemplares aprovados para uso clínico, podendo-se citar o Feridex® e o Resovist®. Tais agentes são especialmente eficazes para o imageamento do fígado, pois esse órgão é um dos principais metabolizadores do ferro.

NPOFe também são aplicáveis em terapias para tratamento complementar do câncer, através do fenômeno de hipertermia magnética^{35,39-44}, que ocorre quando as NPMs são expostas a um campo magnético alternado gerado por bobinas de radiofrequência. As altas frequências do campo magnético gerado pelas bobinas provoca rápida variação de direção dos momentos de dipolo magnético das NPOFe, através de processos de excitação e relaxação dos *spins* eletrônicos. Isso provoca liberação de energia térmica na região onde se acumulam, o que as tornam centros de aquecimento localizado. A partir desse efeito, a denominada magneto-hipertermia pode ser utilizada para o tratamento de tumores, uma vez que a temperatura terapêutica de 43 °C é fatal somente para o tecido não sadio, o que garante preservação de tecidos que não foram acometidos pela doença.

É também proposto e investigado o uso de NPOFe na área farmacêutica, na qual suas características magnéticas são exploradas para a entrega de fármacos em tecidos específicos (aplicação também denominada de *targeted drug delivery*). Fundamentalmente, a carga de fármaco é inserida na superfície das NPOFe, principalmente através de ligações covalentes ou estruturas porosas. A partir de gradientes localizados de campo magnético gerados por bobinas de radiofrequência é possível guiar as NPOFe com fármacos acoplados a si até determinado alvo biológico. O guiamento também pode ser obtido adicionando algum ligante específico

à estrutura patológica no revestimento das NPs. Dessa forma, o uso de nanopartículas magnéticas marcadas com fármacos pode propiciar alta especificidade na entrega da droga, e conseqüente redução da dose administrada e otimização de tratamentos farmacológicos.

3.2. Nanopartículas do tipo SPION – características fundamentais

As propriedades magnéticas de um material relacionam-se com os momentos de dipolo magnético dos átomos que o compõem, que, por sua vez, são determinados pelos momentos angulares orbitais e de spin do núcleo e dos elétrons⁴⁵. Na maioria dos materiais, os momentos magnéticos de elétrons orbitando o núcleo são anulados por momentos magnéticos de elétrons que orbitem na direção oposta. Essa é a situação de momento magnético líquido nulo, ou baixo o suficiente para que efeitos magnéticos não sejam observados. Em átomos com níveis de energia não ocupados, os spins desemparelhados resultam em momento magnético líquido não nulo, característico de determinadas classes de materiais magnéticos. Quando um material é exposto a um campo magnético externo \vec{H} , seus momentos de dipolo magnético tendem a orientar-se conforme direção e sentido do campo; nesse cenário, o somatório dos momentos de dipolo magnético resulta na magnetização \vec{M} , que corresponde ao momento magnético líquido por volume do material. A relação entre a magnetização e o campo magnético externo obedece à equação 3.1:

$$\vec{M} = \chi \vec{H} \quad \text{Eq. 3.1}$$

onde χ é a susceptibilidade magnética do material. Valores positivos de χ indicam alinhamento do campo induzido na mesma direção do campo externo, enquanto valores negativos indicam oposição ao campo (que configura um material diamagnético). Dessa forma, pode-se identificar a natureza magnética do material a partir desse parâmetro. Materiais ferromagnéticos, por exemplo, possuem momento magnético líquido não nulo (intrínseco); ao serem expostos a campo magnético externo, os momentos de dipolo magnéticos alinham-se na direção do campo, por conseguinte, sua susceptibilidade magnética é positiva e elevada.

Usualmente, materiais ferromagnéticos massivos possuem diversas regiões de volume micrométrico de magnetização não nula denominadas domínios magnéticos (figura 3.1). Esses domínios são separados por paredes cujo equilíbrio, isto é, a estabilidade das barreiras, depende da energia de domínio de parede (dependente da área da interface entre domínios) e da energia magnetoestática (proporcional ao volume do material).

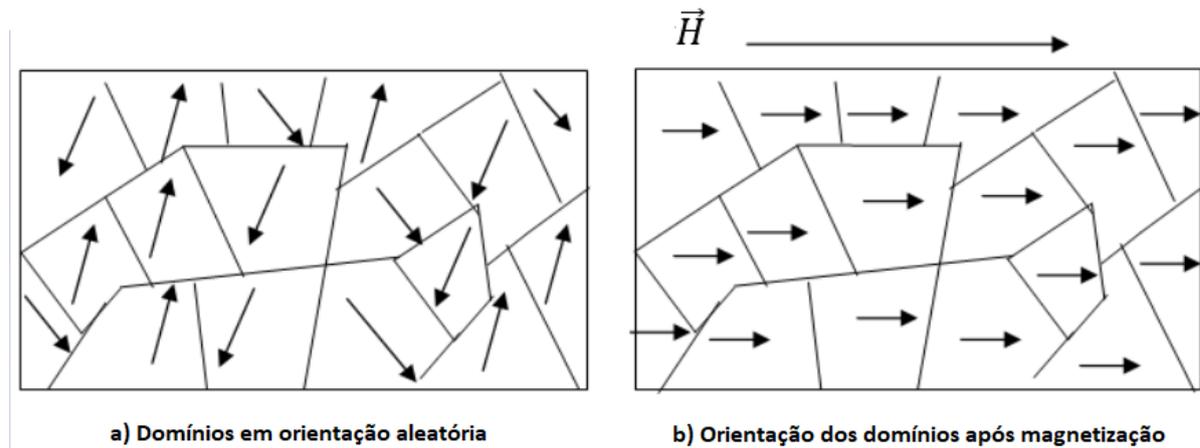


Figura 3.1. Representação de domínios magnéticos antes e após magnetização devido a campo externo. Imagem adaptada de <https://www.electrical4u.com/ferromagnetic-materials/>, em 01/08/2020.

Materiais de dimensões pequenas possuem um número reduzido de domínios magnéticos; a partir de um diâmetro crítico, que pode ter até dezenas de nm, a energia de domínio de parede é menor do que a energia magnetoestática, o que torna a permanência das paredes energeticamente desfavorável e possibilita a formação de monodomínios magnéticos⁴⁶.

No contexto de materiais nanoestruturados, as NPMs podem possuir pequenos domínios magnéticos ou um monodomínio, a depender de suas dimensões e composição. No caso de superparamagnetismo, as NPMs possuem monodomínio e os momentos magnéticos dos átomos mantêm-se ordenados entre si, ainda que, devido a flutuações térmicas, a magnetização líquida da SPION seja nula. Quando expostas a um campo externo, os momentos de dipolo da partícula orientam-se rápida e coerentemente em relação ao campo, e os momentos magnéticos apontam para uma mesma direção, atingindo a magnetização de saturação. Cessado o campo, a magnetização líquida rapidamente retorna a zero, não apresentando magnetização residual e consequente histerese.

A estrutura molecular das SPION integra-a no grupo de materiais denominados ferritas cúbicas, que são compostas por óxidos metálicos magnéticos como a magnetita e a maguemita, e possuem estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio. No contexto biomédico, as NPs de núcleo composto por óxido superparamagnético (SPION) são classificadas de acordo com o seu diâmetro hidrodinâmico em meio aquoso, e recebem as seguintes nomenclaturas: SPION oral, entre 300 nm e 3,5 μ m; SPIO polidispersa (PSPION), entre 50 e 150 nm; e SPIO ultra-pequena (USPION), de diâmetros hidrodinâmicos inferiores a 40 nm. Quando o núcleo é revestido com polissacarídeo reticulado aminado, passa a ser classificado como *crosslinked iron oxide*, ou CLIO-NH₂⁷², que é a classificação do material nanoestruturado utilizado nest trabalho.

3.3. Dextrana como revestimento de SPIONs

A aglomeração de NPs é particularmente crítica em suspensões aquosas. A consequente formação de estruturas de escala micrométrica, isto é, agrupamentos de centenas de NPOFe individuais, faz com que a solução perca as propriedades inerentes à escala nanométrica, o que compromete a eficácia proposta do nanomaterial. Além disso, a estabilização da solução é fundamental para que, uma vez dentro do organismo, a sua toxicidade mantenha-se dentro do limite esperado. Esse obstáculo é contornável através do uso de revestimentos (*coatings*) na superfície das NPs, que podem ser compostos por materiais biocompatíveis, como a sílica e o óxido de titânio, polissacarídeos como a dextrana (C₆H₁₂O₆)_n, polietileno glicol (PEG)^{11,14,43,47-49}, além de outras biomoléculas. Além de melhorarem a biocompatibilidade da NP, os revestimentos auxiliam na manutenção da estabilidade das NPs em suspensões. Ademais, os *coatings* possibilitam alto grau de especificidade biológica, sendo um elemento essencial na área de *drug delivery*. Se a molécula que constitui o *coating* possuir afinidade química com um tecido em particular, a nanopartícula tende a se acumular nesse tecido em maior quantidade. Através da marcação de agentes de contraste com moléculas de glicose, por exemplo, é possível visualizar regiões do organismo com processos metabólicos mais intensos, que possuem grande demanda

de energia, como tumores e inflamações. Esse tipo de agente de contraste marcado é particularmente útil na detecção de malignidades e processos metastáticos.

Tal mecanismo de marcação e acumulação em tecidos específicos é aplicável a nanopartículas de óxido de ferro através do uso de *coatings*, e a dextrana é um dos exemplos mais comuns de revestimentos utilizados em NPOFe no contexto de MRI. A dextrana é um biopolímero composto por cadeias de moléculas de glicose com massa molar entre 10 e 50 kDa de modo a manter o revestimento hidrossolúvel, uma vez que se tornam insolúveis em dimensões acima do limite citado anteriormente (acima de 50 kDa). Portanto, essencialmente, a dextrana é uma cadeia polimérica com unidades de glicose. Além disso, o corpo humano possui mecanismos de excreção da dextrana, o que impede meias-vidas biológicas elevadas e, conseqüentemente, reduz sua toxicidade. Tais fatores justificam o uso comum desse material como revestimento de NPs no contexto biomédico.

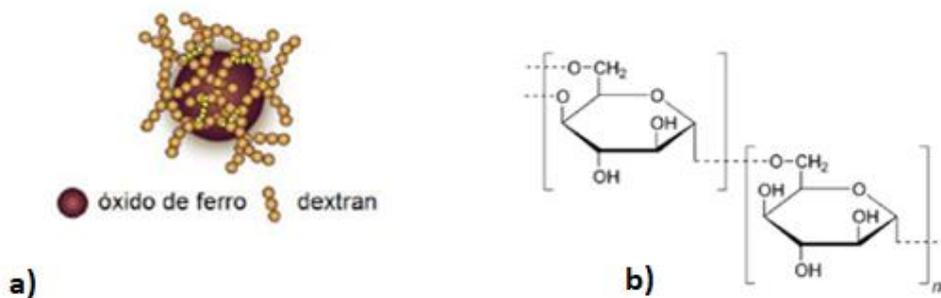


Figura 3.2. Nanopartícula com núcleo de óxido de ferro revestido com dextran, b) estrutura química do dextran. Imagem adaptada de Oliveira (2018), em 01/08/2020.

3.4. Interação de nanopartículas com sistemas biológicos

As propriedades físico-químicas únicas de nanomateriais (propriedades dependentes de tamanho e forma, elevada razão superfície-volume e possibilidade de combinação

com outros materiais) em relação a materiais massivos são exploradas em diversos campos de ciência e engenharia dos materiais, além de serem amplamente empregados no contexto biomédico. Em medicina, são úteis tanto em diagnóstico por imagem quanto em terapia^{9,26,50-54}. Tal versatilidade de aplicações em múltiplos setores da sociedade fazem com que nanomateriais estejam presentes em diversos produtos de consumo, como cosméticos, brinquedos, equipamentos esportivos, alimentos, entre outros⁵⁵. Nesse cenário, os nanomateriais podem ser liberados em sistemas de esgoto e no meio ambiente e eventualmente são ingeridos por seres vivos através da ingestão de água e de alimentos, pela inalação de aerossóis (aglomerados micrométricos de partículas em suspensão no ar), ou pela absorção via tecido epitelial^{29,55}. Por isso, apesar dos benefícios proporcionados pela nanotecnologia, deve-se atentar a possíveis efeitos deletérios causados pela exposição ambiental a nanomateriais. Técnicas de imageamento e expressão gênica realizadas em ensaios *in vitro* de exposição a NPs demonstram que a endocitose é um importante mecanismo de absorção desses materiais por tecidos biológicos^{26,27,55}. Também é possível que NPs atravessem membranas celulares por difusão simples ou por danos causados a canais iônicos e proteínas transmembrana^{25,55,56}. Uma vez dentro da célula, os efeitos variam de acordo com o tamanho, a forma e o revestimento do nanomaterial. As interações entre NPs e células podem ser inertes, ou podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS, que surgem principalmente pela quebra de moléculas de água, liberando íons reativos no meio), que em grandes concentrações podem levar a processos apoptóticos (morte celular autoinduzida)^{55,57}. O tamanho e a funcionalização são propriedades que influenciam a distribuição e a eliminação das nanopartículas de organismos que as absorvem^{1,3,35,43,55}.

Estudos de absorção e biodistribuição de SPIONs realizados em humanos indicaram que, uma vez na corrente sanguínea, as SPIONs acessam o fígado através da veia porta ou artéria hepática, e seguem através de capilares a células endoteliais sinusoidais (integrantes do sistema reticuloendotelial, ou RES), cujo meio intersticial é habitado por células de Kupffer³⁷. Essas células são macrófagos, que, dentre outras funções, fagocitam eritrócitos (hemácias) envelhecidos e reciclam a hemesoglobina³⁷, que é uma metaloproteína com ferro em sua estrutura e é responsável pelo transporte de oxigênio na corrente sanguínea de quase todos os vertebrados, incluindo seres humanos e peixes-zebra. Além do papel fisiológico que

desempenham, as células de Kupffer são eficientes em fagocitar nanopartículas em circulação ^{28,37,55}. Por esse motivo, sistemas ricos em macrófagos são acumuladores de SPIONs, o que torna agentes de contraste baseados em nanopartículas de ferro ou óxido de ferro eficazes para o imageamento do fígado e do baço por MRI.

No fígado, além da presença de células que fagocitam as SPIONs, um outro aspecto facilitador para o seu acúmulo são fenestrações (fendas) da ordem de 150 a 200 nm presentes no RES hepático, através dos quais ocorre o trânsito de qualquer NP de tamanho inferior a esse intervalo. Tais fenestrações costumam ser menores em RES de outros tecidos ²⁸. No meio intracelular das células do RES hepático, as SPIONs são absorvidas por lisossomos, dentro dos quais ficam retidas em um intervalo de tempo dependente das propriedades físico-químicas da NP (tamanho, carga superficial, revestimento etc.), enquanto são degradadas em íons de ferro (ferro livre). Isso faz das SPIONs um agente de contraste intracelular. Os íons de ferro acumulam-se no interior dos lisossomos, que em situações de concentrações elevadas do metal podem sofrer degradação ^{37,55}. Isso induz a produção de ferritina, uma proteína armazenadora de ferro que serve como marcador biológico de concentração e acúmulo de ferro em tecidos. Quando secretada em grande quantidade, a ferritina induz a produção de enzimas que desencadeiam resposta anti-inflamatória à sobrecarga de ferro no meio intracelular. Em alguns casos, essa resposta pode levar a processo apoptótico (morte celular) ^{37,55,58}.

As SPIONs que não são metabolizadas pelo sistema hepático ou fagocitadas por macrófagos de outros sistemas são eliminadas gradualmente pelos rins, cuja eficiência de absorção e filtração são dependentes de tamanho e peso molecular do revestimento das NPs. Quando menores do que 5,5 nm, SPIONs são facilmente eliminadas pelos rins; até aproximadamente 9 nm, a filtração renal ocorre de forma lenta, podendo chegar a uma meia-vida biológica de até 20 h ³⁵. Quando recobertas com dextrana, se forem partículas menores de 80 nm com revestimento de baixa massa molar (menor que 10 kDa), os RES hepático e esplênico assimilam-nas. Caso possuam maior massa molar, a enzima dextranase, sintetizada por órgãos como fígado, baço, cólon e rins, deve ser produzida em maior quantidade para que auxilie na degradação e posterior eliminação.

Portanto, dados provenientes principalmente de investigações em humanos apontam que a biodistribuição de SPIONs ocorre preferencialmente nos sistemas hepático e esplênico, o que pode ser o caso para peixes-zebra.

3.5. Peixe zebra como animal modelo em estudos toxicológicos

Apesar de fornecerem dados importantes sobre os mecanismos de interação entre NPs e tecidos biológicos, é sabido que a resposta toxicológica em culturas celulares pode ser muito distinta da obtida em um organismo intacto²⁶⁻²⁸. Além disso, a falta de padronização de procedimentos experimentais de síntese e caracterização das NPs pode ser causa importante de disparidades observadas entre dados obtidos *in vitro* e *in vivo*²⁷. Não obstante, dados referentes a vias de absorção e incorporação, biodistribuição (acumulação, órgãos e tecidos alvos) e eliminação de NPs, além de parâmetros de nanotoxicidade como taxa de mortalidade e alterações de comportamento, requerem estudos em sistemas *in vivo* para compreensão mais ampla de efeitos deletérios da exposição a nanomateriais.

