

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

MAXIMILIANO SANTOS DA ROCHA

**RELAXIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO COM DIFERENTES
RECOBRIMENTOS EM EQUIPAMENTOS CLÍNICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Porto Alegre

2018

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

**RELAXIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO COM
DIFERENTES RECOBRIMENTOS EM EQUIPAMENTOS CLÍNICOS DE
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

MAXIMILIANO SANTOS DA ROCHA

LICENCIADO EM FÍSICA

BACHAREL EM FÍSICA MÉDICA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALÉO

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.

A presente dissertação foi alcançada em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).

**Porto Alegre
Janeiro, 2018**

Ficha Catalográfica

R672r Rocha, Maximiliano Santos da

Relaxividade de Nanopartículas de Óxido de Ferro com Diferentes Recobrimentos em Equipamentos Clínicos de Ressonância Magnética / Maximiliano Santos da Rocha . – 2018.

92 p.

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo.

1. Imagem por ressonância magnética. 2. Nanopartículas magnéticas. 3. Agentes de contraste. 4. Relaxividade. I. Papaléo, Ricardo Meurer. II. Título.

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

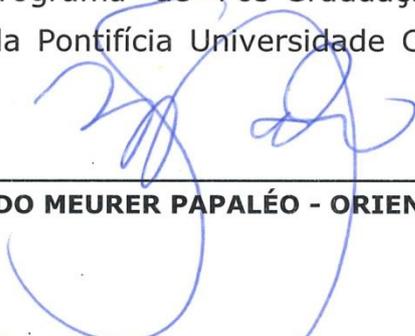
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363



RELAXIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO COM DIFERENTES RECOBRIMENTOS EM EQUIPAMENTOS CLÍNICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

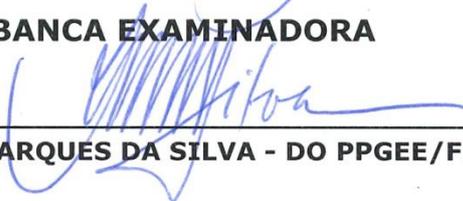
CANDIDATO: MAXIMILIANO SANTOS DA ROCHA

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

BANCA EXAMINADORA



DRA. ANA MARIA MARQUES DA SILVA - DO PPGE/FENG - PUCRS



DR. ROBERTO HUBLER - DO PGETEMA - FENG - PUCRS

Somente quem se dedica de corpo e alma a uma causa pode ser um verdadeiro mestre. A excelência, pois, exige a pessoa por inteiro.

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu tio, Sergio da Cunha Silva, que me criou como um filho e me ofereceu amor, dedicação e carinho incondicionais em vida.

AGRADECIMENTOS

À minha tia, Odila Maciel dos Santos, que me criou como um filho.

À minha mãe, Celia Cristina Ramos dos Santos, que me amou incondicionalmente em vida.

À minha irmã, Jessica Cristina dos Santos da Rocha que é um dos grandes incentivos da minha vida.

Aos meus primos, que considero irmãos, Paulo Renato, Claudia Renata e Luciano, pelos ensinamentos ao longo de minha vida e pelos cuidados dedicados a mim em infância, adolescência e idade adulta.

Ao meu amor, Lisiê, pela paciência, apoio, carinho e incentivos nesta fase.

Aos meus amigos, por compreenderem minha ausência neste momento crucial de formação.

À minha colega de pesquisa, Elisa Magno Nunes de Oliveira, pelo apoio e parceria nestes anos de pesquisa.

Aos colegas do grupo NanoPUC por todos esses anos de companheirismo, construção e reconstrução de conhecimentos e momentos de descontração.

Ao meu professor e orientador, Ricardo Meurer Papaléo, pela sua contribuição extremamente significativa para a minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus colegas de mestrado, que se mantiveram sempre ao meu lado, unidos nos momentos de desespero.

Aos colegas, professores e funcionários do CITIMAC, da Universidad de Cantabria, pela colaboração.

À Ana Paula Pastre Froner, pelo auxílio prestado na obtenção dos dados de MRI.

À CAPES e à HP pelo auxílio financeiro.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	6
AGRADECIMENTOS.....	7
SUMÁRIO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE SÍMBOLOS.....	15
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos Específicos	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1. Imagens por Ressonância Magnética Nuclear	24
3.1.1. <i>Spin</i> e Magnetização Nuclear	25
3.1.2. Sinal de Ressonância Magnética.....	27
3.1.2.1. Sinal FID (Free Induction Decay) e Processos de Relaxação	28
3.1.3. Manipulação do Contraste	31
3.2. Agentes de Contraste em MRI.....	32
3.2.1. Agentes de Contraste à Base de Gadolínio	32
3.2.2. Agentes de Contraste à Base de Óxido de Ferro	33
3.3. Processos de Relaxação em Nanopartículas Magnéticas	36
3.4. Relaxividade de Agentes de Contraste em MRI.....	37
3.4.1. Mecanismos de Relaxação Magnética Nuclear	38
3.4.1.1. Mecanismo de Relaxação da Esfera Externa	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Síntese e Características Físicas das Nanopartículas	43
4.1.1. Determinação da Concentração de Ferro nas Soluções Aquosas.....	44
4.1.2. Medidas de Magnetização	46
4.1.3. Difração de Raios X (DRX)	46
4.1.4. Espectroscopia Raman	46