O peixe-zebra (*Danio rerio*, Fig. 3.3) é um teleósteo de água doce, da família *Cyprinidae*, naturalmente encontrado no sul e no sudeste da Ásia. Seu uso como modelo animal em estudos embriológicos foi amplamente utilizado a partir da década de 1930, facilitado pelos fatos de esse animal ser transparente em estágios embrionário e larval, e de sua fecundação ser externa. Tais características permitem a observação e acompanhamento de eventos de desenvolvimento embrionário por microscopia ótica do animal em vida. Possuindo entre 3 e 4 cm, seu tamanho o torna facilmente adaptável a aquários, conferindo-lhe baixo custo de manutenção se comparado a outros modelos animais, como roedores, além de permitir o estudo de um número maior de animais sujeitos a um mesmo experimento, que é também facilitado pela alta taxa de fecundação do peixe-zebra. Outra propriedade interessante é o rápido desenvolvimento: a embriogênese completa-se em 72 horas pós-fertilização, estágio no qual a larva já eclodiu e a maioria de seus órgãos internos está formada; a partir de cinco dias pós-fertilização (5 dpf), a larva passa a alimentar-se pela boca, e entre 3 e 6 meses sua maturação sexual está completa. A similaridade genética, o desenvolvimento dos sistemas nervoso, excretor e cardíaco, e respostas toxicológicas entre esses animais e seres humanos, aliadas às vantagens logísticas de seu uso, o tornam um modelo animal interessante em diversas áreas do conhecimento, dentre as quais inserem-se a farmacologia e a toxicologia. A pesquisa nessas áreas faz amplo uso de peixes-zebra pela sua rápida incorporação e

acumulação em diferentes tecidos de compostos dissolvidos na água em que vivem (em ambientes controlados de pesquisa, é denominada água do sistema).

O peixe-zebra em fase embrionária, larval e adulta tem sido bastante utilizado como modelo animal para estudo de diferentes nanopartículas metálicas^{18,28,40,59–62}. Em relação à classe das SPIONs, há evidência de que SPIONs puras (sem revestimentos) em concentrações maiores que 10 mg/L estão associadas a malformações, atrasos na taxa de eclosão e até mortalidade elevada^{14,63}. No entanto, o potencial toxicológico de SPIONs com diferentes revestimentos é ainda pouco explorado nesse modelo animal.



Figura. 3.3. Peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto. Fonte <https://en.wikipedia.org/wiki/Zebrafish>, acessado em 20/07/2020

3.6. Técnicas de caracterização da biodistribuição em sistemas biológicos

A avaliação de vias de absorção, eliminação, biodistribuição e parâmetros de toxicidade em sistemas *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* pode ser realizada a partir de diferentes abordagens. Características inerentes a técnicas de caracterização como custo, complexidade da preparação de amostra, resolução espacial ou energética e tempo de aquisição de dados exigem que várias técnicas sejam utilizadas complementarmente para um mesmo problema de pesquisa. Dentre as técnicas que possibilitam a visualização de vias de absorção, acumulação e eliminação das NPs, destacam-se as que apresentam a melhor relação entre resolução espacial (capacidade de distinguir estruturas próximas) e sensibilidade (parâmetro associado ao limite de detecção)²⁵. Análises de pontos fixos na amostra não fornecem informações espaciais, pois são geralmente realizadas em amostras homogeneizadas

e isotrópicas, isto é, a composição e a distribuição elementar não variam ao longo das dimensões da amostra. Esse tipo de análise pode ser representada por técnicas como PIXE (emissão de raios-X estimulada por partícula), ICP-MS (espectroscopia de massa por indução de plasma acoplado), espectroscopia Raman, DRX (difração de raios-X) e XRF (espectroscopia por fluorescência de raios-X)^{30–32,62,64,65}. Essas técnicas permitem a quantificação multielementar de amostras orgânicas e inorgânicas, mas não fornecem dados sobre a biodistribuição desses elementos, isto é, não é possível extrair a localização dos elementos na amostra analisada. Além disso, a informação obtida através dessas técnicas não distingue NP de elemento livre, e as técnicas não possuem resolução suficiente para que se determine se o elemento (ou NP) está ligado a arranjos moleculares mais complexos – essa limitação é contornada por técnicas de espectroscopia de massa por íons secundários (SIMS), que possibilita a diferenciação entre elemento ligado e elemento livre⁶⁶. Contudo, aquelas técnicas de análise de ponto fixo possuem baixos tempos de aquisição e o preparo de amostras é relativamente simples, e por isso são empregadas em avaliações iniciais para verificar se houve incorporação do nanomaterial no modelo investigado.

O uso complementar de diferentes técnicas é necessário para uma avaliação mais completa da biodistribuição elementar. Por exemplo, a microscopia confocal possibilita a visualização *in vivo* da interação do nanomaterial com o organismo, mas o limite de resolução espacial e ampliação não permite o detalhamento de estruturas internas em escala sub-micrométrica, além de que necessita a adição de um componente fluorescente. Por outro lado, microscopias eletrônicas de varredura (SEM) e transmissão (TEM) possuem resoluções espaciais que permitem a identificação de nanopartículas em meios extra e intracelulares *ex vivo*, mas a custo de preparação de amostra mais complexa, potencialmente danosa à integridade morfológica e química do material biológico⁶⁷.

A aquisição de imagens em alta resolução espacial e sensibilidade na detecção de elementos-traço geralmente exigem técnicas de alto custo de aquisição e manutenção, de protocolos de preparação de amostra mais complexos e de maiores tempos de aquisição, o que muitas vezes inviabiliza a análise^{25,26}. Nesse grupo pode-se citar espectroscopia Raman, micro-XRF (micro fluorescência de raios-X) e LA-ICP-MS (ICP-MS por ablação de *laser*), que possibilitam o mapeamento multielementar em boa resolução espacial e a quantificação elementar em baixos limites de detecção

(na faixa de ppm a ppb), ainda que não distingam se o sinal é proveniente de NPs ou de elementos livres. Esse grupo também engloba a técnica de micro-PIXE, que possui alta sensibilidade para elementos de $Z > 11$, mas resolução espacial inferior a micro-XRF ou LA-ICP-MS. A espectroscopia por dispersão de energia (EDS), por ser acoplada a sistemas SEM e TEM, possibilitam a caracterização elementar da amostra, ainda que usualmente seja utilizada qualitativamente.

Neste trabalho, a técnica micro-PIXE foi utilizada para avaliação da biodistribuição de SPION-DX no corpo das larvas e para quantificação de ferro em larvas de peixes-zebra. Complementarmente, a técnica de ICP-MS foi utilizada para quantificação do ferro presente nas larvas.

3.7. Emissão de raios-X estimulada por partículas (PIXE)

3.7.1. Interação de íons carregados com a matéria

Quando um feixe primário de carga elétrica não nula é incidido sobre uma amostra, podem ocorrer diversos processos de interação de íons com a matéria, cujas seções de choque (proporcional às probabilidades de ocorrência de determinada interação) dependem de parâmetros de feixe, como energia e carga, e do material, como o número atômico, a densidade e a distribuição de matriz elementar (os elementos principais que constituem o material em certa proporção; o somatório de massa atômica de cada elemento da matriz representa aproximadamente toda a massa da amostra). Um feixe iônico que incide sobre determinado material deposita nele parte de sua energia e a perda média de energia por unidade de comprimento ao longo de sua trajetória (dE/dx) é definida como poder de freamento. Essa grandeza é diretamente associada à distância que o feixe consegue penetrar no material: quanto maior o poder de freamento, mais energia o feixe deposita no meio ao longo de sua trajetória, e, conseqüentemente, menor é a distância percorrida, definida como alcance. No contexto da técnica PIXE, a perda média de energia do feixe primário ocorre via colisões inelásticas com os átomos do material. Quando uma colisão provoca ionização dos átomos em orbitais mais próximos ao núcleo (camadas K, L e M), a vacância gerada pode ser ocupada por outro elétron de uma camada mais exterior, e a diferença de energia entre os orbitais pode se manifestar na forma de

raios X característicos, de distribuição discreta de energia. Como a energia do raio X característico é igual à diferença de energia de ligação dos elétrons nas camadas envolvidas na transição e essa energia é característica de cada átomo da tabela periódica, pode-se associar a energia da radiação a um elemento químico particular, e por isso são denominados raios X característicos. Essa radiação é o componente fundamental de técnicas como o PIXE, que permitem a caracterização e quantificação multielementar em limites de detecção na faixa de ppm.⁶⁸ Outro fenômeno decorrente dessa interação é a emissão de radiação de freamento (*bremmstrahlung*), de distribuição de energia contínua, que ocorre quando elétrons ejetados dos átomos ionizados são desacelerados pela interação dos elétrons com a matéria. A intensidade de emissão é proporcional ao inverso do quadrado da massa do íon frenado, e por esse motivo a contribuição da radiação de freamento por prótons é desprezível no sinal detectado. Ambas as radiações (característica e freamento) compõem um espectro típico de PIXE, que pode ser observado na Figura 3.4.

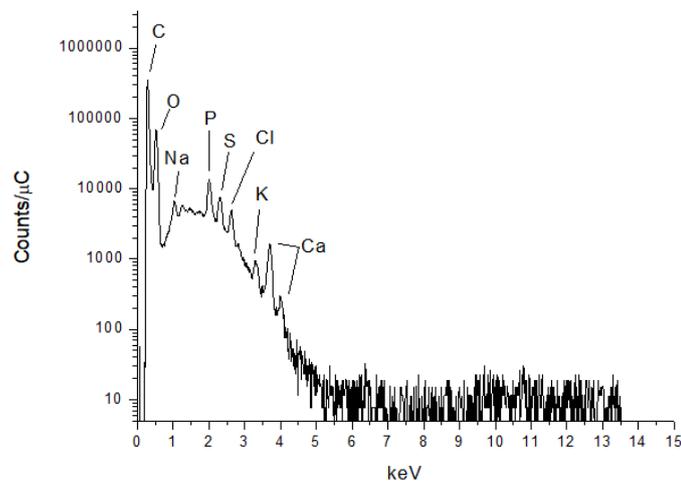


Figura. 3.4. Espectro de uma larva de peixe-zebra, adquirido em 12/2019, no Laboratório de Implantação Iônica da UFRGS.

3.7.2. Fundamentos da técnica

Na primeira metade da década de 1970, Johansson⁶⁹ demonstrou o uso de um detector de estado sólido de Si(Li) para detecção de raios-X característicos gerados da interação entre um material alvo e um feixe de prótons de 2 MeV. A partir de então a técnica de PIXE passou a ser explorada ativamente em física experimental, ciência dos materiais e ciências biológicas, tornando-se importante técnica de caracterização elementar. A instrumentação utilizada nos primeiros trabalhos de Johansson configura as técnicas PIXE até hoje, ainda que sejam exploradas alternativas em detectores, geometria e energias de feixe. Johansson também foi pioneiro em explorar a técnica de PIXE para mapeamento multielementar de amostras. Enquanto o PIXE convencional consiste na irradiação de amostras com um feixe estático de alguns milímetros quadrados, a técnica de “micro-PIXE” varre amostras com um feixe colimado em diâmetros micrométricos. Além de gerar um espectro multielementar, o software associado ao sistema micro-PIXE é programado para gerar mapas bidimensionais dos elementos detectados, e a aquisição de mapas contendo diferentes canais de energia é possível em pós-processamento dos dados. Além disso, por ser uma adaptação da técnica PIXE, é possível realizar a quantificação elementar a partir dos espectros multielementares de raios-X característicos. Sendo assim, a técnica de micro-PIXE é uma opção interessante no estudo de toxicidade de materiais. Podem ser listadas aplicações como: retenção de NPs metálicas em modelos animais invertebrados^{70,71} e caracterização multielementar de órgãos de animais³¹; absorção e distribuição de metais pesados como Pb, Cd e Zn em plantas (mapeamento de sementes, folhas, caules e raízes⁷²⁻⁷⁴).

3.7.3. Instrumentação básica

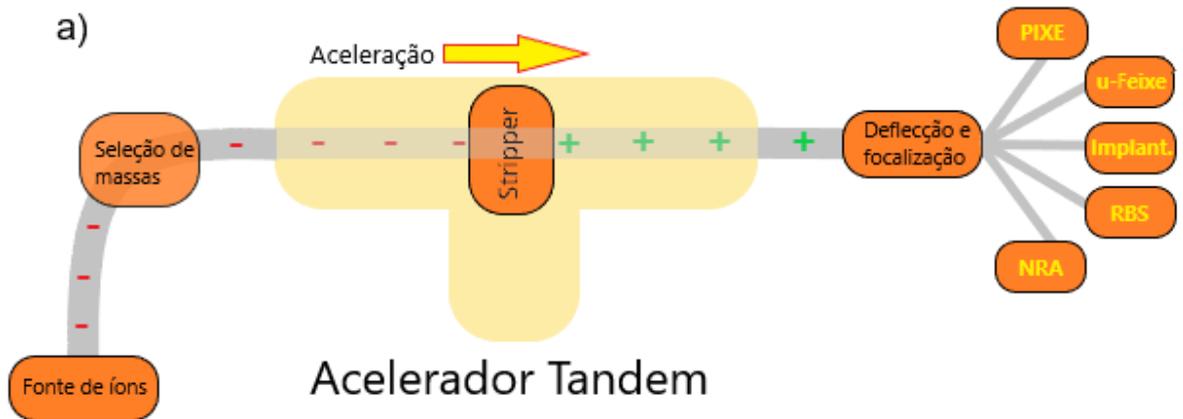


Figura. 3.5. a) etapas de aceleração e modulação do feixe no Tandem 3 MV; b) fotografia do acelerador, com as diferentes linhas de análise em evidência

A Figura 3.5 ilustra a instrumentação básica do acelerador Tandem 3 MV do Laboratório de Implantação Iônica da UFRGS, onde se deram as análises por micro-PIXE. Íons de carga elétrica negativa, extraídos de uma fonte gasosa do tipo *duoplasmatron*, são acelerados através de campo elétrico e filtrados por massa, através de campo magnético, cuja aceleração por ele induzida seleciona os íons que deverão compor o feixe. Em seguida, os íons negativos são acelerados em trajetória linear através do acelerador até o terminal de potencial positivo do acelerador e atravessam um *stripper* gasoso composto por N_2 , onde sua carga elétrica se torna

positiva. O feixe é novamente acelerado e defletido para a linha de interesse, que, no caso deste trabalho, é a linha de micro-feixe. Já na linha de micro-feixe, o feixe é colimado por sistema de fendas, e então focalizado por um sistema de quadrupolos magnéticos operantes em modo tripleto com intensidade de campo ajustável. Finalmente, o feixe é direcionado ao alvo, onde a amostra é posicionada. O sistema de varredura localiza-se antes do sistema de focalização. Durante a varredura, a posição é atualizada e associada a cada medição, o que, após o processamento, produz uma imagem bidimensional de contagens de diferentes energias. Os raios-X gerados da interação entre o feixe e o alvo são detectados por detectores de estado sólido, comumente de silício dopado com lítio ou germânio hiperpuro – Si(Li) ou HPGe, respectivamente, sendo o último mais sensível para energias mais altas. Esses detectores fazem parte da instrumentação da linha de PIXE do LII; o detector utilizado na linha de micro-feixe é do tipo *silicon drift*, também empregado em MEV-EDS e outras técnicas de imageamento envolvendo raios-X.

3.7.4. Aspectos experimentais

Como a técnica depende da detecção de raios-X característicos para a caracterização e quantificação elementar de uma amostra, a produção elevada de *bremstrahlung* é indesejada, pois esse sinal é tratado como ruído e pode prejudicar a detecção de elementos traços. Se a espessura da amostra for da ordem de grandeza do alcance do feixe de íons, a energia média depositada pelo feixe gerará um sinal elevado de ruído, e por esse motivo é preferível irradiar amostras finas que permitam alta transmitância do feixe, isto é, um baixo número de interações com a amostra⁷⁵. Esse é um aspecto desafiador em micro-PIXE aplicado a amostras biológicas, uma vez que a obtenção de cortes da ordem entre centenas de nm e dezenas de um é consideravelmente complexa. Outro obstáculo associado à espessura da amostra é relacionado aos tempos de aquisição de dados. Como a massa de tecido presente em uma amostra de tais espessuras é bastante pequena, são necessários altos tempos de irradiação para que os picos de contagem de elementos traços se sobressaiam em relação ao ruído. O tempo médio de irradiação de uma amostra em fatia fina (micrométrica) é de 1h a 3h, e as dificuldades de preparo de amostras fatiadas

restringem o número amostral de larvas adquirido por bateria de medição. Isso pode ser contornado ao irradiar-se amostras espessas, mas o elevado ruído e os efeitos de matriz devem ser corrigidos para que se possa realizar a quantificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é dedicado à descrição dos materiais, equipamentos, procedimentos e análises realizados ao longo do desenvolvimento do trabalho. Serão descritos os procedimentos de síntese e caracterização das SPION-DX, o preparo e a exposição dos peixes-zebra às SPION-DX, os protocolos de preparação de amostra utilizados e a caracterização das amostras via micro-PIXE.

4.1. Síntese das SPION-DX

As SPION-DX foram sintetizadas no Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia da PUCRS (NanoPUC), pelo protocolo de coprecipitação na presença de dextrana T-10 (Pharmacosmos).⁷⁶ No método de coprecipitação, o óxido de ferro presente em uma solução é precipitado através da mistura com sais ferrosos e férricos, cuja razão estequiométrica utilizada é um dos fatores determinantes para o tamanho, a forma e a composição das NPs produzidas. Tais características também são dependentes do pH, do tipo de sal de ferro, da base utilizada e da temperatura de mistura.

O protocolo é iniciado a partir da dissolução de 9 g de dextrana em 30 mL de água Mill-Q®, mantida em agitação magnética por 12h à temperatura ambiente. Sequencialmente, 0,65g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ são adicionados à solução de dextrana em banho de gelo, que ficam em agitação por 30 minutos. Passado o tempo, a solução em banho de gelo é exposta a fluxo de N_2 , para que 0,40g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sejam adicionados à mistura. Por último, 10 mL de hidróxido de 25% são vagorosamente gotejados na solução, que foi mantida em agitação magnética por 24 h. A purificação da dispersão é realizada em duas etapas. O hidróxido de amônio, potencialmente tóxico para os peixes-zebra a serem expostos, é eliminado através de diálise (MWCO 12-14 kDa, Millipore). Por fim, a dispersão de NPs é lavada com água Mill-Q® através de centrifugação a aproximadamente 4000 rpm em tubos *Amicon* (50 kDa, Millipore), durante 30 minutos, para remover resíduos de hidróxido de amônio, dextrana excedente (não ligada) e outras impurezas provenientes da síntese que não tenham sido retiradas via diálise. Encerrada a purificação, realiza-se a estabilização do pH a 7 e a reticulação da dextrana, sob agitação magnética, por 15 min, através da adição

de 35 mL de solução de hidróxido de sódio 5 M (Merck) a resfriado em banho de gelo e 14 mL de epicloridrina (Sigma-Aldrich) à dispersão. O produto (dispersão concentrada de NP de Fe₃O₄ revestidas com dextrana) é então mantido a 4 °C e rotulado “SPION-DX”. As diluições às quais as larvas foram expostas serão chamadas de “solução de tratamento”.

4.2. Técnicas de caracterização das SPION-DX

A síntese de SPION-DX utilizada neste trabalho foi caracterizada por algumas técnicas cujos procedimentos e resultados estão descritos detalhadamente em Oliveira (2018)⁷⁷, realizadas antes do início deste projeto: a estrutura cristalina foi caracterizada por difração de raios-X (DRX), em equipamento modelo 7000, fabricante Shimadzu, e D8 Advanced, fabricante Bruker, no Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia (NanoPUC); o comportamento superparamagnético foi demonstrado via magnetômetro de amostra vibrante (VSM), equipamento modelo EZ9 do fabricante Microsense, localizado no Laboratório de Magnetismo da UFRGS; a análise de grupos funcionais acoplados às NPs foi verificada por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), modelo Spectrum One, fabricante Perkin-Elmer, localizado na Escola de Ciências da PUCRS; relaxometria magnética nuclear (RN) foi utilizada para mensurar as taxas de relaxação magnética nuclear longitudinal (R1) e transversal (R2) em 0,47 e 1,41 T, em relaxômetro modelo Minispec mq, fabricante Bruker, localizado na Universidade de Mons – Bélgica. As técnicas e procedimentos de caracterização executados no decorrer deste projeto serão descritos a seguir.

4.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão possibilita a aquisição de micrografias em alta resolução espacial e visualização de padrões de difração de estruturas cristalográficas. Ela consiste na irradiação da amostra por um feixe de

elétrons de energia suficiente para ele que seja transmitido através da amostra, oscilando entre 80 e 300 keV. Na câmara do microscópio eletrônico, o feixe passa por conjunto óptico de lentes eletromagnéticas de focalização e magnificação. A imagem é formada pelos elétrons transmitidos através da amostra, mais comumente detectados por um detector tipo CCD (dispositivo de carga acoplada, em inglês).⁶⁷

Morfologia e tamanho das SPION-DX foram obtidos através de TEM (JEM-2010 200 kV, JEL, no LABCEMM-PUCRS). A preparação de amostras foi realizada a partir da solução concentrada. A solução passa por banho de ultrassom (40 kHz) por 10 min e é agitada em vórtex. Na sequência, ela é diluída 300 vezes em água Milli-Q®, e 10 μ L são pingados em grades de cobre/carbono. As grades são mantidas em dessecadora por pelo menos 24h, para que evaporem completamente e estejam adequadas à análise. As medidas de diâmetro médio foram obtidas realizadas através do software ImageJ®, com contagem mínima de 100 partículas por imagem.

4.2.2. Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta (DLS e ELS)

Através dessa técnica, é possível mapear o comportamento de macromoléculas, nanopartículas e micropartículas em suspensão. Pode-se determinar o diâmetro hidrodinâmico de partículas com tamanhos que variam entre 0,6 e 6 μ m, bem como a distribuição de tamanhos dessas partículas analisadas. O fundamento teórico da técnica consiste na detecção de radiação espalhada pela interação entre um laser de frequência característica e as partículas em suspensão da amostra.⁷⁸ Nessa solução há partículas de diferentes tamanhos movendo-se em movimento browniano pelo meio líquido que as mantém em suspensão, colidindo aleatoriamente entre si e com outras partículas do meio. Nesse contexto, as partículas de maior massa terão velocidade média menor do que as partículas de menor massa. Quando o laser interage com as partículas, a intensidade de radiação espalhada varia com o tempo de medida devido ao movimento browniano, e a intensidade da radiação

que chega ao detector flutua com o movimento das partículas. Essa incerteza pode ser quantificada e exibida como um histograma de distribuição de tamanhos.

O mesmo equipamento utilizado para medição do diâmetro hidrodinâmico das SPION-DX foi utilizado para medição do potencial zeta, parâmetro que reflete a estabilidade coloidal do sistema em suspensão, como tendência a aglomeração, e que consiste na carga superficial da partícula. A técnica de caracterização do potencial zeta é o espalhamento de luz eletroforético (ELS), fundamentado na medição da mobilidade eletroforética através de velocimetria de laser doppler (LVV) velocidade de partículas em suspensão sujeitas a um campo elétrico. Essa medida de velocidade das partículas em suspensão, considerando o campo elétrico aplicado, a constante dielétrica do meio e a viscosidade do líquido, é relacionável à carga superficial das partículas⁷⁹.

Propriedades coloidais foram aferidas por DLS e ELS através do equipamento Zetasizer (Malvern). As amostras foram preparadas a partir da diluição em Milli-Q de 100x do volume da solução original de SPION-DX. Na sequência, a solução passou por banho ultrassônico e agitação em vortex por 10 min.

4.2.3. Espectroscopia ultravioleta (UV-VIS)

A técnica de UV-VIS permite a análise de espectros de absorção de radiação na faixa do ultravioleta e do visível (100 a 800 nm). O espectrofotômetro consiste em duas fontes de radiação, uma lâmpada de tungstênio, para emissão na faixa do visível, e uma de deutério, para emissão na faixa do UV. A radiação passa por um monocromador, que dispersa os comprimentos de onda do feixe, e por um sistema de fendas, que seleciona o comprimento de onda desejável para a amostra. O detector recebe o sinal da intensidade de radiação transmitida pela amostra, e o sistema exibe o espectro de absorção. Nesse espectro, os vales correspondem aos comprimentos de onda que foram absorvidos pelos elétrons de átomos da amostra, possibilitando a quantificação do elemento presente na amostra, aplicável a análises de materiais orgânicos e inorgânicos em solução⁸⁰.

O espectrofotômetro UV-VIS modelo Lambda 35 (Perkin Elmer) foi utilizado para determinação teor de ferro da solução de tratamento, isto é, sua concentração molar, para o comprimento de onda de 410 nm. A partir de uma curva de calibração obtida por soluções padrão de ferro de concentrações entre 0,1 e 10 mg/mL determinou-se a concentração molar da solução de SPION-DX, que possibilitou a diluição em concentrações molares conhecidas.

4.2.4. Espectroscopia de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

Essa técnica de espectroscopia de massa possibilita a caracterização elementar da amostra com limite de detecção na faixa de partes por bilhão (ng/L). A amostra, que deve estar em estado líquido, é pulverizada e direcionada à câmara que contém plasma (comumente produzido a partir de gás argônio, podendo chegar a temperaturas de até 10000 K)⁸¹. O plasma ioniza e atomiza a amostra, cujas partículas resultantes são extraídas e focalizadas por sistema de lentes eletrostáticas, e então conduzidas através de um sistema de quadrupolo que separa os íons de acordo com a sua razão carga massa. Os íons selecionados são detectados por um detector eletromultiplicador, no qual o impacto do íon com o dinodo provoca emissão secundária de elétrons, que por sua vez provocam emissões secundárias em cascata e amplificam o sinal inicial, possibilitando altas sensibilidades na detecção de elementos traços.

As águas do sistema onde estão contidas as larvas de peixe-zebra são retiradas diariamente ao longo do tratamento, e analisadas para controle da concentração de ferro em função do tempo. A quantificação do ferro presente nessas águas permite verificar se há flutuações observáveis na absorção do ferro ao longo do tratamento. A análise das águas por ICP-MS (Agilent ®) foi realizada no Instituto de Toxicologia da PUCRS. Para o preparo das amostras, realiza-se digestão ácida das águas em solução de 300 µL de HNO₃ e 200 µL de H₂O₂, à temperatura ambiente. À solução resultante adiciona-se padrão interno de escândio a concentrações de 25 e 500 ppm. A curva de calibração do ferro é feita a partir de um padrão de ferro (Merck) diluído em concentrações de 0,1 ppb até 500 ppb, com 25 ppb do padrão interno adicionado a cada diluição.

4.3. Tratamento das larvas com SPION-DX

A figura 4.4 esquematiza o protocolo de exposição realizado, baseado Oliveira (2020)⁷⁶. Peixes-zebra da linhagem AB selvagem foram obtidos e criados no biotério do Centro de Modelos Biológicos Experimentais da PUCRS (CeMBE). Esses animais são mantidos em água do sistema de recirculação por osmose reversa equilibrada com sal marinho (Instant Ocean ®), com ciclos de dia-noite de 14/10 horas e temperatura de 28 ± 2 °C, e são alimentados três vezes ao dia com ração e paramécio.

A primeira etapa de tratamento consiste na reprodução dos embriões. Para tanto, à noite, foram separados peixes-zebra adultos em proporção de 2 machos para 1 fêmea. Eles foram alocados em recipiente com água do sistema com uma barreira divisória transparente, que separava machos e fêmeas. A barreira foi removida na manhã seguinte, e, após 30 minutos, os embriões fertilizados foram recolhidos e limpos em placas petri com água do sistema. Na segunda etapa, o tratamento é iniciado. 2 horas após a fertilização, os embriões foram distribuídos em placas de 24 poços, com 4 embriões por poço mergulhados em 1 mL de solução de SPION-DX, onde foram expostos durante 5 dias. Os controles do tratamento são mantidos nas condições, porém em água do sistema pura sem SPION-DX.



Figura. 4.3. Placa de poços usada no tratamento. As cores laranja e bordô das soluções de SPION-DX correspondem a, respectivamente, 2 e 8 mM de Fe.

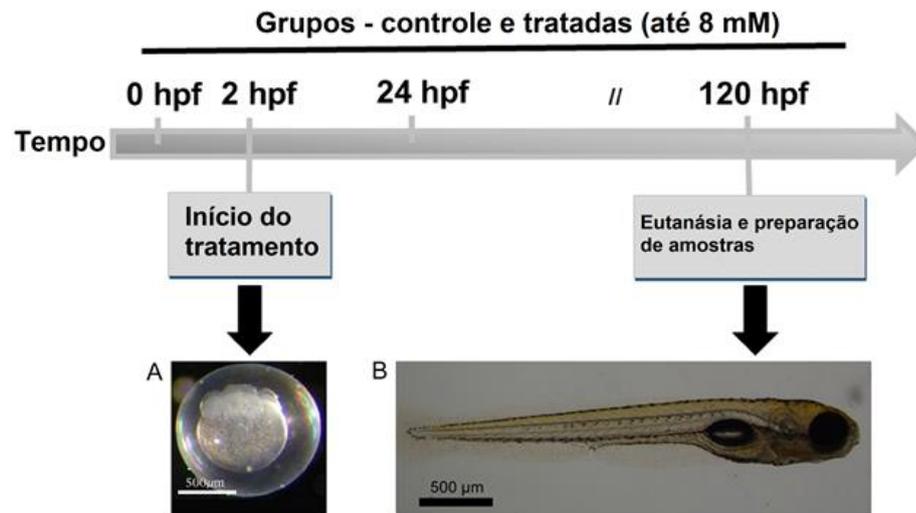


Figura. 4.4. visão geral do protocolo de tratamento das larvas. As exposições iniciam-se 2 horas após a fertilização, quando o animal se encontra em estágio embrionário, e são encerradas no quinto dia (5 dpf ou 120 hpf), quando é feita crio-eutanásia e as preparações de amostra são iniciadas.

As soluções de SPION-DX foram diluídas em concentrações de 0,125 a 8 mM de ferro com a água do sistema. O conteúdo dos poços foi substituído diariamente ao longo do tratamento, para impedir que o acúmulo de toxinas e resíduos liberados pelas larvas aumente a taxa de mortalidade. O protocolo foi iniciado imediatamente após a lavagem e transferência dos embriões aos poços. As larvas foram mantidas com SPION-DX até o quinto dia pós-fertilização (5 dpf), período no qual elas se desenvolvem do estágio embrionário ao larval. Nessa idade, a maioria dos órgãos internos como rins, intestino e fígado estão completamente desenvolvidos. Terminado o tratamento de exposição, as larvas foram eutanasiadas por crio-eutanásia. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de ética para uso de animais (CEUA-PUCRS, número de licença 7127), e estão de acordo com a legislação brasileira (COBEA, N ° 11.794/08) e instruções do Conselho canadense de cuidados

com animais (CCAC). Um resumo do delineamento experimental é apresentado na figura 4.4.

4.4. Preparação de amostras de peixe zebra

Métodos de imageamento *in vivo*, como microscopias ótica e eletrônica (varredura ou transmissão), visam primariamente à identificação adequada de estruturas como órgãos e organelas, e, para esse fim, deve-se assegurar que o protocolo de preparação de amostras mantenha a conformação e a localização das estruturas internas e externas fiéis às características morfológicas do animal em vida, para que dados adquiridos a partir de uma amostra sejam boas aproximações às condições reais de um organismo funcional. Além disso, a amostra deve ser preservada de forma que não se degrade por processos de autólise (autodestruição do tecido por enzimas e toxinas liberadas após a eutanásia do animal) e putrefação provocada por micro-organismos. Dentre outros exemplos, a fixação química é um procedimento de preservação de amostras amplamente utilizado em materiais biológicos, que, além de proteger o tecido contra degradação bioquímica e com isso aumentar a longevidade da amostra, confere-lhe maior resistência estrutural, conveniente para procedimentos de corte histológico. No contexto de peixes-zebra, Copper e colaboradores realizaram um comparativo de diversos protocolos de fixação desses animais em estágio larval (6 dpf), no qual a qualidade do protocolo foi classificada de acordo com parâmetros de preservação de integridade estrutural, como a presença ou a ausência de defeitos por rompimento após realização de cortes por microtomia⁸². Constatou-se que a fixação em formalina tamponada 4% (NBF 4) por 24 h foi o método mais adequado para preparação de cortes, garantindo resultados ótimos referentes à preservação do tecido e à manutenção das características morfológicas originais do animal.

Imediatamente após a eutanásia, as larvas foram transferidas em pipetas pasteur para lavagem em placas petri contendo água Milli-Q®, para remoção de elementos contaminantes na superfície dos animais. A lavagem foi realizada três

vezes, através de agitação manual das larvas no meio. A análise por micro-PIXE foi realizada em amostras preparadas através de dois protocolos de preparação: cortes de espessura micrométrica (aqui denominadas de protocolo A), e larvas inteiras desidratadas (protocolo B). Ambos os protocolos foram desenvolvidos de modo a se obter mapas elementares bidimensionais de larvas em orientação sagital, conforme Figura 4.5.

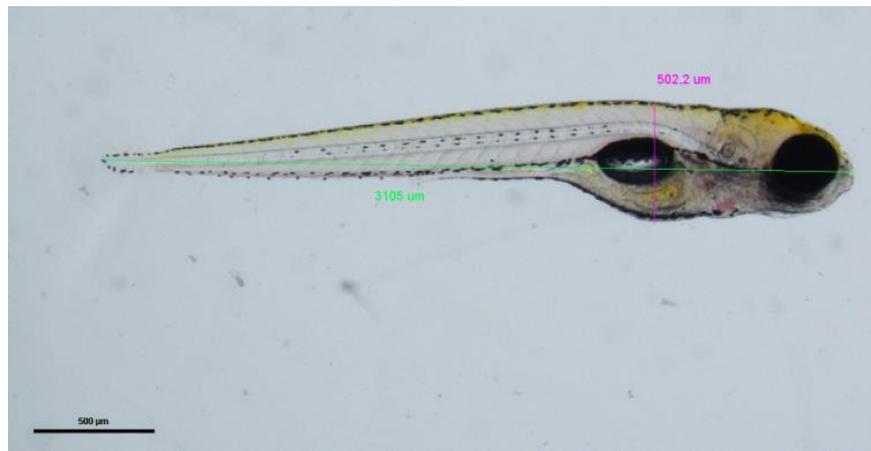


Figura. 4.5. vista sagital de uma larva. Esta foi a direção ao longo da qual os cortes foram realizados.