4.1.5. Medidas ZFC/FC.....	47
4.2. Construção do Simulador.....	47
4.3. Aquisição dos Dados de Relaxação Magnética Nuclear.....	48
4.4. Análise das Imagens do MRI.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1. Caracterização Estrutural.....	51
5.1.1. Raman	51
5.1.2. Medidas de Difração de Raios-X.....	52
5.2. Medidas Magnéticas.....	55
5.2.1. Curvas de Magnetização	55
5.2.2. Curvas ZFC/FC	57
5.3. Medidas de Relaxividade	59
5.3.1. Concentração de Ferro	59
5.3.2. Medidas do Tempo de Relaxação T2	61
5.3.3. Medidas do Tempo de Relaxação T1	68
5.3.4. Relaxividade	74
6. CONCLUSÕES	78
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Movimento da magnetização M no referencial do laboratório, quando uma RF (B_1) é aplicada a uma frequência exatamente igual à frequência de Larmor do núcleo, $\omega_{RF} = \omega_0$. A magnetização nuclear M gira para um plano transversal ao campo magnético externo aplicado B_0 (esquerda). Em um referencial que gira na frequência de Larmor, B_1 parece estacionário (direita). [Adaptado de 24].....27
- Figura 3.2. Desenho esquemático dos efeitos de diferentes pulsos de RF na magnetização a) Pulso de 90° . b) Pulso de 180° . c) *Partial flip*, pulso entre 0° e 90° . [25].28
- Figura 3.3. a) Diagrama vetorial da magnetização ao longo do eixo z. b) Rotação da magnetização para o plano transversal após a aplicação do pulso de RF de 90° . c) Início do processo de defasagem dos spins individuais. d) Decaimento da magnetização transversal devido à defasagem dos spins individuais. e) Completo decaimento da magnetização transversal. [Adaptado de 26].28
- Figura 3.4. Magnetização da rede M rotacionando ao redor de B_0 na frequência de Larmor e sua conseqüente relaxação (esquerda), produzindo uma tensão oscilante em uma bobina de RF (direita). [Adaptado de 24].....29
- Figura 3.5. Representação de uma nanopartícula de óxido de ferro do tipo CLIO-NH₂. O núcleo magnético (d_c), é revestido com dextran reticulado formando a nanopartícula com diâmetro hidrodinâmico d_H . [Adaptado de 38].34
- Figura 3.6. Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com óxido de silício do tipo *core-shell* [20].....35
- Figura 3.7. Representação esquemática dos mecanismos da relaxação paramagnética para agentes de contraste à base de gadolínio [29].39
- Figura 3.8. Representação de um núcleo da molécula de água (esfera menor), difundindo perto de uma nanopartícula superparamagnética [Adaptado de 40].40
- Figura 4.1. Fotos do simulador construído para as medidas de relaxação magnética nuclear. A) Lado superior. B) Lado inferior. C) Lateral.48
- Figura 4.2. A) Simulador instalado no equipamento de MRI. B) Visualização dos dados no console.48
- Figura 5.1. Espectro Raman da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂ depositada em silício..52

- Figura 5.2. Difractogramas das sínteses analisadas. As posições angulares dos materiais de revestimento estão marcadas com um asterisco (*). 53
- Figura 5.3. Curvas de magnetização em função do campo magnético em temperatura ambiente das sínteses SPION-UC, SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e USPION@SiO₂. 56
- Figura 5.4. Curva ZFC/FC para uma amostra líquida da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂. 57
- Figura 5.5. Curva ZFC/FC para uma amostra depositada em silício da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂ (A). Distribuição das T_b para a mesma amostra (B). 59
- Figura 5.6. Curvas de calibração para análise das sínteses. Curva 1 (R² = 0,98532), curva 2 (R² = 0,99604), curva 3 (R² = 0,98244). 60
- Figura 5.7. Imagens de MRI de dispersões aquosas contendo as nanopartículas das sínteses SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e do agente de contraste Lumirem. Nas aquisições foi utilizado um TR de 1000 ms e TE efetivo de 22.116 ms (A), 51.604 ms (B) e 103.208 ms (C). A Tabela 5.4 define as diluições das amostras rotuladas de A1-A5 (SPION-DCL-NH₂), B1-B5 (SPION-(D/4)CL-NH₂) e L1-L5 (Lumirem). 62
- Figura 5.8. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-UC (esquerda) e SPION-D (direita). 64
- Figura 5.9. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-DCL-NH₂ (esquerda) e SPION-(D/2)CL-NH₂ (direita). 64
- Figura 5.10. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 (esquerda) e SPION-(D/4)CL-NH₂ (direita). 65
- Figura 5.11. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION@SiO₂ (esquerda) e USPION@SiO₂ (direita). 65
- Figura 5.12. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas do agente de contraste Lumirem. 66
- Figura 5.13. Imagens de MRI de dispersões aquosas contendo nanopartículas das sínteses SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e do agente de contraste Lumirem. Nas aquisições foi utilizado um TR de 3000 ms e TI de 70 ms (A), 400 ms (B) e 2500 ms (C). 69

- Figura 5.14. Curvas de intensidade do sinal em função do TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-UC (esquerda) e SPION-D (direita)..... 69
- Figura 5.15. Curvas de intensidade do sinal em função do TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-DCL-NH₂ (esquerda) e SPION-(D/2)CL-NH₂ (direita)..... 70
- Figura 5.16. Curvas de intensidade do sinal em função do TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 (esquerda) e SPION-(D/4)CL-NH₂ (direita). 70
- Figura 5.17. Curvas de intensidade do sinal em função do TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION@SiO₂ (esquerda) e USPION@SiO₂ (direita). 71
- Figura 5.18. Curvas de intensidade do sinal em função de TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas do agente de contraste Lumirem. 71
- Figura 5.19. Gráfico da taxa de relaxação R1 em função da concentração de ferro em mM para as sínteses SPION-UC ($R^2 = 0,98412$), SPION-D ($R^2 = 0,9981$), SPION-DCL-NH₂ ($R^2 = 0,98649$), SPION-(D/2)CL-NH₂ ($R^2 = 0,99569$), SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 ($R^2 = 0,99142$), SPION-(D/4)CL-NH₂ ($R^2 = 0,94768$), USPION@SiO₂ ($R^2 = 0,98049$) e o agente de contraste Lumirem ($R^2 = 0,93965$), esquerda. Gráfico da taxa de relaxação R2 em função da concentração de ferro em mM para as sínteses SPION-UC ($R^2 = 0,99$), SPION-D ($R^2 = 0,98545$), SPION-DCL-NH₂ ($R^2 = 0,99639$), SPION-(D/2)CL-NH₂ ($R^2 = 0,99027$), SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 ($R^2 = 0,99923$), SPION-(D/4)CL-NH₂ ($R^2 = 0,96672$), USPION@SiO₂ ($R^2 = 0,95879$) e o agente de contraste Lumirem ($R^2 = 0,96508$), direita. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Valores dos diâmetros dos núcleos e dos diâmetros hidrodinâmicos das diferentes sínteses.	54
Tabela 5.2. Valores da magnetização de saturação para cada síntese analisada.	56
Tabela 5.3. Valores de concentração de ferro de cada uma das soluções estoque das diferentes nanopartículas.	61
Tabela 5.4. Localizador das amostras no simulador.	62
Tabela 5.5. Valores dos tempos de relaxação T2 e da taxa de relaxação R2.	66
Tabela 5.6. Valores dos tempos de relaxação T1 e da taxa de relaxação R1.	72
Tabela 5.7. Valores das relaxividades e de outros parâmetros físicos e estruturais das sínteses analisadas e do agente de contraste Lumirem.	75