4.4.1. Protocolo A – obtenção de cortes micrométricos sagitais através de ultramicrotomia para análise por micro-PIXE

Após lavagem, as larvas foram mantidas durante 24h em uma solução de formalina tamponada (NBF 10) à temperatura ambiente. Na sequência, o fixador foi removido e as larvas foram embebidas em solução crioprotetora (EasyPath®, Killik), e o conjunto foi congelado em nitrogênio líquido e mantido à temperatura de -20 °C. O crioprotetor impede a formação de cristais de gelo na superfície da amostra, que provocam rupturas em tecidos da amostra e comprometem sua integridade estrutural. Em temperatura de criogenia, essa substância solidifica-se com consistência comparável a resinas como a parafina, de corte facilmente exequível. Os cortes de peixes-zebra foram realizados em um ultramicrotomo em criostato (Leica Biosystems ®), presente no Laboratório de Histologia da PUCRS. As larvas foram seccionadas

em cortes de 60 μm e depositadas sobre substrato polimérico (Mylar ®, 100 μm). Finalmente, os cortes sobre os substratos foram mantidos em dessecadora a vácuo, à temperatura ambiente, até serem irradiadas na análise por micro-PIXE.

4.4.2. Protocolo B – amostras de larvas inteiras para análise por micro-PIXE

O mapeamento das larvas por micro-PIXE permite visualizar se o sinal do ferro na superfície do animal é de fato mais intenso, o que apontaria a epiderme como importante meio de incorporação das SPIONs no estágio de desenvolvimento no qual se encontravam. A criosecção de 60 μm conserva uma porção muito pequena desse tecido, dificultando a avaliação do sinal de ferro na epiderme. Uma maneira simples de verificar a concentração e a distribuição do ferro na superfície das larvas é via análise de corpo inteiro, sem realização de procedimentos de corte. A contribuição de informação proveniente de estruturas mais internas pode ser desprezada devido ao pequeno perfil de profundidade da análise (~100 μm).

Após lavagem, as larvas foram mantidas *overnight* em solução de etanol 70 a 4 °C. Sequencialmente, o etanol foi removido, as larvas foram depositadas em substrato de carbono e mantidas em dessecadora a vácuo, à temperatura ambiente, até o dia da análise.

4.4.3. Protocolo de preparação de amostras para ICP-MS

Medidas mais recentes foram realizadas em amostras de peixes-zebra expostas a soluções em concentrações de 0,125, 0,5, 2,0, 4,0 e 8,0 mM. O procedimento é semelhante ao descrito na seção 4.2.4, sendo usadas as mesmas faixas de concentração de padrão interno de escândio e mesma proporção de solução para digestão ácida à temperatura ambiente (300 μL de HNO_3 e 200 μL de H_2O_2).

Após eutanásia, as larvas destinadas à análise por ICP-MS foram separadas em eppendorfs de 2 mL, mantidas em 50 μL da água de lavagem (Milli-Q)

e conservadas a -20°C até o dia da preparação da amostra, que ocorre imediatamente antes da análise no equipamento. As amostras de cada dose correspondiam a 16 larvas (que passaram por digestão ácida) em *pools* de 2 mL. As concentrações de ferro exibidas na seção 5.2 são referentes ao *pool* inteiro.

4.5. Procedimentos de caracterização dos peixes-zebra

4.5.1. Caracterização por micro-PIXE

As amostras foram irradiadas na linha de micro-feixe do acelerador Tandem 3 MV, localizado no Laboratório de implantação iônica da UFRGS. O feixe de prótons possuiu área aproximada de $6,25\ \mu\text{m}^2$, energia de 3 MeV, e 70 pA de corrente média. A varredura cobriu uma área de $2\ \text{mm}^2$, suficiente para enquadrar todas as regiões de maior interesse da larva (cabeça e abdômen). As medidas foram realizadas em animais controles e expostos a SPION-DX em doses de 2 e 8 mM de Fe. Analisaram-se amostras de 3 animais diferentes por concentração, preparados pelo Protocolo A, e 2 animais por concentração preparados pelo Protocolo B. Os raios-X característicos gerados na amostra foram detectados por um detector do tipo *silicon drift* (Sirius-SD®), posicionado a 135° em relação à direção do feixe, com resolução em energia de 140,5 eV para o pico correspondente a 5,9 keV.

Mapas elementares adquiridos foram gerados automaticamente no software OMDAQ 2007® durante a irradiação, sem necessidade de pós-processamento (apesar de ser possível gerar mapas em diferentes intervalos de canais). Simultaneamente aos mapas 2D, no mesmo software, foram gerados espectros de contagem de raios X característicos em função do canal do detector. Esses espectros foram analisados no GUPIXWIN®, no qual são aplicadas correções devidas à interação dos raios-X com a matriz da amostra, e os elementos de interesse são quantificados.

4.5.1.1. *Quantificação elementar através do GUPIXWIN®*

Os espectros adquiridos são processados no software GUPIXWIN®, desenvolvido na Universidade de Guelph, Canadá ⁸³⁸⁴. Através de aproximação não-linear de mínimos quadrados, o programa realiza o cálculo da área dos picos dos espectros e a quantificação elementar da amostra irradiada. Na base de dados do programa, constam parâmetros de interação do feixe com a matéria como seções de choque de produção de raios-X, poder de freamento, peso atômico dos elementos e fatores de atenuação de diferentes materiais, que são utilizados para correção de efeitos como emissão secundária e autoabsorção de fótons pela amostra. Para o processamento do espectro e quantificação elementar, o usuário deve fornecer as seguintes informações para o programa: energia e tipo de íon utilizado na irradiação; energia de saída do feixe da amostra; carga integrada sob a amostra (considerada como o número de íons que a atingem); geometria do sistema, isto é, o ângulo entre a reta normal da amostra e a normal do detector; dados relacionados a matriz da amostra, como composição elementar, espessura e estrutura da amostra (homogênea, sedimentada etc). Informações relacionadas ao tipo de detector e padronização do sistema de micro-PIXE são fornecidas através de arquivos de formato .dat copiados na pasta do programa. Para padronização do sistema micro-PIXE, irradiaram-se padrões de SiO, Mn, CuSx e GaP (Micrometer ®)

4.5.2. Análise de peixes-zebra por micro-PIXE

Um peixe-zebra com 5 dpf possui em torno de 550 µm entre os dois olhos (espessura máxima), e aproximadamente 300 µm entre as barbatanas, conforme figura 4.6.

*

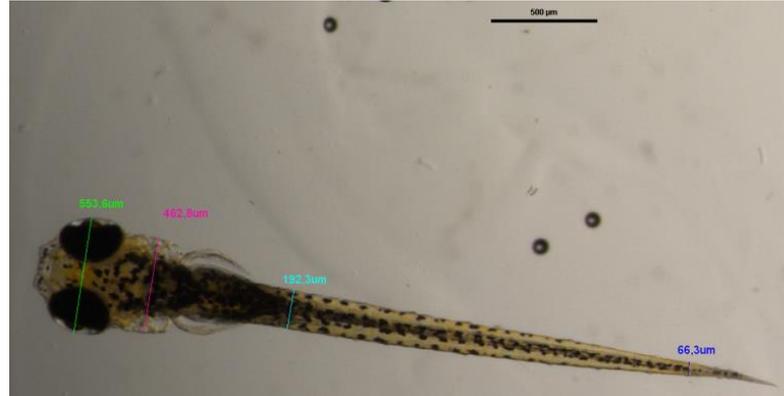


Figura 4.6. espessura de uma larva de peixe-zebra em 5 dpf.

O alcance médio de $\sim 100 \mu\text{m}$ do feixe primário de 3 MeV de energia na amostra foi calculado no software SRIM 2003®, considerando um plástico simulador de tecidos (Tissue-equivalent plastic A-150, NIST). Portanto, a varredura realizada no peixe-zebra em orientação sagital (larva deitada sobre o substrato) fornece informações superficiais da amostra, majoritariamente do tecido epitelial, sendo necessário um procedimento de corte para análise de estruturas mais internas. Em relação ao perfil real de profundidade (onde a informação é gerada no material), o raio-X característico do ferro gerado dentro da amostra possui energia de 6,38 keV, e o coeficiente de atenuação mássico do A-150 referente a essa energia é de aproximadamente 15 g/cm^2 . Através disso, é possível estimar que aproximadamente 84% dos raios-X gerados a uma profundidade de $100 \mu\text{m}$ (alcance médio do próton na amostra) são transmitidos através da amostra.

As correções utilizadas no GUPIXWIN® para quantificação elementar dos cortes de peixes-zebra foram de energia de saída do feixe de 2,06 MeV, amostra homogênea de espessura intermediária (*intermediate width sample approximation*), e matriz elementar na proporção de 75% de carbono, 15% de oxigênio e 15% de nitrogênio. Essa matriz corresponde a amostras de atum enlatado, obtidas por retroespalhamento Rutherford (RBS)³². Não há contribuição do hidrogênio para os fenômenos de emissão secundária e autoabsorção de fótons na amostra. Portanto, ainda que seja um elemento fundamental na composição de tecidos biológicos,

desconsiderá-lo nos cálculos de correção de matriz não influencia nas concentrações absolutas de ferro calculadas pelo GUPIXWIN. A mesma matriz foi utilizada para quantificação de amostras preparadas pelo Protocolo B (larvas inteiras desidratadas), mas através da aproximação de espessura grossa (*thick sample approximation*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Publicação da pesquisa em periódico

Nesta seção está anexado o artigo publicado no periódico *Nuclear Instruments and Materials Section B*, cujo título e autoria são:

“Use of micro-PIXE for elemental characterization and iron uptake evaluation in zebrafish larvae exposed to iron oxide nanoparticles”

M. R. Caloni^{a*}, E. M. N. Oliveira^{a,b}, D. de V. Bauer^c, M. R. Vianna^b, J. F. Dias^c, R. M. Papaléo^a

^aInterdisciplinary Center of Nanoscience and Micro-Nanotechnology, ^bLaboratory of Developmental Biology of the Nervous System, School of Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, Brazil

^cIon Implantation Laboratory, Institute of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, Brazil

<https://doi.org/10.1016/j.nimb.2019.09.035>.

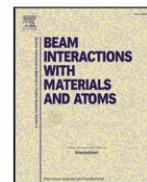
Esses dados são referentes à investigação de amostras de larvas cortadas (3 controles, 3 expostas a 2,0 mM e 3 expostas a 8,0 mM), e de corpo inteiro (2 controles, 2 expostas a 2,0 mM e 2 expostas a 8,0 mM). Além da publicação, esse trabalho foi apresentado pelo autor principal na *16th International Conference on Particle Induced X-ray Emission (PIXE2019)*, em Caldas da Rainha, Portugal (26 a 29 de março de 2019).

No item 5.2, serão apresentados resultados complementares, realizados posteriormente aos dados a serem apresentados no item 5.1.



Contents lists available at ScienceDirect

Nuclear Inst. and Methods in Physics Research B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nimb

Use of micro-PIXE for elemental characterization and iron uptake evaluation in zebrafish larvae exposed to iron oxide nanoparticles

M.R. Caloni^{a,*}, E.M.N. Oliveira^{a,b}, D. de V. Bauer^c, M.R. Vianna^b, J.F. Dias^c, R.M. Papaléo^a

^a Interdisciplinary Center of Nanoscience and Micro-Nanotechnology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, Brazil

^b Laboratory of Developmental Biology of the Nervous System, School of Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, Brazil

^c Ion Implantation Laboratory, Institute of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

PIXE
Nanotoxicology
Zebrafish
Iron oxide nanoparticles

ABSTRACT

We report on the evaluation of iron content and biodistribution in zebrafish larvae (*Danio rerio*) exposed to dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION-DX) using the micro-PIXE technique. We compare results of elemental 2D maps and Fe quantification obtained from two different sample preparation procedures: one using sagittal slices prepared by cryo-sectioning and another using entire dehydrated larvae. Independently of the preparation method used, the Fe content in the tissues of exposed animals is significantly higher than in the controls, but the increase is not proportional to the exposure level. In addition, 2D elemental maps show a somewhat homogeneous Fe distribution in the larvae, with some samples showing a slight enhancement in Fe content near the gut. From the PIXE data a curve correlating the exposure (nanoparticle concentration in the fish water) to the iron content in the body was obtained, which shows a saturation trend towards high exposure doses.

1. Introduction

Magnetic nanoparticles have been increasingly used in biological contexts due to their unique physicochemical properties, which allow a wide range of *in vivo* therapeutic and diagnostic applications [1,2]. Among the different magnetic nanoparticles, superparamagnetic iron oxides (SPIONs) are one of the most prevalent in biomedical applications [3,4]. For example, they are very useful contrast agents for medical imaging [5,6], and may act as heating centers in magneto hyperthermia of tumors [7,8]. SPIONs consist of a magnetite or maghemite core with the surface modified by a stabilizing coating layer (usually biocompatible polymers), which may be further modified to add different functionalities to the system [9]. In spite of the biodegradability in the body of iron oxide nanoparticles and the relatively low levels of toxicity usually reported [10,11], there are still concerns related to their safe use in humans [12,13].

Zebrafish (*Danio rerio*) has often been used as a model organism for *in vivo* toxicological studies of nanomaterials [14–21]. There are several advantages of the model. Zebrafish rapidly incorporate chemical substances from the aqueous medium into tissues and the central nervous system. They have a large fecundity and rapid external development, which enable high throughput analysis. In addition, conserved

developmental mechanisms and the significant genomic similarity make experimental data, in principle, translational to humans [22,23]. One key element in toxicological studies is the actual accumulation in the tissues of the active compound, following exposure to a given amount in water. This is often an unknown parameter, and most investigations only take into consideration the amount of a given substance introduced in the water system to parameterize the toxicological effects.

In this work, we show preliminary results on the application of the micro-PIXE technique to investigate the effective iron incorporation into zebrafish larvae after exposure to iron oxide nanoparticles at concentrations up to 8 mM of Fe in water. The elemental distributions (2D maps) and Fe quantification obtained from different sample preparation procedures is compared and used to derive a curve correlating the exposure (nanoparticle concentration in the fish water) to the iron content in the body.

2. Materials and methods

2.1. Nanoparticle synthesis and characterization

Iron oxide nanoparticles were prepared by the coprecipitation

* Corresponding author.

E-mail address: matheus.caloni@acad.pucrs.br (M.R. Caloni).

<https://doi.org/10.1016/j.nimb.2019.09.035>

Received 7 May 2019; Received in revised form 19 September 2019; Accepted 23 September 2019
0168-583X/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

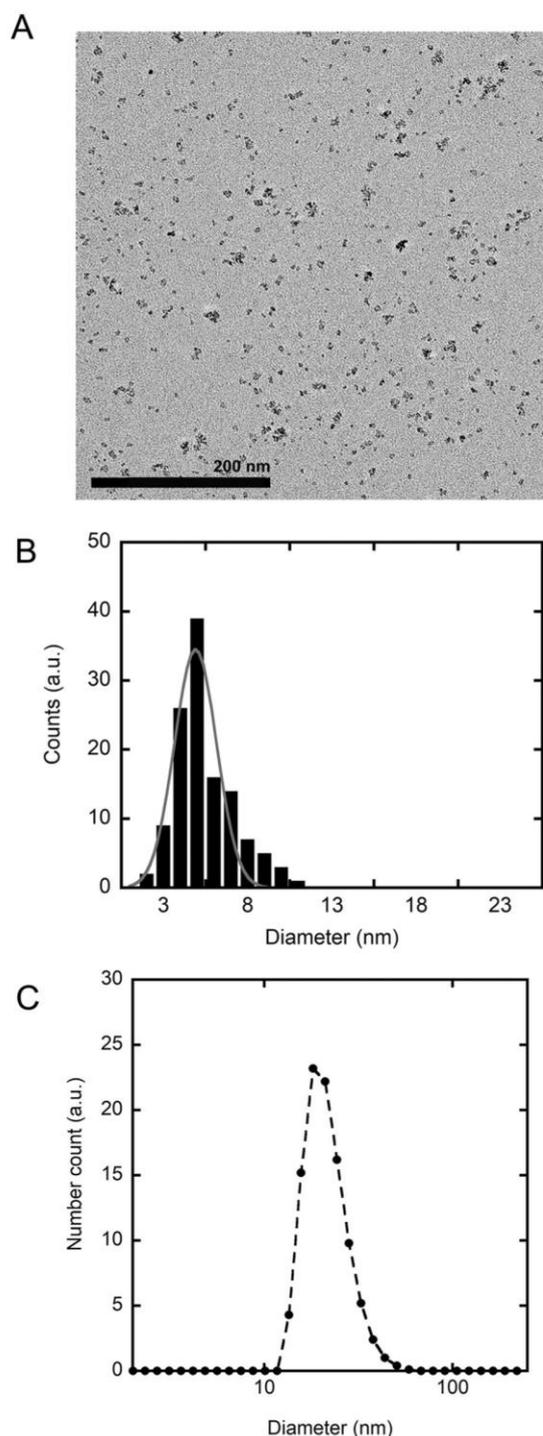


Fig. 1. Physical characteristics of the iron oxide nanoparticles. TEM micrograph of SPION-DX deposited on a formvar-coated Cu grid is shown in (A) and the corresponding size distribution in (B). The distribution of the nanoparticles hydrodynamic diameters in aqueous media (pH = 8.0) measured by light scattering is given in (C).

method in the presence of dextran (T10 - Pharmacosmos) as described in Ref. [24]. The remaining free dextran was removed from the nanoparticle dispersion by centrifugation at 3600 rpm for 30 min in Amicon tubes (cut off at 50 kDa – Millipore). Next, the dextran coating was crosslinked using 35 mL of 5 M sodium hydroxide (Merck) and 14 mL of

epichlorohydrin (Sigma-Aldrich), added to the nanoparticles solution and stirred overnight (approximately 14 h). In the final step, the dextran layer was aminated by reacting the compound with 60 mL of 28% ammonium hydroxide (Merck) under stirring for 24 h. Two additional purification steps were employed at the end of the synthesis: one to remove the excess of ammonium hydroxide by dialysis (MWCO 12–14 kDa – Millipore) and a final purification by centrifugation in Amicon tubes (MWCO 50 kDa – Millipore).