LISTA DE SÍMBOLOS

MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>	
T1	Tempo de Relaxação Longitudinal	s
T2	Tempo de Relaxação Transversal	s
RMN	Ressonância Magnética Nuclear	
RF	Radiofrequência	
\vec{I}	Momentum angular total	
\vec{L}	Momento angular orbital	
\vec{S}	Momento angular intrínseco	
μ	Momento magnético	
γ	Razão Giromagnética	Hz/T
V	Volume	m ³
M	Magnetização nuclear	
ω_0	Frequência Angular	
B ₀	Campo Magnético Externo Aplicado	T
M _Z	Magnetização longitudinal	
M _{XY}	Magnetização transversal	
N _P	Número de Spins Alinhados Paralelos a B ₀	
N _{AP}	Número de Spins Alinhados Antiparalelos a B ₀	
K	Constante de Boltzmann	J/K
T	Temperatura	K
ΔE	Diferença de Energia	J
FID	<i>Free Induction Decay</i>	
M ₀ \vec{z}	Magnetização Nuclear Líquida Resultante	
ΔB	Variação de Campo Magnético Local	T
T2*	Tempo de Relaxação T2 Estrela	s
TR	Tempo de Repetição	s
TE	Tempo de Eco	s
N(H)	Número de prótons móveis	
SI	<i>Signal Intensity</i>	
TE	Tempo de Eco	s
TI	Tempo de Inversão	s

Gd	Gadolínio	
FSN	Fibrose Sistêmica Nefrogênica	
Fe ₂ O ₃	Maguemita	
Fe ₃ O ₄	Magnetita	
PVA	Álcool Polivinílico	
PMMA	Poli (Metacrilato de Metilo)	
PEG	Poli (Etileno-Glicol)	
PLGA	Poli (Ácido Co-Glicólico)	
PVP	Polivinilpirrolidona	
PAA	Poli (Ácido Acrílico)	
SPIO	<i>Superparamagnetic Iron Oxide</i>	
PSPIO	<i>Polydispersive Superparamagnetic Iron Oxide</i>	
USPIO	<i>Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide</i>	
MION	<i>Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticle</i>	
CLIO	<i>Cross-Linked Iron Oxide</i>	
CLIO – NH ₂	<i>Aminated Cross-Linked Iron Oxide</i>	
TEOS	Tetraetilortossilicato	
τ_N	Tempo de Relaxação de Néel	s
τ_0	Fator Pré-exponencial	
τ_B	Tempo de Relaxação Browniano	s
η	Viscosidade Dinâmica	
V _H	Volume Hidrodinâmico da Nanopartícula	
r ₁	Relaxividade Longitudinal	(mMs) ⁻¹
r ₂	Relaxividade Transversal	(mMs) ⁻¹
[C]	Concentração Molar	mol/L
MAR	<i>Motional Averaging Regime</i>	
τ_D	Tempo de Correlação Translacional	
D	Constante de Difusão	
R	Distância mínima entre a molécula de água e a nanopartícula	
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	
DRX	Difração de Raios-X	
SDR	<i>Static Dephasing Regime</i>	
h	Constante de Planck	J.s

K	Constante de Anisotropia	J/m ³
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul	
UV-Vis	Ultravioleta-Visível	
λ	Comprimento de Onda	m
R1	Taxa de Relaxação Transversal	Hz
R2	Taxa de Relaxação Longitudinal	Hz

RESUMO

ROCHA, Maximiliano. **Relaxividade de Nanopartículas de Óxido de Ferro com Diferentes Recobrimentos em Equipamentos Clínicos de Ressonância Magnética**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2018. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

No presente estudo, algumas características físicas e propriedades de relaxação magnética nuclear de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com diferentes recobrimentos e sintetizadas em nossos laboratórios foram investigadas. Obtiveram-se oito sistemas de nanopartículas, sendo um destes sistemas com um grupo fluoróforo ligado (Cy5.5). Análises de espectroscopia Raman e difração de raios-X demonstraram que o óxido de ferro em questão é a magnetita. As medidas de magnetização revelaram comportamento superparamagnético das nanopartículas, devido à ausência de histerese das mesmas, e uma magnetização de saturação variando entre 3,8-61,6 emu/g. A concentração de ferro de cada síntese foi obtida por espectrofotometria UV-Vis e relaxometria. Os resultados obtidos variaram entre 0,46-11,2 mg/mL. Medidas de ZFC/FC demonstraram uma distribuição de temperaturas de bloqueio das nanopartículas não excedendo 50 K. Soluções aquosas com diferentes concentrações das nanopartículas e o agente de contraste comercial Lumirem foram preparadas para se obter os tempos de relaxação T1 e T2 e as relaxividades r_1 e r_2 . Nessas medidas, as nanopartículas mostraram efeitos de contraste, perturbando a intensidade de sinal e diminuindo os tempos de relaxação T1 e T2. A razão entre as relaxividades (r_2/r_1) variaram entre 3,13-64,14, o que está dentro dos valores dos agentes de contrastes de óxido de ferro comercialmente disponíveis. Conclui-se que as nanopartículas avaliadas nesse trabalho são passíveis de serem utilizadas como agente de contraste do tipo T2.

Palavras-Chaves: imagem por ressonância magnética, nanopartículas magnéticas, agentes de contraste, relaxividade.

ABSTRACT

ROCHA, Maximiliano. **Relaxivity Iron Oxide Nanoparticles with Different Coatings in Clinical Magnetic Resonance Equipment**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2018. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

In the present study, some physical characteristics and nuclear magnetic relaxation properties of iron oxide nanoparticles coated with different coatings and synthesized in our laboratories were investigated. Eight nanoparticle systems were obtained, one of these systems being a linked fluorophore group (Cy5.5). Raman spectroscopy and X-rays diffraction have shown that the iron oxide in question is magnetite. The magnetization measurements revealed superparamagnetic behavior of the nanoparticles due to the absence of hysteresis of the nanoparticles and a saturation magnetization ranging from 3.8-61.6 emu/g. The iron concentration of each synthesis was obtained by UV-Vis spectrophotometry and relaxometry and the results obtained ranged from 0.46-11.2 mg/mL. ZFC/FC measurements showed a distribution of the blocking temperature of the nanoparticles not exceeding 50 K. Aqueous solutions with different concentrations of the nanoparticles and the Lumirem commercial contrast agent were prepared to give the relaxation times T1 and T2 and the relaxivities r_1 and r_2 . In these measurements, the nanoparticles showed contrast effects, disturbing the signal intensity, decreasing the relaxation times T1 and T2. The ratio of relaxivities (r_2/r_1) ranged from 3.13-64.14, which is within the values of the commercially available iron oxide contrast agents. It is concluded that the nanoparticles evaluated in this work are suitable as a T2-type contrast agent.