The morphology and size distribution of the nanoparticles were analyzed by transmission electron microscopy (TEM, JEM-2010 200 kV, JEOL) and by dynamic light scattering in a Zetasizer (Malvern). Before collecting the samples for microscopy (or for the exposure assays), the stock solution was sonicated at 40 kHz for 10 min and vortexed. Samples were then prepared by dripping a diluted solution of the nanoparticles on a TEM grid.

The resulting nanoparticles are of the *CLIO-NH₂* family (aminated crosslinked iron oxide nanoparticles) [25], with an iron oxide core of about 6 nm (as measured by TEM) and hydrodynamic radius in aqueous solutions of ~11 nm (see Fig. 1).

2.2. Zebrafish handling and exposure assay

Adult wild-type zebrafish animals (*Danio rerio*) of AB strain were maintained in an automated recirculating system (Tecniplast, Italy) under standard conditions for this species in the aqueous system (28 ± 2 °C, conductivity of 500–800 μ S, pH = 7.5 ± 0.5 equilibrated with Instant Ocean® salt, and photoperiod of 14:10 light/dark). Embryos were obtained by crossing females and males at a 1:2 proportion and viable embryos were selected 1-hour post-fertilization under a stereomicroscope [26].

The animals were exposed for a period of five days in a solution of SPION-DX, with iron concentrations of 2.0 and 8.0 mM, as measured by UV spectroscopy and ICP-MS. Fig. 2 provides a timeline of the exposure protocol. Embryos were kept in 24-well cell culture dishes with 4 embryos per well in a BOD incubator with controlled temperature and humidity. The water in which animals were kept (including the nanoparticles) was changed daily until the end of the experiment. The iron concentration of the replaced volumes from each exposure day was quantified by ICP-MS, and no significant variation was observed among samples. All experiments and handling procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA-PUCRS, number 7127), following the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) [27] for use of fish in research, and of the Brazilian legislation (No. 11.794/08).

2.3. Sample preparation for micro-PIXE analysis

Samples for micro-PIXE analysis were prepared using either sliced or whole-body larvae. Sliced samples were produced by cryo-sectioning at a sagittal orientation. Compared to standard histological protocols such as paraffin-embedding, cryo-sectioning does not require a series of chemical dehydration and washings with strong solvents that could introduce contaminants to the sample, and requires the least number of steps for sample preparation. Following cryo-euthanasia, the larvae were fixed in NBF 10 for 24 h, at room temperature, which was evaluated as the optimal fixation protocol for zebrafish larvae [28]. After fixation, the larvae were rinsed three times in deionized water and cut in a cryostat microtome (Leica Biosystems®). 60 μ m sections were laid onto Mylar® substrates and dehydrated in an evacuated desiccator at room temperature. To prepare whole-body samples, animals were also sacrificed using cryo-euthanasia, and subsequently the larvae were dehydrated overnight in ethanol 70% at room temperature. After that, the whole bodies were laid onto a carbon substrate.

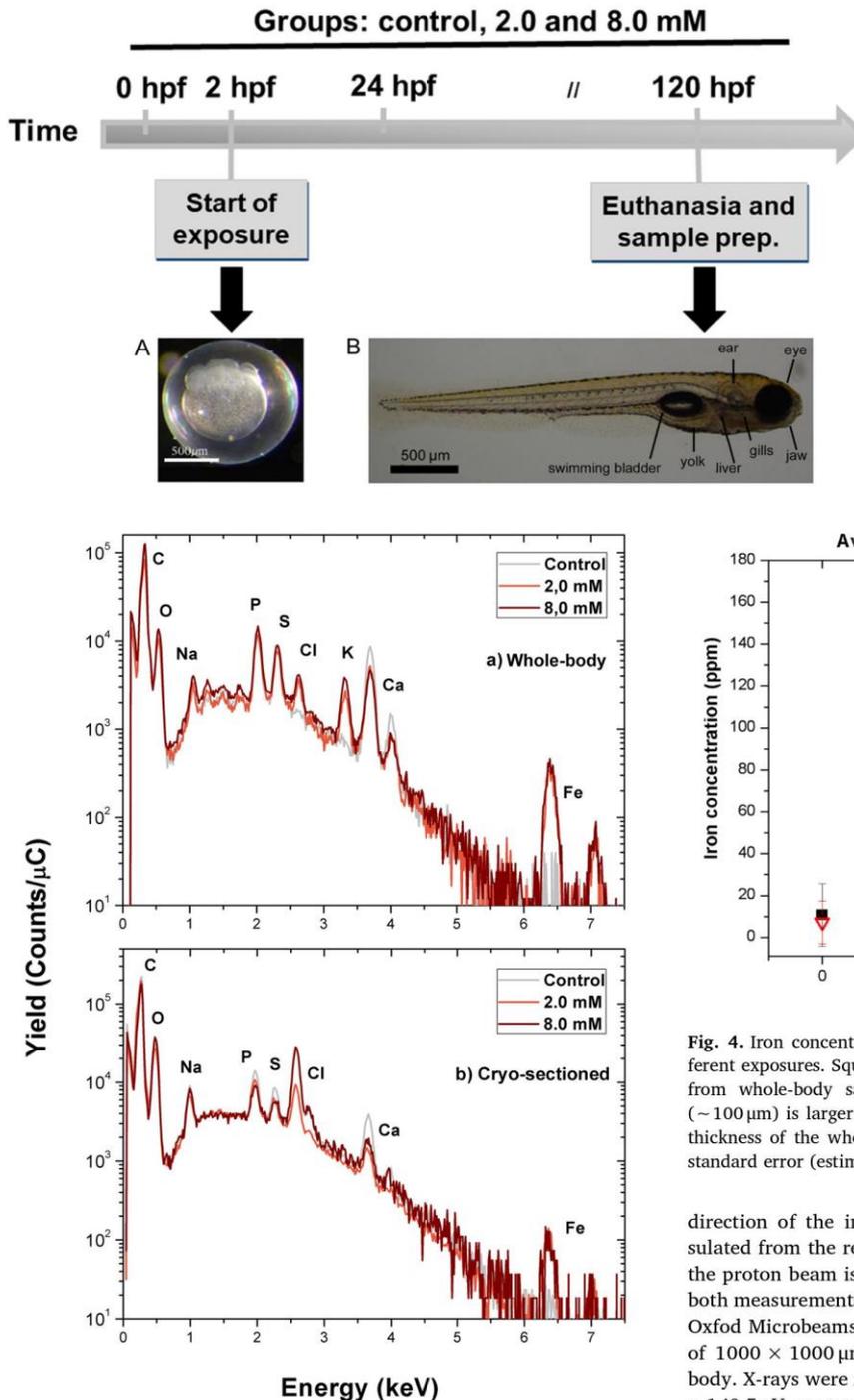


Fig. 3. Averaged PIXE spectra of zebrafish larvae exposed to 2.0 and 8.0 mM of SPION-DX for 5 days and prepared as (a) whole-body or (b) 60- μm -thick cryo-sections. Spectra from control samples were also added in the figure.

2.4. micro-PIXE measurements and data analysis

Micro-beam Particle Induced X-ray Emission (micro-PIXE) analysis was carried out at the 3-MV Tandem accelerator of the Ion Implantation Laboratory (Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil) using a 3 MeV proton beam with an average spot size of 6.25 μm^2 and mean current of 70 pA. The charge was collected on the target holder which is calibrated against a Faraday cup positioned behind the target in the

Fig. 2. Timeline of the exposure protocol. Zebrafish embryos were exposed to nanoparticle dispersions containing 2.0 and 8.0 mM of Fe at 2 h post-fertilization. Each day the medium containing the nanoparticles was changed by a fresh aliquot of nanoparticle solution. The exposure ended 5 days post-fertilization, when the animals were euthanised and fixed for micro-PIXE analysis.

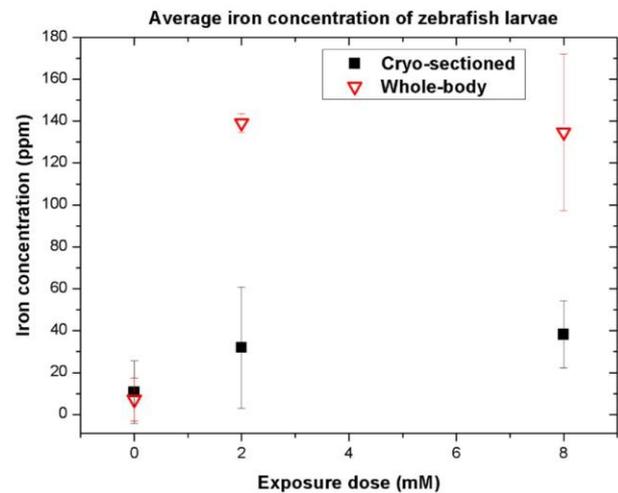


Fig. 4. Iron concentration in zebrafish larvae treated with SPION-DX at different exposures. Squares are data obtained from cryo-sectioned and triangles from whole-body samples. The interrogation depth of the proton beam ($\sim 100 \mu\text{m}$) is larger than the slice thickness ($\sim 60 \mu\text{m}$), but smaller than the thickness of the whole-body sample. The data is shown as the mean \pm the standard error (estimated by GUPIXWIN[®]).

direction of the incident beam. The target holder is electrically insulated from the rest of the reaction chamber. For thin samples where the proton beam is transmitted through, the total charge is the sum of both measurements. Micro-PIXE experiments were performed using the Oxford Microbeams[®] system, operating in the triplet mode. A scan size of 1000 \times 1000 μm^2 was employed, which fitted the entire larvae's body. X-rays were recorded by a Sirius SDD (silicon drift detector) with a 140.5 eV energy resolution at 5.9 keV. This detector was placed at 135 $^\circ$ with respect to the beam direction. Since this detector has a thin polymer window for the detection of light elements like carbon and oxygen, the detector was placed relatively far from the sample, which prevents most backscattered protons from reaching the silicon crystal due to the small detection solid angle. In this geometry, the number of backscattered particles reaching the detector is negligible. However, the count rates are quite low, demanding long data acquisition times.

Measurements of iron content were performed in controls and animals exposed to 2 and 8 mM of SPIONs, keeping the same acquisition time and scanning area size. In the case of cryo-sectioned samples, 3 different animals per concentration were analyzed (including the controls). For the whole-body samples, 2 larvae per concentration were

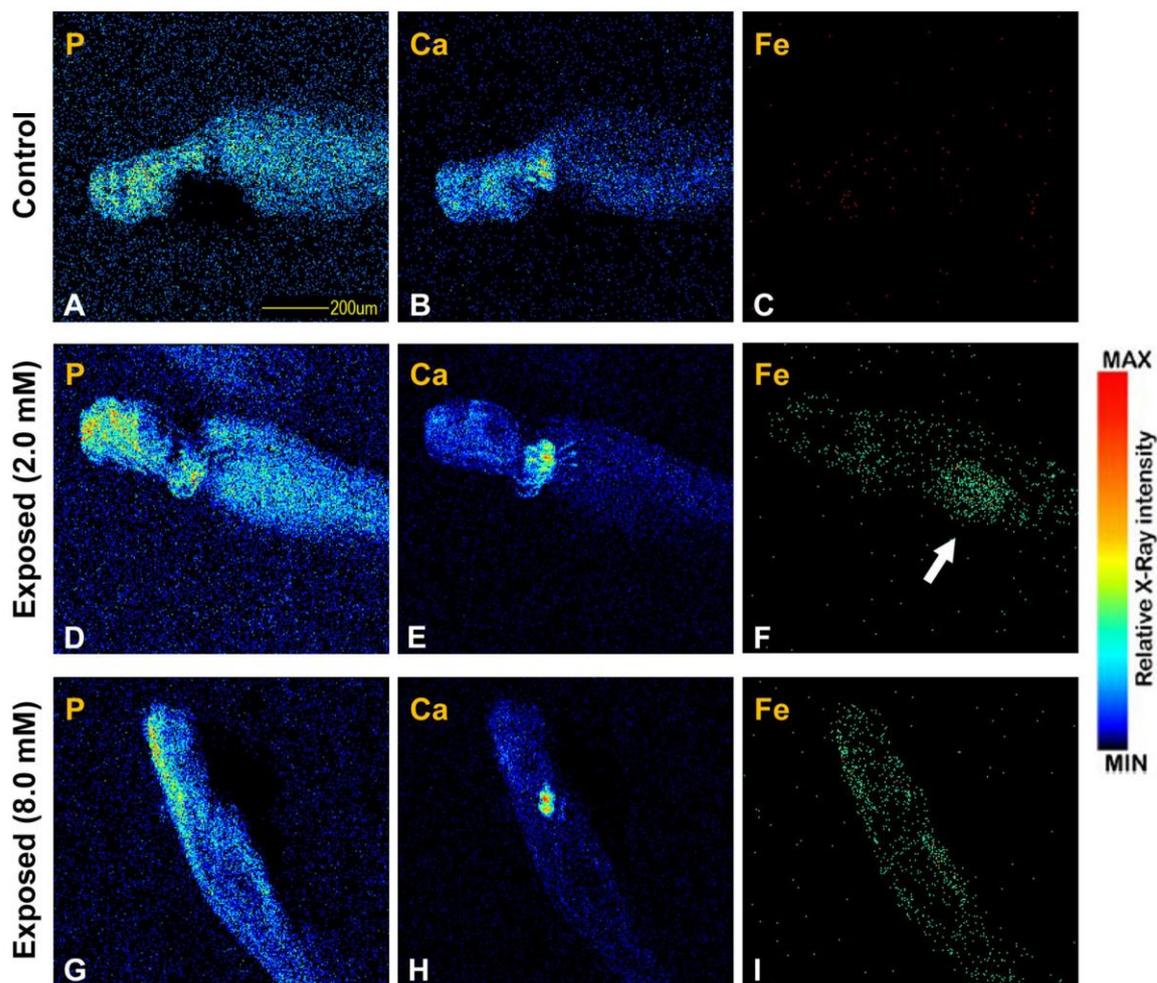


Fig. 5. Micro-PIXE elemental maps of phosphorus, calcium and iron obtained from dehydrated whole-body larvae: (A–C) control samples; (D–F) larvae exposed to 2.0 mM of SPION-DX for 5 days; and (G–I) larvae exposed to 8.0 mM of SPION-DX for five days. The color scale used in this figure is the same for all maps. Fig. 2 provides anatomical information for the zebrafish from a sagittal view.

analyzed.

X-ray spectra were analyzed by the GUPIXWIN software developed in the University of Guelph (Canada) [29] in two different approaches. Spectra from sectioned larvae were processed in an intermediate width sample approximation, using a beam exit energy of 2.06 MeV, and matrix correction of 0.75 C, 0.15 O and 0.15 N, extracted from a RBS analysis of canned tuna fish [30]. We note that although the hydrogen content is not explicitly included in the matrix, H does not contribute neither to photon self-absorption nor to secondary fluorescence in the target. Thus, neglecting hydrogen in the matrix corrections has no effect in the absolute concentrations of iron calculated by GUPIXWIN. The same matrix correction was performed for whole-body larvae but applying the thick sample approximation. In this case, 3 MeV protons penetrate about 100 μm in the soft tissue. For 6.4 keV X-rays from Fe, it is estimated that about 16% of the X-rays emitted from a depth of 100 μm will be absorbed by the tissue. However, it is important to stress that effects like secondary fluorescence and X-ray absorption in the target are fully accounted for by the GUPIXWIN software. Finally, the standardization of the micro-PIXE system was carried out with X-ray standards from Micromatter® (SiO, Mn, CuSx and GaP).

3. Results and discussion

The main elements present in the untreated zebrafish larvae as seen

by PIXE are C, O, P, S, Ca, and Na. This is presented in Fig. 3 where averaged micro-PIXE spectra obtained from both control and exposed animals are shown. Although the spectra obtained from control samples prepared by cryo-sectioning or by dehydration are similar, slight variations in elemental composition were observed depending on the sample preparation procedure. For example, whole-body control samples did not exhibit a chlorine peak (which is very clear on the cryo-sectioned samples), but the calcium signal, on the other hand, was more intense than in cryo-sectioned samples. In addition, a few weak peaks appeared in the spectral region between 1 and 2 keV (associated to trace amounts of Mg, Al, and Si), which are not seen in cryo-sections.