Key-words: magnetic resonance imaging, magnetic nanoparticles, contrast agents, relaxivity.

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas magnéticas têm sido utilizadas com grande sucesso como blocos básicos em sistemas de diagnóstico e terapia [1]. Dentre as aplicações biomédicas destacam-se a entrega de drogas com alta especificidade molecular [2], contraste em imagens por ressonância magnética (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) [3] e hipertermia no tratamento de tumores [4].

As novas propriedades físico-químicas apresentadas por sistemas nanoestruturados, a grande razão área superficial/volume e a possibilidade de sintonizar a funcionalidade de nano-objetos no nível molecular, estão na base do grande interesse e utilidade das nanopartículas em aplicações diagnósticas ou terapêuticas [5]. Em algumas aplicações biomédicas, as nanopartículas magnéticas formam o núcleo do sistema nanoestruturado e servem para sinalizar a sua localização espacial e sua superfície é recoberta com diferentes grupos moleculares que dão função, desde a simples estabilização do sistema, até propriedades de direcionamento para a estrutura alvo no corpo ou o transporte de fármacos [5].

Em particular, nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro estão entre as mais exploradas para aplicações biomédicas devido à sua capacidade de servir como agente de contraste em MRI via aceleração do tempo de relaxação longitudinal (T1) e do tempo de relaxação transversal (T2) [5, 6]. Diversos tipos de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas já estão em uso clínico como agentes de contraste não específicos como, por exemplo, os compostos Endorem, Feridex e Resovist [6, 7]. Contudo, existe um grande interesse atualmente no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados avançados, que atuem muito além da simples melhoria do contraste em imagens não específicas [8, 9]. Isso se deve à

possibilidade de se anexar múltiplos componentes moleculares ao longo da superfície do núcleo.

Estas partículas, que são capazes de auxiliar no diagnóstico e realizar terapia, são conhecidas como teranósticas e servem como plataformas para o assim denominado imageamento molecular em nanomedicina [10]. De uma maneira ideal, essas partículas atuam no nível molecular e conseguem sinalizar a presença de uma doença antes da sua manifestação anatômica tardia. Essa é uma característica muito importante, principalmente no diagnóstico e no tratamento de doenças como o câncer e pode vir a auxiliar no diagnóstico precoce, minimizando os seus efeitos e maximizando o tratamento [11, 12, 13, 14, 15].

Apesar dos avanços recentes na aplicação de sondas nanoestruturadas baseadas em nanopartículas, nanocápsulas e lipossomas no imageamento molecular e no transporte de compostos terapêuticos [16, 17], essa tecnologia ainda está em fase de testes clínicos [18]. Um melhor entendimento do desempenho como agente de contraste destas sondas se faz necessário.

O principal foco deste trabalho é o de investigar a relaxividade de nanopartículas de óxido de ferro com diferentes recobrimentos em equipamentos clínicos de ressonância magnética. A relaxividade influencia diretamente o desempenho de contraste de nanopartículas de óxido de ferro em imageamento por ressonância magnética. Estudamos os casos de nanopartículas com um núcleo de óxido de ferro (composto por cristais de magnetita), revestidos com diferentes estruturas: dextrana aminada, dextrana não aminada, dextrana reticulada e não reticulada, dextrana funcionalizada com uma molécula fluorófora e recobrimento “casca-núcleo” com SiO_2 (dióxido de silício).

Essa dissertação se encontra organizada em 8 capítulos, incluindo esse capítulo que apresenta uma introdução, com conceitos gerais sobre o assunto trabalhado. No capítulo 2, são traçados o objetivo geral e os objetivos específicos do projeto. No capítulo 3 são apresentados, de uma maneira geral, os princípios físicos de imagens por ressonância magnética, bem como os processos de relaxação envolvidos, e os agentes de contraste utilizados nesse tipo de técnica. No capítulo 4

são apresentados os materiais e métodos utilizados para sintetizar as nanopartículas analisadas, algumas de suas características, processos de caracterização magnética e estrutural, a construção do simulador para as medidas de ressonância e como foram adquiridos os dados de relaxação magnética nuclear. No capítulo 5 são apresentados os resultados e uma discussão a respeito dos mesmos. No capítulo 6 apresentam-se as conclusões do trabalho, no capítulo 7 as propostas para trabalhos futuros e no capítulo 8 as referências bibliográficas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo das propriedades de relaxação magnética nuclear de dispersões aquosas de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas com diferentes recobrimentos, previamente sintetizadas em nossos laboratórios [19, 20].

2.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar propriedades estruturais e magnéticas das diferentes nanopartículas;
- Determinar a relaxividade magnética das nanopartículas em equipamentos de MRI de 1.5 T;
- Investigar o efeito das nanopartículas na alteração do contraste em imagens por MRI de objetos teste (simulador);
- Investigar o efeito dos diferentes recobrimentos e do tamanho das nanopartículas na relaxividade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo é dedicado à revisão de aspectos gerais sobre os princípios básicos de MRI, agentes de contraste e mecanismos moleculares de relaxação. São discutidos aspectos e princípios básicos do fenômeno da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de imagens por ressonância magnética. Esta revisão também aborda as classificações dos tipos de agentes de contraste, suas aplicações e seus mecanismos de relaxação.

3.1. Imagens por Ressonância Magnética Nuclear

O MRI é uma poderosa ferramenta diagnóstica, que tem como base a interação de um forte campo magnético com os núcleos dos átomos de hidrogênio do corpo humano, principalmente aqueles provenientes da gordura e da água. Os núcleos desses átomos têm um momento magnético intrínseco denominado *spin* nuclear, que interage com o forte campo magnético do equipamento. Essa interação faz com que o *spin* se alinhe a esse campo, quando o paciente é posto no equipamento de MRI. Isso cria condições para que se envie ao corpo um pulso de radiofrequência (RF), excitando os spins dos núcleos dos átomos de hidrogênio [21].

Quando os *spins* voltam ao seu estado inicial, emitem uma radiofrequência (RF), ou seja, o corpo do paciente vira um emissor de RF. Esse sinal é coletado, processado e convertido numa imagem ou informação pelo equipamento de MRI [22]. Para que tudo isso ocorra, os *spins* devem entrar em ressonância com a RF emitida pelo equipamento, fenômeno conhecido como ressonância magnética nuclear.

3.1.1. *Spin* e Magnetização Nuclear

O *spin* nuclear \vec{I} é uma característica de todos os núcleos atômicos e representa o momentum angular total de um nuclídeo, composto pela soma entre o momento angular orbital \vec{L} e o momento angular intrínseco de *spin* \vec{S} , como mostra a equação (3.1):

$$\vec{I} = \vec{L} + \vec{S} \quad (3.1)$$

Analogamente a um circuito elétrico fechado, o *spin* gera um momento magnético $\vec{\mu}$, que é sempre paralelo ao momento angular de *spin*. O momento magnético de um nuclídeo é dado pela equação (3.2):

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (3.2)$$

Nessa equação, γ é a razão giromagnética, característica de cada núcleo. O núcleo de hidrogênio, com seu único próton, tem um número quântico de *spin* igual a $\frac{1}{2}$, portanto, temos que um próton do hidrogênio tem dois estados de energia de *spin*, $-1/2$ e $+1/2$ [23].

Para átomos com número atômico e número de massa par, os momentos magnéticos vão se cancelando aos pares, portanto, não são propícios ao MRI. Para que ocorra a RMN, deve haver, dentro do núcleo atômico, um momento magnético resultante não nulo. Além disso, adotando-se um volume V do material que tem muitos núcleos ou *spins*, tem-se que a soma dos momentos magnéticos nucleares individuais $\vec{\mu}_i$ forma um vetor resultante \vec{M} , denominado magnetização nuclear, de acordo com a equação (3.3):

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu}_i \quad (3.3)$$

Devido à agitação térmica, os momentos magnéticos dentro de um determinado volume específico do corpo humano (temperatura média de $36,5$ °C),

estão aleatoriamente distribuídos, portanto a magnetização é nula [22]. Sob a influência de um campo magnético externo considerável (1,5 T), os momentos magnéticos dos prótons de hidrogênio irão se orientar paralelamente (menor energia) ou antiparalelamente (maior energia), em relação ao campo magnético externo aplicado, resultando em uma magnetização não nula.

Além do alinhamento, a magnetização líquida \vec{M} , precessiona em torno do campo magnético externo aplicado B_0 . A frequência da precessão ω_0 é dada pela equação de Larmor (3.4):

$$|\omega_0| = \gamma \cdot |B_0| \quad (3.4)$$

Nessa equação γ vale, para o núcleo de hidrogênio, 42,58 MHz/T [22]. A frequência da onda de RF emitida pelo equipamento do MRI para excitar os núcleos dos átomos de hidrogênio, ou seja, para ocorrer o processo de RMN, deverá ter a mesma frequência de precessão destes núcleos. Devido à inclinação do *spin* de um próton precessionando, a magnetização pode ser separada em duas componentes, uma componente longitudinal ao campo (\vec{M}_z) e uma componente transversal ao campo (\vec{M}_{xy}). A componente transversal da magnetização acaba posicionando-se em todas as direções e cancelando-se, restando apenas a componente longitudinal, responsável pelo sinal de MRI.

A distribuição dos *spins*, paralelos (*spin up*) ou antiparalelos (*spin down*), em um volume macroscópico de tecido exposto a um campo magnético externo, é regida pela distribuição de Boltzmann (3.5):

$$\frac{N_P}{N_{AP}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}, \quad (3.5)$$

onde N_P é o número de *spins* alinhados paralelamente ao campo magnético externo, N_{AP} é o número de *spins* alinhados antiparalelamente ao campo magnético externo aplicado, k é a constante de Boltzmann ($k = 1,3805 \times 10^{-23}$ joule/kelvin), T é a temperatura absoluta em kelvin e $\Delta E = \left(\frac{h}{2\pi}\right)\gamma B_0$ é a diferença de energia entre o

estado *up* e o estado *down* dos *spins*. Como ΔE é muito pequeno, N_P é muito próximo de N_{AP} . Em um campo de 1,5 T, aproximadamente 5 spins excedentes em 1 milhão (5 ppm) estarão no estado de menor energia (*spin up*), ou seja, somente esta fração será responsável pelo sinal detectável no MRI [22].

3.1.2. Sinal de Ressonância Magnética

Para haver a detecção do sinal no MRI, a magnetização nuclear líquida resultante \vec{M}_{0z} não pode estar no mesmo sentido que o campo magnético externo. Aplicando-se um pulso de RF exatamente com a frequência de Larmor, a magnetização nuclear pode ser inclinada para fora do eixo longitudinal, como mostra a figura 3.1, produzindo uma componente transversal ao campo (\vec{M}_{xy}), inicialmente coerente, implicando em um sinal detectável [24].

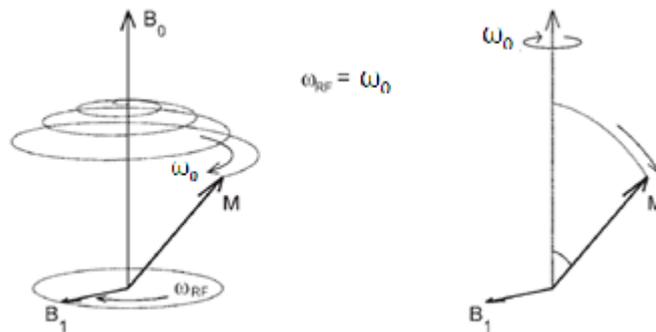


Figura 3.1. Movimento da magnetização \vec{M} no referencial do laboratório, quando uma RF (B_1) é aplicada a uma frequência exatamente igual à frequência de Larmor do núcleo, $\omega_{RF} = \omega_0$. A magnetização nuclear \vec{M} gira para um plano transversal ao campo magnético externo aplicado B_0 (esquerda). Em um referencial que gira na frequência de Larmor, B_1 parece estacionário (direita).

[Adaptado de 24].

Quando o pulso de RF muda a orientação do vetor magnetização para um plano transversal, ele é denominado pulso de 90° . Quando o pulso de RF muda a orientação do vetor magnetização de forma que ele continue na mesma direção, mas em sentido contrário, o pulso é denominado pulso de 180° ou pulso de inversão. Esse pulso tem o dobro da intensidade ou o dobro da duração de tempo

do que um pulso de 90° . A figura 3.2 demonstra os processos dos pulsos de 90° , 180° e um pulso intermediário denominado *partial flip*.