It is well known that sample preparation is critical for the chemical integrity of biological samples. For example, formalin fixation of biological tissues can alter the elemental composition balance, especially of water-soluble ions such as P, S, Cl, and K [31]. Indeed, changes on the permeability of cell membrane may facilitate the leaching of elements [32]. In our case, an overall reduction of such peaks is observed in cryo-sectioned samples (which involves the use of formalin), consistent with the aforementioned observations. Also, Turnau et al [33] reported dislocation and major removal of K in chemically fixed *mycorrhiza* samples, when compared to freeze-dried specimens. This effect seems to be present also in the zebrafish larvae as potassium, an important trace element that actively participates in ionic homeostasis processes in zebrafish [34], was not observed in any of the controls. A

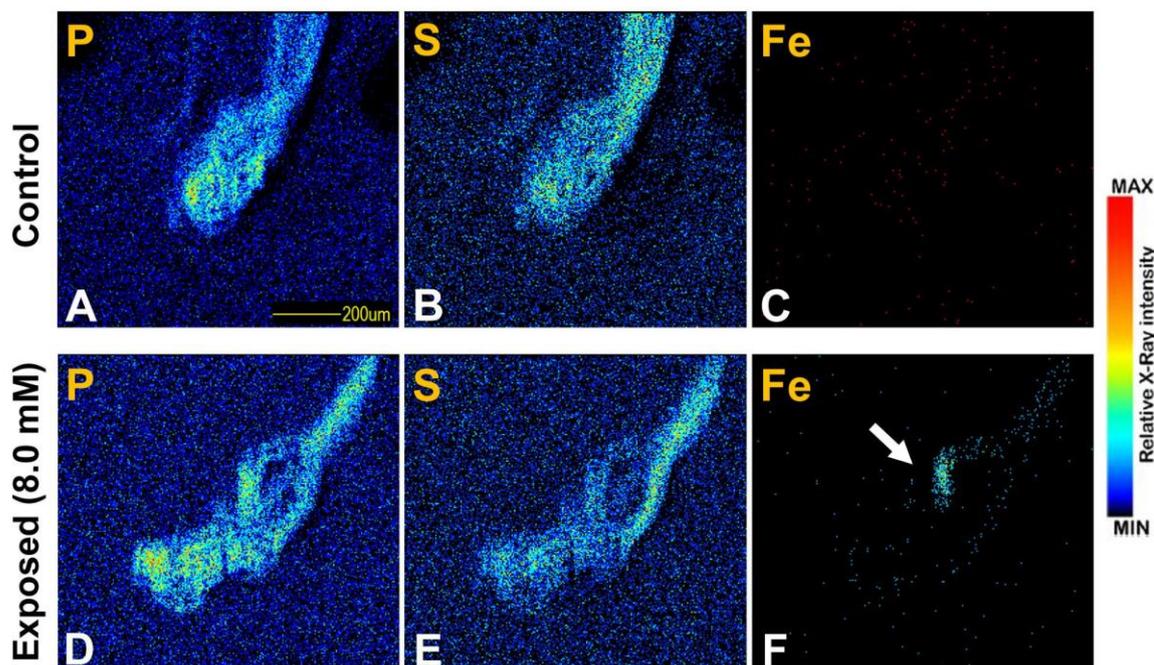


Fig. 6. Micro-PIXE elemental maps of phosphorus, sulfur, and iron present in zebrafish sagittal slices of (A–C) control samples and (D–F) samples exposed to 8.0 mM of SPION-DX.

more detailed investigation on the optimum sample preparation procedure for zebrafish larvae is currently being evaluated in our laboratory and will be reported elsewhere.

The endogenous iron signal of control animals is very weak and close to the background in the micro-PIXE spectra (Fig. 3). Quantification of the absolute iron content in the samples indicates that less than 10 ppm of iron is present in the untreated larvae for both sample preparation procedures (Fig. 4). On the other hand, the iron signal is clearly detectable in the spectra of larvae exposed to the nanoparticles (Fig. 3). Thus, exposure to both concentrations of SPION-DX causes iron accumulation in the body and are detectable for both sample preparation procedures. The iron concentration of treated larvae reaches up to ~140 ppm in the whole-body samples, and only ~40 ppm in the slices. Interestingly, there is no important difference of iron uptake between larvae exposed to 2.0 and 8.0 mM of Fe, despite the fourfold increase in the exposure dose between the two cases (Fig. 4). For example, in whole-body samples, 139 ppm of iron was detected in a larva treated with 2.0 mM of Fe and 135 ppm in the 8.0 mM case exposure. In cryo-sectioned samples, the iron content of larvae exposed to a dose of 8.0 mM is slightly higher (40 ppm) compared to the ones exposed to 2.0 mM (30 ppm), although the variability lies within the uncertainty of the measurements. In any of the cases, a higher exposure dose does not cause an increase in the iron concentration of the larvae in the same proportion, suggesting a saturation of the physiological mechanisms of iron uptake at exposure levels beyond 2.0 mM. It is important to note that the substrates used in both sample preparations do not contribute significantly to the iron signal.

The differences observed in the total iron content seen in whole-body versus cryo-sectioned samples seem to arise from the contribution of the superficial layers, which are absent in the cryo-sectioned samples (apart from the slice edges). Since the larvae developed in water with suspended nanoparticles, the absorption of SPION-DX occurs necessarily through the epidermis and the gills. The mouth at such early stages is still undeveloped, and possibly do not work as a relevant pathway into the organism. Thus, although the interrogation depth of the proton beam is close to ~100 μm, the passive absorption through the surface of the animal may have a strong contribution to the signal in the case of

the whole-body samples.

In the 2D elemental maps of whole-body samples (Fig. 5), iron is present in the entire extension of the larvae. However, in the case of cryo-section maps (Fig. 6), iron is distributed mostly around the gut region and to a smaller extent at the borders of the slice. This observation also supports nanoparticle uptake through the epidermis of the larva as an important pathway of Fe accumulation. Although the gills could be another mean to internalize nanoparticles, no important enhancement of the signal in this region was observed in any iron map. A slight enhancement of Fe accumulation was seen in the gut region of an animal exposed to 2.0 mM of Fe (Fig. 5f). Preferential Fe accumulation in the gut region was also detected in cryo-sections of exposed larvae (Fig. 6). This region contains structures such as the liver, swimming bladder and yolk sac. In humans, SPIONs are mainly absorbed by the reticuloendothelial system and the liver is considered as the main organ of accumulation [35], which may also be the case for zebrafish larvae.

Figs. 5 and 6 also show the spatial distribution of endogenous elements such as P, S, and Ca. Most of the endogenous elements are homogeneously distributed throughout the larvae, as seen in the P and S maps. However, calcium maps of whole-body specimens (exposed or controls) exhibit an enhancement near the head (Figs. 5b, e, and h). The source of such signal is yet unclear.

4. Conclusion

Micro-PIXE was applied to investigate uptake and biodistribution of Fe in developing zebrafish exposed to iron oxide nanoparticles dispersed in the aqueous system. Although some variations were seen in the spectra (and thus in the elemental composition) obtained from cryo-sectioned or whole-body samples, the data from the two methods of sample preparation were consistent, with an overall reduction in signal intensity observed in the cryo-sectioned samples. The Fe concentration in the tissues of exposed animals is higher when compared to those from control animals, but with an indication of uptake saturation at exposures close to 2 mM of Fe. Elemental maps of whole-body samples show that Fe is distributed throughout the entire larvae's superficial

layers, demonstrating that the exposures provoke retention of SPION-DX in the epidermal tissue. A slight enhancement in the gut region of a cryo-sectioned sample may be related to preferential accumulation sites of SPION-DX in internal structures such as liver and yolk sac.

Here we show preliminary data on elemental maps of zebrafish larvae exposed to nanoparticles investigated in a yet limited number of animals by micro-PIXE. The successful use of the technique to obtain information of accumulation and spatial distribution of elements localized to specific organs and tissues at exposure conditions typical of toxicological investigations calls for additional systematic measurements. Work is currently in progress in our laboratory to produce an expanded set of data, aiming to identify the most suitable and reliable sample preparation protocol, and to establish a complete curve correlating a broad range of exposure doses with the iron accumulation and distribution in the larvae.

Acknowledgements

This work has been partially funded by the research networks of the *National Institute of Surface Engineering* (INCT, CNPq/CAPES) and *Synthesis and Characterization of Nanostructured Materials by Ion Beams* (PRONEX, CNPq/FAPERGS). M.R.C. also acknowledges CAPES for a scholarship. E.M.N. is supported by CNPq (409421/2017-0). M. R. V. has a CNPq fellowship (308404/2015-7) and is funded by CNPq (425818/2018-7).

References

- [1] A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schüth, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 1222–1244, <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>.
- [2] A.S. Teja, P.Y. Koh, Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 55 (2009) 22–45, <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>.
- [3] A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials* 26 (2005) 3995–4021, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- [4] A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, T. Kobayashi, Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *J. Biosci. Bioeng.* 100 (2005) 1–11, <https://doi.org/10.1263/jbb.100.1>.
- [5] R.Y. Hong, B. Feng, L.L. Chen, G.H. Liu, H.Z. Li, Y. Zheng, D.G. Wei, Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles, *Biochem. Eng. J.* 42 (2008) 290–300, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.07.009>.
- [6] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, Elst L. Vander, R.N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physico-chemical characterizations and biological applications, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2064–2110, <https://doi.org/10.1021/cr068445e>.
- [7] M. Bañobre-López, A. Teijeiro, J. Rivas, Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment, *Reports Pract. Oncol. Radiother.* 18 (2013) 397–400, <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2013.09.011>.
- [8] R. Avazzadeh, E. Vashghani-Farahani, M. Soleimani, S. Amanpour, M. Sadeghi, Synthesis and application of magnetite dextran-spermine nanoparticles in breast cancer hyperthermia, *Prog. Biomater.* 6 (2017) 75–84, <https://doi.org/10.1007/s40204-017-0068-8>.
- [9] T.D. Schladt, K. Schneider, H. Schild, W. Tremel, Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment, *Dalton Trans.* 40 (2011) 6315–6343, <https://doi.org/10.1039/c0dt00689k>.
- [10] K.T. Geiss, J.M. Gearhart, J.J. Schlager, S.M. Hussain, K.L. Hess, In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicol. Vitro* 19 (2005) 975–983, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034>.
- [11] S.J.H. Soenen, U. Himmelreich, N. Nuytten, M. De Cuyper, Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling, *Biomaterials* 32 (2011) 195–205, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.075>.
- [12] B. Kong, J.H. Seog, L.M. Graham, S.B. Lee, Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles, *Nanomedicine* 6 (2011) 929–941, <https://doi.org/10.2217/nmm.11.77>.
- [13] A. Liskova, M. Kuricova, B. Smolkova, M. Dusinska, J. Tulinska, N. El Yamani, E. Rollerova, E. Rundén-Pran, Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: new strategies for toxicity testing? *Food Chem. Toxicol.* 109 (2017) 797–811, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.030>.
- [14] G.M.T. de Oliveira, E.M.N. de Oliveira, T.C.B. Pereira, R.M. Papaléo, M.R. Bogo, Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish, *J. Nanopart. Res.* 19 (2017), <https://doi.org/10.1007/s11051-017-4074-5>.
- [15] G.M.T. De Oliveira, L.W. Kist, T.C.B. Pereira, J.W. Bortolotto, F.L. Paquete, E.M.N. De Oliveira, C.E. Leite, C.D. Bonan, N.R. De Souza Basso, R.M. Papaleo, M.R. Bogo, Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish, *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 162 (2014) 77–84, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.03.010>.
- [16] X. Zhu, S. Tian, Z. Cai, Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (Danio rerio) early life stages, *PLoS One* 7 (2012) 1–6, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046286>.
- [17] A.P. Fifi, G. Radaelli, E. Bonaiuto, G. Chemello, I. Olivetto, M. Magro, F. Maradonna, F. Gigliotti, F. Vianello, C. Piccinetti, B. Randazzo, O. Carnevali, Oxytetracycline delivery in adult female zebrafish by iron oxide nanoparticles, *Zebrafish* 13 (2016) 495–503, <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1302>.
- [18] P.V. Asharani, Y. Lianwu, Z. Gong, S. Valiyaveetil, Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos, *Nanotoxicology* 5 (2011) 43–54, <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.489207>.
- [19] S.M. Samaee, S. Rabbani, B. Jovanović, M.R. Mohajeri-Tehrani, V. Haghpanah, Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: a comparison between two different classes of hatching-derived variables, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116 (2015) 121–128, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.012>.
- [20] D.P. Karunaratne, K.N. Wallace, M.K. Prochaska, S. Andreescu, X. Liu, E. Dumitrescu, Developmental toxicity of glycine-coated silica nanoparticles in embryonic zebrafish, *Environ. Pollut.* 229 (2017) 439–447, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.016>.
- [21] T.H. Chen, C.C. Lin, P.J. Meng, Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (Danio rerio), *J. Hazard. Mater.* 277 (2014) 134–140, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.030>.
- [22] A.J. Hill, H. Teraoka, W. Heideman, R.E. Peterson, Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity, *Toxicol. Sci.* 86 (2005) 6–19, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>.
- [23] G. Kari, U. Rodeck, A.P. Dicker, Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery, *Clin. Pharmacol. Ther.* 82 (2007) 70–80, <https://doi.org/10.1038/sj.cpt.6100223>.
- [24] N.R.S.B.M.L.Z., R.M.P. Elisa M. N. de Oliveira, Maximiliano S. da Rocha Ana Paula P. Froner, *Artigo, Quim. Nov.* 42 (2019) 57–64.
- [25] P. Wunderbaldinger, L. Josephson, R. Weissleder, Crosslinked iron oxides (CLIO): a new platform for the development of targeted MR contrast agents, *Acad. Radiol.* 9 (2002) 304–306, [https://doi.org/10.1016/S1076-6332\(03\)80210-6](https://doi.org/10.1016/S1076-6332(03)80210-6).
- [26] M. Westerfield, ZFIN: Zebrafish Book: Contents, Zebrafish Book. A Guid. Lab. Use Zebrafish (Danio rerio). 4th Ed., Univ. Oregon Press. Eugene. (n.d.).
- [27] Canadian Council on Animal Care guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing, *Can. Counc. Anim. Care.* (2005) 1–94.
- [28] J.E. Copper, L.R. Budgeon, C.A. Foutz, D.B. van Rossum, D.J. Vanselow, M.J. Hubley, D.P. Clark, D.T. Mandrell, K.C. Cheng, Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish, *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 208 (2018) 38–46, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.11.003>.
- [29] J.L. Campbell, N.I. Boyd, N. Grassi, P. Bonnick, J.A. Maxwell, The Guelph PIXE software package IV, *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. B* 268 (2010) 3356–3363, <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2010.07.012>.
- [30] L.A. Boufleur, C.E.I. dos Santos, R. Debastiani, M.L. Yoneama, L. Amaral, J.F. Dias, Elemental characterization of Brazilian canned tuna fish using particle induced X-ray emission (PIXE), *J. Food Compos. Anal.* 30 (2013) 19–25, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.01.002>.
- [31] M.J. Hackett, J.A. Mcquillan, F. El-assaad, J.B. Aitken, A. Levina, D.D. Cohen, R. Siegel, E.A. Carter, G.E. Grau, H. Hunt, P.A. Lay, Chemical alterations to murine brain tissue induced by formalin fixation: implications for biospectroscopic imaging and mapping studies of disease, *Analyst* (2011) 2941–2952, <https://doi.org/10.1039/c0an00269k>.
- [32] A. Van Der Ent, W.J. Przybyłowicz, M.D. De Jonge, H.H. Harris, C.G. Ryan, G. Tytko, D.J. Paterson, A.D. Barnabas, P.M. Kopittke, J. Mesjasz-przybyłowicz, X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyper-accumulating plants, *Tansley Review* (2018) 432–452, <https://doi.org/10.1111/nph.14810>.
- [33] K. Turnau, Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas – as revealed by micro-PIXE analysis Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B* (2001), [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(01\)00631-0](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(01)00631-0).
- [34] P. Hwang, M. Chou, Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis, *PLugers Arch.* (2013) 1233–1247, <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1269-1>.
- [35] A. Laskar, M. Ghosh, S.I. Khattak, W. Li, X.M. Yuan, Degradation of super-paramagnetic iron oxide nanoparticle-induced ferritin by lysosomal cathepsins and related immune response, *Nanomedicine* 7 (2012) 705–717, <https://doi.org/10.2217/nmm.11.148>.

5.2. Dados complementares – quantificação do ferro das larvas por ICP-MS

5.2.1. Massa de ferro dos *pools* de larvas em função da dose de tratamento

Dose de tratamento (mM de Fe)

A partir do mesmo protocolo de exposição descrito no item 4.3, foi realizada uma nova exposição com número amostral mais significativo, visando à quantificação do ferro por ICP-MS. Os gráficos abaixo exibem a massa de Fe de cada *pool* de 16 larvas, e a massa aproximada de ferro de cada larva (massa de ferro do *pool* dividida pelo número de larvas de cada *pool*) em função das doses de tratamento (mM de Fe).