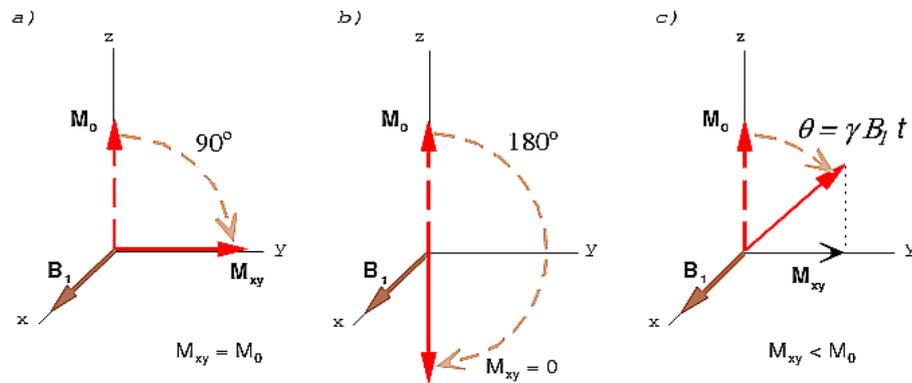


Figura 3.2. Desenho esquemático dos efeitos de diferentes pulsos de RF na magnetização a) Pulso de 90° . b) Pulso de 180° . c) *Partial flip*, pulso entre 0° e 90° . [25].

3.1.2.1. Sinal FID (Free Induction Decay) e Processos de Relaxação

Após o pulso de 90° , a magnetização, agora no plano transversal, induz nos enrolamentos da bobina de RF uma tensão alternada, enquanto os *spins* estiverem precessionando em fase. Quando o pulso de 90° é encerrado, devido a interações *spin-spin*, o sinal não persiste durante muito tempo e a coerência na fase dos *spins* é perdida, correspondendo a uma atenuação da magnetização transversal \vec{M}_{xy} , como mostra a figura 3.3 [24].

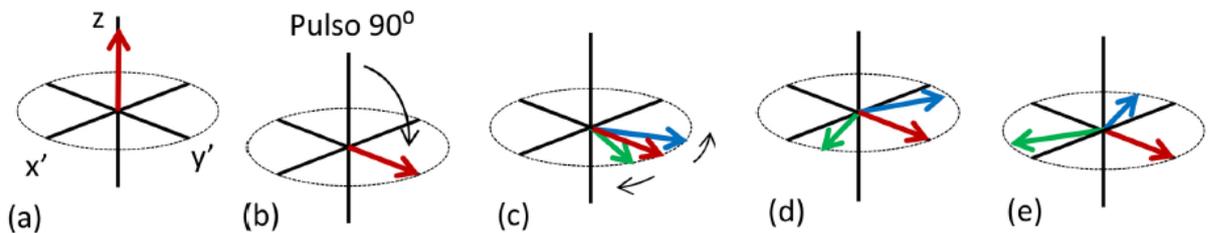


Figura 3.3. a) Diagrama vetorial da magnetização ao longo do eixo z. b) Rotação da magnetização para o plano transversal após a aplicação do pulso de RF de 90° . c) Início do processo de defasagem dos spins individuais. d) Decaimento da magnetização transversal devido à defasagem dos spins individuais. e) Completo decaimento da magnetização transversal. [Adaptado de 26].

Além disso, os núcleos acabam perdendo energia para os seus arredores, resultando em uma recuperação da magnetização longitudinal, para o seu valor de equilíbrio (interação *spin-rede*). Esses processos são denominados de relaxação longitudinal (T1) e relaxação transversal (T2). Embora esses processos limitem o tempo de aquisição de dados, eles são utilizados para produzir contraste em diferentes tecidos no MRI [24]. O formato do sinal induzido, ou sinal FID (do inglês, *Free Induction Decay*), é a de uma onda senoidal amortecida [22], como mostra a figura 3.4.

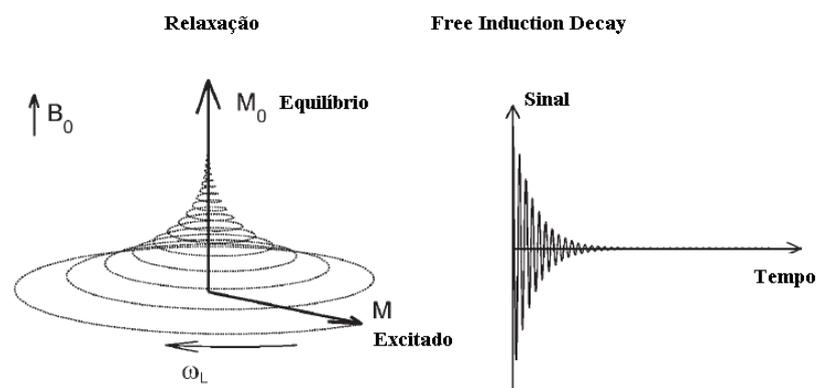


Figura 3.4. Magnetização da rede \vec{M} rotacionando ao redor de B_0 na frequência de Larmor e sua consequente relaxação (esquerda), produzindo uma tensão oscilante em uma bobina de RF (direita). [Adaptado de 24].

O termo relaxação se refere aos *spins* voltando para o seu estado de menor energia ou, simplesmente, voltando para o seu estado de equilíbrio. O tempo necessário para a magnetização longitudinal recuperar 63% do seu valor inicial após um pulso de 90° é denominado tempo T1 [22, 24]. Como a relaxação longitudinal é causada pela interação entre o núcleo e o seu ambiente, os valores de T1 podem variar de acordo com a molécula na qual aquele determinado núcleo está ligado, ou com o tipo de tecido ao qual o núcleo pertence. Isso equivale dizer que a relaxação T1 é uma propriedade do material. Por exemplo, o T1 da água dos tecidos tende a ser mais longo em fluidos corporais, tais como o sangue e líquido cefalorraquidiano, do que em tecidos mais densos, tal como a matéria branca do cérebro [24].

A equação que descreve o retorno da magnetização para o eixo longitudinal é uma solução da equação de Bloch [21] para a dinâmica dos *spins* no processo de

RMN. Resolvendo essa equação em relação ao tempo, demonstra-se que \vec{M}_z tem um crescimento exponencial, caracterizado pela constante de tempo T1, como mostra a equação (3.6):

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) + M_z(0)e^{-\frac{t}{T_1}} \quad (3.6)$$

Nessa equação M_z é o valor da magnetização longitudinal, M_0 é a magnetização de equilíbrio e $M_z(0)$ é o valor da magnetização longitudinal logo após a aplicação do pulso de RF.