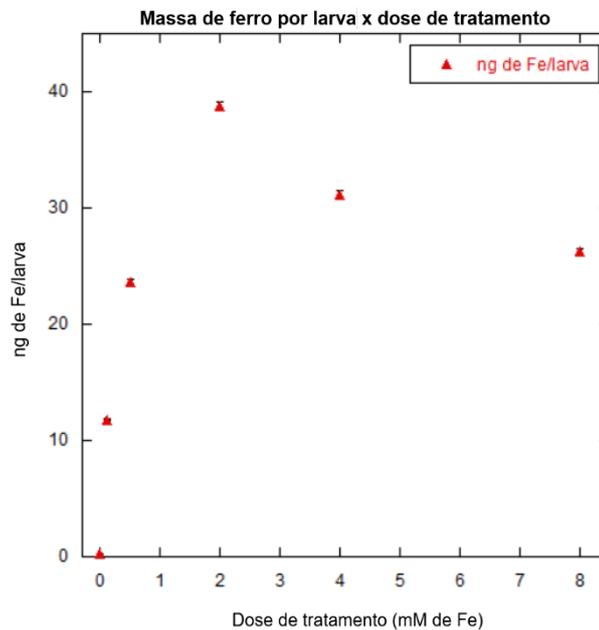
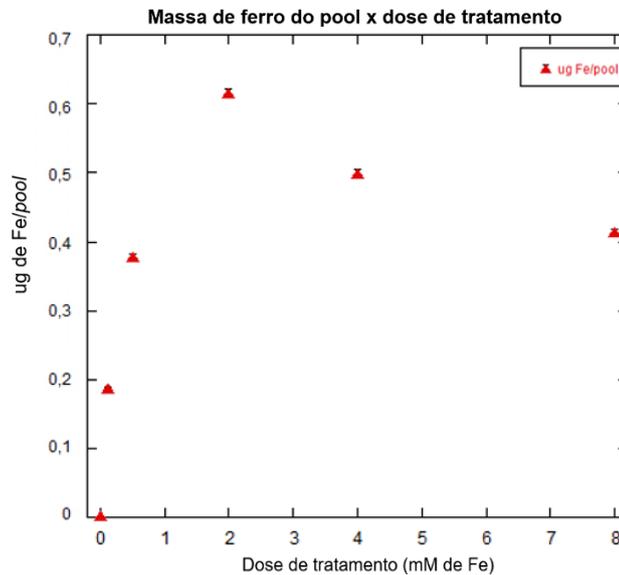


Figura 5.1: massa de ferro do *pool* de larvas (μg de Fe/*pool*), e massa de ferro por larva (ng de Fe/larva), em função da dose de tratamento, em mM

De maneira geral, os dados obtidos sustentam as conclusões preliminares extraídas das análises por micro-PIXE realizadas neste trabalho. Observa-se que o pico de concentração se encontra na faixa de doses intermediárias (entre 2,0 e 4,0 mM), e que a concentração de Fe das larvas não cresce proporcionalmente com a dose de tratamento; isto fica evidente na dose máxima de 8,0 mM, que, apesar de ser o dobro da dose 4, possui valor próximo das doses 0,5 e 4,0 mM. Portanto, as tendências de pico de absorção para a dose de 2,0 mM, e de crescimento não linear da concentração de ferro da larva em função da dose de tratamento, foram observadas pelas duas técnicas.

Esses dados sugerem que pode haver mecanismos de saturação na absorção de Fe pelas larvas. No contexto do protocolo realizado, no qual as SPION-DX foram diluídas na água do sistema, a principal via de absorção de substâncias em peixes são as guelras, conforme já demonstrado em exposições de peixes-zebra a metais pesados^{85,86}. Nesses casos, nos quais foram observados indícios de saturação para altas doses e altos tempos de exposição, saturação e possíveis danos às guelras devidos à alta concentração de metais na água poderia explicar a redução nas concentrações de metais absorvidos. Nesse caso, apesar de as guelras serem a principal via de absorção de nutrientes presentes na água, a alta sensibilidade desses órgãos a determinadas substâncias (ou concentrações elevadas) provocaria danos que resultariam em falhas em mecanismos como de osmorregulação entre a corrente sanguínea do peixe e o meio aquático. No contexto de exposições a NPs, elas podem ser incorporadas através das guelras, dos intestinos (absorção oral, principalmente) e da epiderme. A saturação é observada principalmente nas guelras e no intestino⁸⁶. A absorção oral é pouco relevante até aproximadamente 5 dpf, portanto, os principais acessos das SPION-DX ao organismo das larvas são as guelras e a epiderme – as micrografias de micro-PIXE exibidas no item 5.1 demonstram altas concentrações de SPION-DX na região abdominal e na epiderme. Contudo, os mecanismos de absorção são complexos e dependem de tamanho, carga superficial, concentração e tempo de exposição à NP⁸⁶, o que exige uma investigação mais aprofundada das rotas de absorção das SPION-DX e sítios de acúmulo e saturação.

5.2.2. Concentração de ferro nas soluções de tratamento

As concentrações para exposição são determinadas por UV-VIS, conforme descrito no item 4.2.3. Foram separadas alíquotas das doses de tratamento utilizadas na exposição do item 5.2.1, e as concentrações de ferro, em mM, foram comparadas com as calculadas por UV-VIS, conforme gráfico a seguir. Para as doses de 1 a 5 (0,125, 0,5, 2,0 4,0 e 8,0 mM), as medidas por ICP-MS corresponderam aos valores de 0,06, 0,46, 1,33, 2,70 e 6,40 mM.

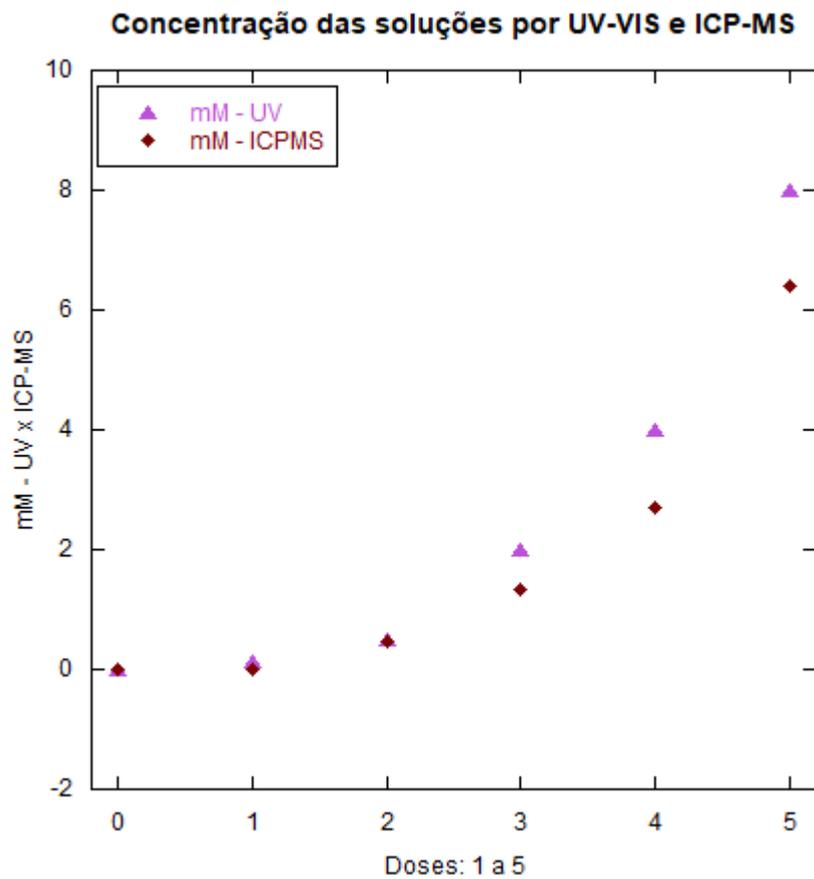


Figura 5.2: comparação de concentração de ferro nas soluções de tratamento, em mM, medidas por UV-VIS e ICP-MS

Observa-se que, a partir de 2,0 mM, a diferença entre a concentração de ferro medida por ICP-MS e UV-VIS torna-se significativa. Para doses mais baixas, o UV-VIS e ICP-MS tiveram maior concordância. Esses desvios devem ser levados em consideração para futuras medidas, nas quais a curva de concentração de ferro das larvas em função da dose de tratamento seja medida por ICP-MS. Levando esses dados em consideração, o gráfico abaixo mostra a curva de concentração em função da dose de tratamento, considerando as concentrações das soluções medidas por ICP-MS. Apesar de a diferença entre as concentrações por ICP-MS e UV-VIS ser relevante, o desvio não alterou a curva de tendência de absorção de ferro das larvas.

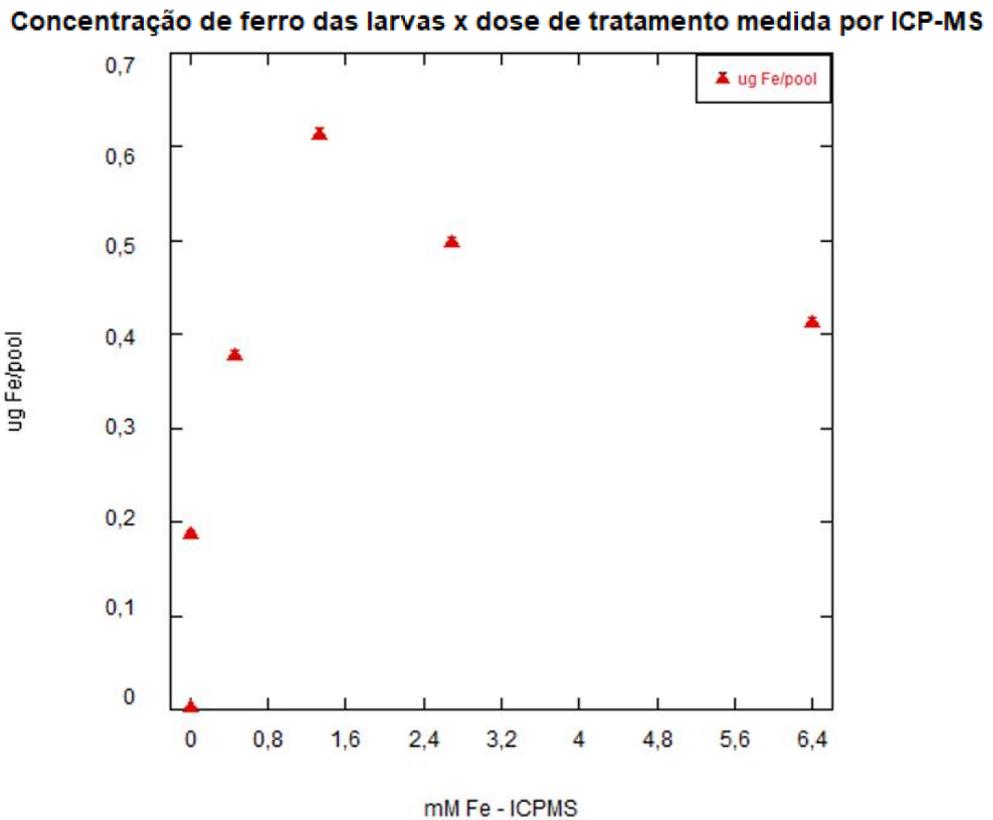


Figura 5.3: massa de ferro do *pool* de larvas (μg de Fe/*pool*), em função da dose de tratamento, em mM. Neste gráfico, a dose de tratamento foi medida por ICP-MS, posterior à exposição.

6. CONCLUSÕES

A técnica de caracterização por feixe iônico micro-PIXE mostrou-se viável para avaliação da biodistribuição de ferro em larvas de peixes-zebra tratadas com SPION-DX em diferentes concentrações. A quantidade de ferro presente em larvas tratadas está dentro dos limites de detecção da técnica, o que possibilitou a quantificação do ferro das larvas no software GUPIXWIN® através de diferentes correções de espessura e matriz.

O sinal elevado de ferro presente em todas as 10 larvas de peixes-zebra tratadas demonstra que as exposições provocam retenção do metal no organismo dos animais, tendo as larvas controle (não tratadas) como parâmetro. Os mapas elementares bidimensionais demonstram que, para ambos os protocolos de preparação de amostra, o ferro distribui-se homogêneo pelo corpo das larvas. Em 2 animais, notou-se sutil acúmulo na região abdominal das larvas, onde se localizam órgãos metabolizadores de SPION-DX, como o fígado.

Em relação a concentrações absolutas, observou-se que o aumento na dose de exposição a SPION-DX não provoca aumento proporcional do ferro presente nas larvas, o que pode sugerir saturação a partir de 2,0 mM. Houve diferenças significativas nas concentrações de ferro das larvas entre preparações de amostras diferentes. Uma vez que a massa de amostra irradiada em larvas cortadas é significativamente menor, um sinal menor de ferro detectado em tais amostras é esperado. Realizaram-se medidas complementares via ICP-MS, e a não proporcionalidade também foi observada por essa técnica.

Finalmente, as variações observadas em elementos endógenos como P, S, K e Ca entre os espectros estão potencialmente associadas aos procedimentos de preparação de amostras, uma vez que não foi possível estabelecer um padrão de presença ou ausência de determinado elemento em função do procedimento de preparo utilizado.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Até onde se sabe, este projeto é inédito e não há bibliografia científica que aborde um trabalho de caracterização multielementar de larvas de peixe-zebra expostas a NPs. Por isso, ao longo do projeto foram listados diversos aspectos que devem ser trabalhados a fim de se obter um protocolo final de como avaliar a absorção de ferro em larvas de peixes-zebra através da técnica micro-PIXE. Apesar de o protocolo de exposição ser bem consolidado e fundamentado em literatura científica atual, os procedimentos de preparação de amostras e instrumentação do micro-PIXE devem ser mais bem trabalhados.

Será dada continuidade a tratamentos em estatística e número de doses semelhantes ao que consta no item 5.2, a fim de confirmar a tendência de saturação para doses altas observada nos resultados atuais.

Além disso, pretende-se ampliar a comparação com outras de técnicas analíticas para que se possa realizar cruzamento de dados provenientes de diferentes aquisições. Por exemplo, a quantificação via micro-PIXE, PIXE convencional e ICP-MS, o mapeamento via micro-PIXE e EDS.

Por fim, poderiam ser explorados tratamentos com NPOFe com outros revestimentos, como quitosana, SiO₂ e PEG, e avaliar os mesmos parâmetros de biodistribuição, retenção e saturação de ferro.

Nas próximas seções são detalhados os pontos que devem ser desenvolvidos para continuidade do projeto.

7.1. Preparação de amostras para micro-PIXE

Pretende-se estabelecer um protocolo devidamente validado de preparação de amostras de larvas de peixes-zebra para irradiação em micro-PIXE. Além dos protocolos utilizados neste trabalho, serão adotados procedimentos que garantam uma maior preservação química da amostra. Poderia ser avaliada a eficácia do uso de isopentano ao invés de N₂ para congelamento rápido das larvas, pois não sublima em contato com a amostra à temperatura ambiente e evita o efeito Leidenfrost, que pode induzir a formação de cristais de gelo e consequente vazamento

de elementos presentes no meio intracelular^{33,87,88}. Para a secagem da amostra, em vez de em dessecadora à temperatura ambiente, será testada a técnica de liofilização, que consiste na sublimação controlada da água congelada da amostra através do aumento gradual de temperatura em uma câmara de alto vácuo. O controle de temperatura e pressão deve garantir uma taxa de sublimação pequena, para que danos estruturais como o enrugamento e quebra da amostra sejam evitados. Além disso, uma rápida sublimação, bem como um controle pouco sensível sobre a temperatura, que leve ao aquecimento indevido da amostra, podem provocar deslocamento de íons hidrossolúveis como o fósforo, o potássio, o sódio e o cloro. Feito adequadamente, o resfriamento rápido seguido da sublimação lenta conserva a integridade química de tecidos, tanto em relação à biodistribuição elementar, quanto à quantidade absoluta de elementos químicos.

7.2. Aspectos de instrumentação do micro-PIXE e uso de técnicas complementares

Mencionaram-se obstáculos impostos pelo tempo de irradiação necessário para coleta de um volume estatisticamente significativo de dados, e para que os mapas possuam um sinal integrado de ferro visível. Para uma amostra das dimensões de uma larva de peixe-zebra cortada, já se chegou a mais de 3h de irradiação para que se obtivesse um mapa adequado. Isso pode ser contornado adaptando-se a geometria de detecção às características da amostra. Conforme observado nos resultados obtidos por ICP-MS, mesmo larvas tratadas com concentração elevada de SPION-DX retêm uma quantidade muito pequena de ferro, e esse elemento, apesar de presente em larvas controle, possui sinal indistinguível do ruído. Portanto, uma proposta futura é de reduzir a distância entre a amostra e o detector, para que se aumente a fluência de raios-X característicos que o atinjam e, possivelmente, reduzir os tempos de irradiação necessários para aquisição de mapas de elementos traço. Além disso, há a recente possibilidade de uso do software GUMAP, desenvolvido na Universidade Guelph (Canadá)⁸⁴, que permite selecionar regiões de mapas obtidos via micro-PIXE para quantificação local da imagem. Uma vez adaptado à quantificação de amostras não homogêneas, essa ferramenta poderá fornecer

informações espaciais específicas de determinadas regiões do peixe, o que complementar os dados obtidos através da técnica.