A equação que descreve o decaimento da magnetização no plano transversal também é uma equação exponencial, só que desta vez decrescente e caracterizada pela constante de tempo T2 (3.7):

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}}, \quad (3.7)$$

onde T2 indica o tempo necessário para que a magnetização no plano transversal atinja 37% do seu valor inicial [22].

Outro fator determinante para a defasagem dos spins no plano transversal são as não homogeneidades do campo magnético ocasionado por, muitas vezes, imperfeições no magneto do MRI e pela própria magnetização do paciente. Portanto, é conveniente definir outra constante de tempo, denominada T2* [23]. O processo T2* é mais rápido que o processo T2, e as duas constantes de tempo são relacionadas pela equação (3.8):

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B, \quad (3.8)$$

onde ΔB é a variação da intensidade do campo magnético devido a não uniformidades no campo.

3.1.3. Manipulação do Contraste

A manipulação do contraste no MRI em imagens convencionais é realizada principalmente por dois parâmetros que podem ser ajustados pelo operador, o tempo de repetição (TR) e o tempo de eco (TE) [23]. Esses parâmetros, em conjunto com os elementos intrínsecos de contraste (os tempos de relaxação T1 e T2 e o número de prótons móveis N(H)), permitem um controle fino do sinal na imagem.

Por definição, tempo de repetição é o tempo que leva para repetir uma sequência de pulsos. Tempo de eco é o tempo no qual a medida do sinal de MRI é realizada [23].

A intensidade do sinal (SI), no MRI, utilizando-se uma sequência *spin echo* é dada pela equação (3.9):

$$SI = N(H)(e^{-\frac{TE}{T2}})(1 - e^{-\frac{TR}{T1}}) \quad (3.9)$$

Observando essa equação, quanto maior o valor de TR, mais o segundo termo da equação vai se aproximando de um, ou seja, TR longo reduz o efeito do tempo T1. Por outro lado, se o TR escolhido é suficientemente curto, o sinal de cada tecido dependerá consideravelmente de seus valores T1 [23, 24].

Observando a equação da intensidade do sinal no MRI novamente, pode-se perceber que se o TE é muito curto, a primeira exponencial se aproxima de um, e a intensidade do sinal fica dependente apenas do segundo termo, reduzindo o efeito de T2 no contraste. Para o efeito de T2 ser preponderante no contraste, TE deverá ser relativamente longo [23, 27].

Outra maneira de ponderar a imagem no MRI é pela densidade de prótons N(H). Nesse tipo de ponderação, o volume analisado que tiver a maior densidade de prótons será o que dará o maior sinal na imagem, portanto, é o que aparecerá mais claro. Para que isso ocorra, TR deverá ser longo e TE deverá ser curto, de forma que os dois termos entre parênteses da equação (3.9) sejam próximos a um. Nesse

caso, o sinal fica inteiramente dependente do número de prótons móveis em cada tecido.

3.2. Agentes de Contraste em MRI

Agentes de contraste são compostos químicos que manipulam o contraste em MRI, delineando estruturas de importância clínica [28]. Ao contrário de contrastes de outras técnicas de imagem, tais como tomografia computadorizada ou tomografia por emissão de pósitrons, no MRI eles não são visualizados diretamente na imagem. Ao invés disso, seus efeitos nos tempos de relaxação T1 e T2 dos prótons vizinhos e, conseqüentemente, no sinal do MRI, são observados [29]. Mesmo o efeito sendo global, a diminuição dos tempos de relaxação será proeminente ou em T1 (agentes de contraste positivos) ou em T2 (agentes de contraste negativos) [29].

3.2.1. Agentes de Contraste à Base de Gadolínio

Os agentes de contraste mais amplamente utilizados para alterar o tempo de relaxação T1 são quelatos orgânicos paramagnéticos que incorporam gadolínio [28]. Embora muito utilizado, esses compostos são altamente tóxicos, e podem ser liberados no corpo por meio de transmetalção, processo que pode ser promovido por cálcio e fosfato ionizados, levando ao acúmulo de gadolínio em ossos, fígado, rins, músculos e baço [30].

Uma variedade de agentes de contraste à base de gadolínio conjugados com macromoléculas foi relatada, e podem ser classificados de acordo com a posição do íon gadolínio no composto. O agente de contraste mais conhecido é o Gd-DTPA (Magnevist®, ácido gadopentético) [28], agente de contraste extracelular iônico, utilizado para diagnóstico de lesões intracranianas, na cabeça, pescoço e no corpo, com exceção do coração [31], tendo como principal desvantagem o aumento do risco de desenvolvimento de fibrose sistêmica nefrogênica (FSN), em pacientes que tenham histórico de problemas renais [30, 31]. Outros agentes de contraste a base de complexos de gadolínio comercialmente disponíveis são: Gd-DOTA (Dotarem®), Gd-HP-DO3A (Prohance®), Gd-DTPA-BMA (Omniscan®), Gd-BOPTA

(Multihance®), Gd-EOB-DTPA (Eovist®/Primovist®), Gd-DO3A-butrol (Gadovist®) e Gd-DTPA-BMEA (OptiMARK®) [32].

Dependendo da aplicação, a macromolécula adicionada ao gadolínio poderá aprimorar o sinal e aumentar o tempo de retenção na circulação sanguínea (macromoléculas com alto peso molecular), o que pode ser favorável dependendo do tipo de exame a ser realizado ou desfavorável do ponto de vista toxicológico, já que um aumento no tempo de circulação do agente de contraste pode contribuir com a liberação de gadolínio no organismo [32].

A maioria dos agentes de contraste a base de gadolínio são contraindicados em pacientes com insuficiência renal [30, 33, 34, 35], para exames pediátricos [33, 34], para gestantes e/ou em mulheres em período de amamentação [30, 33, 34, 35] e pacientes que foram submetidos recentemente, ou que serão submetidos, a um transplante de fígado [33].

3.2.2. Agentes de Contraste à Base de Óxido de Ferro

Os agentes de contraste utilizados para afetar mais proeminentemente o tempo de relaxação T2 são nanopartículas magnéticas que consistem basicamente de um núcleo de óxido de ferro, composto por cristais de maguemita (Fe_2O_3) ou magnetita (Fe_3O_4) [36, 37], principalmente ligados com três diferentes grupos funcionais: fosfatos, sulfatos ou carboxilatos [37].