Em tratamentos futuros, a massa das larvas deverá ser aferida após a eutanásia, para que os resultados de ICP-MS possam ser convertidos para ppm e o cruzamento de dados de quantificação de ferro por ICP-MS e micro-PIXE seja possível. Até então, ambas as curvas de concentração de ferro em função da dose de tratamento demonstraram coerência entre as técnicas. Além de ICP-MS, serão realizadas novas tentativas de preparo de amostras de larvas para irradiação na linha de PIXE convencional do Tandem 3 MV, visando a estabelecer um protocolo de preparação de amostras para essa técnica e comparação de dados de quantificação entre dados obtidos na PIXE convencional e micro-PIXE. No âmbito das técnicas de mapeamento, serão realizadas medidas em MEV-EDS de amostras medidas previamente no micro-PIXE. Apesar de possuir limite de detecção inferior ao micro-PIXE, o MEV-EDS fornece maior resolução espacial e será um importante complemento à pesquisa, sendo possível visualizar regiões de acúmulo em microestruturas não resolvidas pelo sistema de micro feixe. Até o momento, as tentativas de medidas por MEV-EDS não foram bem-sucedidas devido a dificuldades relacionadas ao preparo de amostras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chemie - Int Ed.* 2007;46(8):1222-1244. doi:10.1002/anie.200602866
2. Teja AS, Koh PY. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog Cryst Growth Charact Mater.* 2009;55(1-2):22-45. doi:10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003
3. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005;26(18):3995-4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.012
4. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng.* 2005;100(1):1-11. doi:10.1263/jbb.100.1
5. Hong RY, Feng B, Chen LL, et al. Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Biochem Eng J.* 2008;42(3):290-300. doi:10.1016/j.bej.2008.07.009
6. Laurent S., Forge D., Port M., et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem Rev.* 2008;108(6):2064-2110. doi:10.1021/cr068445e
7. Bañobre-López M, Teijeiro A, Rivas J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports Pract Oncol Radiother.* 2013;18(6):397-400. doi:10.1016/j.rpor.2013.09.011
8. Avazzadeh R, Vasheghani-Farahani E, Soleimani M, Amanpour S, Sadeghi M. Synthesis and application of magnetite dextran-spermine nanoparticles in breast cancer hyperthermia. *Prog Biomater.* 2017;6(3):75-84. doi:10.1007/s40204-017-

0068-8

9. Schladt TD, Schneider K, Schild H, Tremel W. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalton Trans.* 2011;40(24):6315-6343. doi:10.1039/c0dt00689k
10. Geiss KT, Gearhart JM, Schlager JJ, Hussain SM, Hess KL. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol Vitro.* 2005;19(7):975-983. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.034
11. Soenen SJH, Himmelreich U, Nuytten N, De Cuyper M. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials.* 2011;32(1):195-205. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.075
12. Kong B, Seog JH, Graham LM, Lee SB. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine.* 2011;6(5):929-941. doi:10.2217/nnm.11.77
13. Liskova A, Kuricova M, Smolkova B, et al. Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: New strategies for toxicity testing? *Food Chem Toxicol.* 2017;109:797-811. doi:10.1016/j.fct.2017.08.030
14. de Oliveira GMT, de Oliveira EMN, Pereira TCB, Papaléo RM, Bogo MR. Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish. *J Nanoparticle Res.* 2017;19(12). doi:10.1007/s11051-017-4074-5
15. De Oliveira GMT, Kist LW, Pereira TCB, et al. Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol.* 2014;162(1):77-84. doi:10.1016/j.cbpc.2014.03.010
16. Zhu X, Tian S, Cai Z. Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Early Life Stages. *PLoS One.* 2012;7(9):1-6. doi:10.1371/journal.pone.0046286
17. Fifi AP, Radaelli G, Bonaiuto E, et al. Oxytetracycline Delivery in Adult Female Zebrafish by Iron Oxide Nanoparticles. *Zebrafish.* 2016;13(6):495-503. doi:10.1089/zeb.2016.1302
18. Asharani P V., Lianwu Y, Gong Z, Valiyaveetil S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology.* 2011;5(1):43-54. doi:10.3109/17435390.2010.489207

19. Samaee SM, Rabbani S, Jovanović B, Mohajeri-Tehrani MR, Haghpanah V. Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: A comparison between two different classes of hatching-derived variables. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;116:121-128. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.012
20. Karunaratne DP, Wallace KN, Prochaska MK, Andreescu S, Liu X, Dumitrescu E. Developmental toxicity of glycine-coated silica nanoparticles in embryonic zebrafish. *Environ Pollut.* 2017;229:439-447. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.016
21. Chen TH, Lin CC, Meng PJ. Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *J Hazard Mater.* 2014;277:134-140. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.12.030
22. Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496(7446):498-503. doi:10.1038/nature12111
23. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005;86(1):6-19. doi:10.1093/toxsci/kfi110
24. Kari G, Rodeck U, Dicker AP. Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(1):70-80. doi:10.1038/sj.clpt.6100223
25. Schultz C, Powell K, Crossley A, et al. Analytical approaches to support current understanding of exposure, uptake and distributions of engineered nanoparticles by aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicology.* 2015;24(2):239-261. doi:10.1007/s10646-014-1387-3
26. Collins AR, Annangi B, Rubio L, et al. High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2017;9(1). doi:10.1002/wnan.1413
27. Deloid GM, Cohen JM, Pyrgiotakis G, Demokritou P. dosimetry of dispersed , engineered nanomaterials. *Nat Protoc.* 2017;12(2):355-371. doi:10.1038/nprot.2016.172
28. Yin B, Li KHK, Ho LWC, Chan CKW, Choi CHJ. Toward Understanding in Vivo Sequestration of Nanoparticles at the Molecular Level. *ACS Nano.* 2018;12(3):2088-2093. doi:10.1021/acsnano.8b00141

29. Laura Soriano M, Zougagh M, Valcárcel M, Ríos Á. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. *Talanta*. 2018;177(June 2017):104-121. doi:10.1016/j.talanta.2017.09.012
30. Johansson SAE. analysis.
31. Stori EM, Rocha MLCF, Dias JF, et al. Elemental characterization of injuries in fish liver. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms*. 2014;318(PART A):83-87. doi:10.1016/j.nimb.2013.05.109
32. Boufleur LA, dos Santos CEI, Debastiani R, Yoneama ML, Amaral L, Dias JF. Elemental characterization of Brazilian canned tuna fish using particle induced X-ray emission (PIXE). *J Food Compos Anal*. 2013;30(1):19-25. doi:10.1016/j.jfca.2013.01.002
33. Ent A Van Der, Przybyłowicz WJ, Jonge MD De, et al. Tansley review X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyperaccumulator plants. Published online 2018:432-452. doi:10.1111/nph.14810
34. Lu K. Nanocrystalline metals crystallized from amorphous solids: Nanocrystallization, structure, and properties. *Mater Sci Eng R Reports*. 1996;16(4):161-221. doi:10.1016/0927-796X(95)00187-5
35. Qiao R, Yang C, Gao M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *J Mater Chem*. 2009;19(35):6274-6293. doi:10.1039/b902394a
36. Wunderbaldinger P, Josephson L, Weissleder R. Crosslinked iron oxides (CLIO): A new platform for the development of targeted MR contrast agents. *Acad Radiol*. 2002;9(SUPPL. 2):304-306. doi:10.1016/S1076-6332(03)80210-6
37. Laskar A, Ghosh M, Khattak SI, Li W, Yuan XM. Degradation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-induced ferritin by lysosomal cathepsins and related immune response. *Nanomedicine*. 2012;7(5):705-717. doi:10.2217/nnm.11.148
38. Wu XLC, Zhang XY, Steinberg XG, et al. A review of magnetic particle imaging and perspectives on neuroimaging. *Am J Neuroradiol*. 2019;40(2):206-212. doi:10.3174/ajnr.A5896
39. Tsiapa I, Efthimiadou EK, Fragogeorgi E, et al. Tc-labeled aminosilane-coated iron oxide nanoparticles for molecular imaging of a m b 3 -mediated tumor

- expression and feasibility for hyperthermia treatment. *J Colloid Interface Sci.* 2014;433:163-175. doi:10.1016/j.jcis.2014.07.032
40. Villacis RAR, Filho JS, Piña B, et al. Integrated assessment of toxic effects of maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles in zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2017;191(July):219-225. doi:10.1016/j.aquatox.2017.08.004
 41. Turcheniuk K, Tarasevych A V., Kukhar VP, Boukherroub R, Szunerits S. Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles. *Nanoscale.* 2013;5(22):10729. doi:10.1039/c3nr04131j
 42. Wang Y-XJ. Current status of superparamagnetic iron oxide contrast agents for liver magnetic resonance imaging. *World J Gastroenterol.* 2015;21(47):13400. doi:10.3748/wjg.v21.i47.13400
 43. Dufort S, Sancey L, Coll J-L. Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(2):179-189. doi:10.1016/J.ADDR.2011.09.009
 44. Sharifi S, Seyednejad H, Laurent S, Atyabi F, Saei AA, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo molecular and cellular imaging. *Contrast Media Mol Imaging.* 2015;10(5):329-355. doi:10.1002/cmml.1638
 45. EISBERG, R. RESNICK R. EISBERG, R. RESNICK, R. Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas. 2^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 1979. 928p.
 46. Hornyak, Gabor L. John J. Moore, H.F. Tibbals JD. *Fundamentals of Nanotechnology-CRC Press (2009).*
 47. Elisa M. N. de Oliveira, Maximiliano S. da Rocha Ana Paula P. Froner NRSBMLZ and RMP. Artigo. *Quim Nov.* 2019;42(1):57-64.
 48. Choi H, Choi SR, Zhou R, Kung HF, Chen IW. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. *Acad Radiol.* 2004;11(9):996-1004. doi:10.1016/j.acra.2004.04.018
 49. Ghaznavi H, Hosseini-Nami S, Kamrava SK, et al. Folic acid conjugated PEG coated gold-iron oxide core-shell nanocomplex as a potential agent for targeted photothermal therapy of cancer. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*

- Published online October 2017:1-11. doi:10.1080/21691401.2017.1384384
50. Pinel S, Thomas N, Boura C, Barberi-Heyob M. Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment. *Adv Drug Deliv Rev*. Published online November 2018. doi:10.1016/J.ADDR.2018.10.013
 51. Tiwari P, Vig K, Dennis V, Singh S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*. 2011;1(1):31-63. doi:10.3390/nano1010031
 52. Thorek DLJ, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging*. Vol 34.; 2006. doi:10.1007/s10439-005-9002-7
 53. Hainfeld JF, Lin L, Slatkin DN, Avraham Dilmanian F, Vadas TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2014;10(8):1609-1617. doi:10.1016/J.NANO.2014.05.006
 54. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. 2015;200:138-157. doi:10.1016/J.JCONREL.2014.12.030
 55. Beddoes CM, Case CP, Briscoe WH. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Adv Colloid Interface Sci*. 2015;218:48-68. doi:10.1016/j.cis.2015.01.007
 56. Ruenraroengsak P, Novak P, Berhanu D, et al. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2012;6(1):94-108. doi:10.3109/17435390.2011.558643
 57. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*. 2010;6(1):12-21. doi:10.1002/smll.200901158
 58. Nairz M, Theurl I, Swirski FK, Weiss G. "Pumping iron"—how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2017;469(3-4):397-418. doi:10.1007/s00424-017-1944-8
 59. Kovřížnych JA, Sotříková R, Zeljenková D, Rollerová E, Szabová E, Wimmerová S. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages - Comparative study. *Interdiscip Toxicol*. 2013;6(2):67-73. doi:10.2478/intox-2013-0012
 60. Karl Fenta., Christin J. Weisbrod, Amina Wirth-Heller UP. Assessment of uptake

- and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish.pdf. Published online 2010:2018-2228. doi:10.1016/j.aquatox.2010.02.019
61. Zhao L, Xia Z, Wang F. Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and copper) metabolism. *Front Pharmacol.* 2014;5 MAR(March):1-23. doi:10.3389/fphar.2014.00033
 62. Böhme S, Baccaro M, Schmidt M, et al. Metal uptake and distribution in the zebrafish (: *Danio rerio*) embryo: Differences between nanoparticles and metal ions. *Environ Sci Nano.* 2017;4(5):1005-1015. doi:10.1039/c6en00440g
 63. Leite CE, Maboni L de O, Cruz FF, et al. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(3):681-689. doi:10.1016/j.taap.2013.08.001
 64. R. Abou-Shakra F. Chapter 12 Biomedical applications of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as an element specific detector for chromatographic separations. *Handb Anal Sep.* 2003;4:351-371. doi:10.1016/S1567-7192(03)80013-X
 65. Hare DJ, George JL, Bray L, et al. The effect of paraformaldehyde fixation and sucrose cryoprotection on metal concentration in murine neurological tissue. *J Anal At Spectrom.* 2014;29(3):565-570. doi:10.1039/c3ja50281c
 66. Schwarz SA. Secondary Ion Mass Spectroscopy. *Encycl Mater Sci Technol.* Published online 2001:8283-8290. doi:10.1016/b0-08-043152-6/01482-0
 67. Franken LE, Grünewald K, Boekema EJ, Stuart MCA. A Technical Introduction to Transmission Electron Microscopy for Soft-Matter: Imaging, Possibilities, Choices, and Technical Developments. *Small.* 2020;16(14). doi:10.1002/smll.201906198
 68. Alford, Terry L., Feldman, L.C., Mayer JW. *Fundamentals of Nanoscale Film Analysis.* Springer, 2007. ISBN 0387292616.
 69. Johansson, Sven A E; Campbell J. *PIXE: A Novel Technique for Elemental Analysis.* John Wiley & Sons, 1988. ISBN 0471920118.
 70. Novak S, Drobne D, Valant J, Pelicon P. Internalization of consumed TiO₂ nanoparticles by a model invertebrate organism. *J Nanomater.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/658752
 71. Tkalec ŽP, Drobne D, Vogel-Mikuš K, et al. Micro-PIXE study of Ag in digestive glands of a nano-Ag fed arthropod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Nucl*

- Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms*. 2011;269(20):2286-2291. doi:10.1016/j.nimb.2011.02.068
72. Vogel-Mikuš K, Pongrac P, Kump P, et al. Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. *Environ Pollut*. 2007;147(1):50-59. doi:10.1016/j.envpol.2006.08.026
73. Vogel-Mikuš K, Simčič J, Pelicon P, et al. Comparison of essential and non-essential element distribution in leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *Plant, Cell Environ*. 2008;31(10):1484-1496. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01858.x
74. Haraguchi H. Metallomics: Integrated biometal science. *Met Recent Anal Tech Appl*. 2017;(December 2014):3-39. doi:10.1007/978-4-431-56463-8_1
75. Mangelson NF, Hill MAXW, Nielson KK, Ryder JF. V . Application to biological samples. 1977;142:133-142.
76. Oliveira EMN, Selli GI, von Schmude A, et al. Developmental toxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings in zebrafish larvae. *J Nanoparticle Res*. 2020;22(4). doi:10.1007/s11051-020-04800-2
77. de Oliveira EMN. AGENTES DE CONTRASTE NANOESTRUTURADOS A BASE DE ÓXIDO DE FERRO : SÍNTESE , CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO. Tese de doutorado - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Março , 2018. Published online 2018.
78. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*. 2016;8(4):409-427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6
79. Zetasizer Nano Series User Manual Zetasizer Nano Series User Manual M A N 0 3 1 7 I s s u e 2. 1 J u l y 2 0 0 4. 2004;(2).
80. Rocha FS, Gomes AJ, Lunardi CN, Kaliaguine S, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. *Can J Chem Eng*. 2018;96(12):2512-2517. doi:10.1002/cjce.23344
81. Wilschefski S, Baxter M. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev*. 2019;40(3):115-133. doi:10.33176/aacb-19-00024
82. Copper JE, Budgeon LR, Foutz CA, et al. Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. *Comp*

- Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol.* 2018;208(November):38-46.
doi:10.1016/j.cbpc.2017.11.003
83. Campbell JL, Boyd NI, Grassi N, Bonnicksen P, Maxwell JA. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B The Guelph PIXE software package IV. *Nucl Inst Methods Phys Res B.* 2010;268(20):3356-3363.
doi:10.1016/j.nimb.2010.07.012
84. Russell JL, Campbell JL, Boyd NI, Dias JF. GUMAP: A GUPIXWIN-compatible code for extracting regional spectra from nuclear microbeam list mode files. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms.* 2018;417:46-50. doi:10.1016/j.nimb.2017.08.013
85. Yang M, Cheng K, Qi S, et al. Affibody modified and radiolabeled gold–Iron oxide hetero-nanostructures for tumor PET, optical and MR imaging. *Biomaterials.* 2013;34(11):2796-2806. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.01.014
86. Bhagat J, Zang L, Nishimura N, Shimada Y. Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. *Sci Total Environ.* 2020;728:138707. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138707
87. Budka D, Mesjasz-Przybyłowicz J, Przybyłowicz WJ. Micro-PIXE analysis: Importance of biological sample preparation techniques. *Radiat Phys Chem.* 2004;71(3-4):785-786. doi:10.1016/j.radphyschem.2004.04.091
88. Kist AA. *Nuclear Analytical Methods in the Life Sciences.* Vol 51.; 1996.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br