Para revestir as nanopartículas são utilizados tanto materiais orgânicos (por exemplo, polímeros), como inorgânicos (metais e óxidos). Esses materiais previnem a aglomeração das nanopartículas, reduzem a toxicidade, alteram a farmacocinética e a biodistribuição e abrem o caminho para a posterior funcionalização da nanopartícula [37]. Os mais utilizados são os polímeros, incluindo a dextrana, o álcool polivinílico (PVA), a quitosana, poli (metacrilato de metila) (PMMA), poli (etileno-glicol) (PEG), poli (ácido co-glicólico) (PLGA), polivinilpirrolidona (PVP) e poli (ácido acrílico) (PAA) [37].

Nanopartículas magnéticas são divididas em três categorias: SPIO oral (do inglês, *superparamagnetic iron oxide*), com um diâmetro hidrodinâmico médio (diâmetro que inclui o revestimento do núcleo do óxido de ferro), de 300 nm a 3,5 μm , SPIO polidisperso (PSPIO, do inglês *polydisperse superparamagnetic iron oxide*), com um diâmetro hidrodinâmico médio de 50 a 150 nm e SPIO ultrapequeno (USPIO, do inglês *ultrasmall superparamagnetic iron oxide*), com um diâmetro hidrodinâmico menor que 50 nm. Existem ainda duas subcategorias dentro da categoria USPIO, denominadas MION (do inglês, *monocrystalline iron oxide nanoparticles*) e CLIO (*cross-linked iron oxide*). A subcategoria MION se refere às nanopartículas que têm como núcleo magnético um material monocristalino. A subcategoria CLIO é derivada da MION, e são nanopartículas que consistem de um polissacarídeo reticulado ligado ao núcleo magnético da nanopartícula [37]. Se este polissacarídeo for aminado, passa a ser denominado CLIO-NH₂ [19, 29]. Um exemplo de CLIO-NH₂ são nanopartículas de magnetita recobertas com dextran reticuladas com epícloridrina e aminadas [19, 29], como representado na figura 3.5.

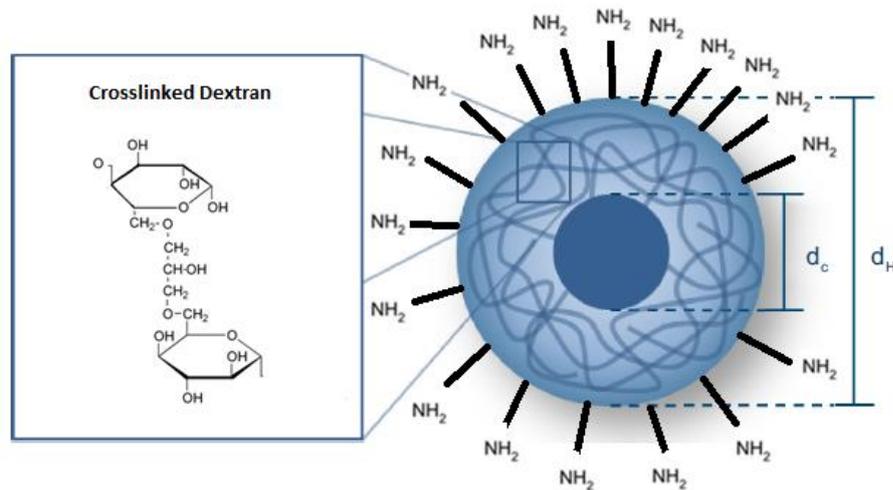


Figura 3.5. Representação de uma nanopartícula de óxido de ferro do tipo CLIO-NH₂. O núcleo magnético (d_c), é revestido com dextran reticulado formando a nanopartícula com diâmetro hidrodinâmico d_H . [Adaptado de 38].

Além dos recobrimentos poliméricos naturais, as nanopartículas também podem ser revestidas com o material inorgânico de sílica. A sílica é geralmente

escolhida por formar facilmente partículas *core-shell*, com elevada estabilidade. Moléculas como proteínas, corantes, entre outros, podem subseqüentemente ser ligadas covalentemente a uma superfície da sílica funcionalizada e utilizada em diferentes aplicações [39].

Um método de síntese bastante utilizado na produção de materiais nanoestruturados inorgânicos e híbridos de sílica é um método conhecido como processo sol-gel. Nesse processo, ocorre a transição de uma dispersão de partículas coloidais em um líquido para o sistema em gel, formando um sistema gel polimérico. Em qualquer processo sol-gel, primeiro é necessário selecionar o tipo de precursor, capaz de originar diferentes composições de géis. Esse tipo de síntese pode ser realizado a partir de dois tipos de precursores: sais de metais alcalinos ou alcóxidos. Dentre os alcóxidos mais utilizados, destaca-se o tetraetilortossilicato (TEOS) [46].

O gel é formado por ligações cruzadas de cadeias poliméricas, resultantes da hidrólise, condensação dos precursores em solução. O método Stöber foi a primeira síntese de nanopartículas de sílica pela reação de hidrólise e condensação de organoalcóxissilanos em solução alcoólica e a amônia como catalisador, obtendo nanoesferas de sílica com uma distribuição de tamanho bastante homogênea [45]. A figura 3.6 mostra um esquema simplificado da síntese de nanopartículas Fe_3O_4 , estabilizadas com íons citrato, seguidas de silanização da superfície via método de Stöber.

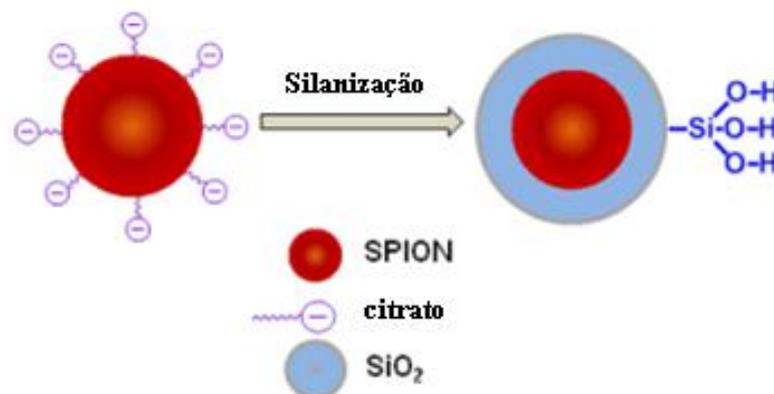


Figura 3.6. Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com óxido de silício do tipo *core-shell* [20].

As nanopartículas do tipo SPIO oral são tipicamente administradas tanto por via oral, quanto por via retal. Um agente de contraste clinicamente aprovado que se encaixa nessa categoria é o AMI-121 (Lumirem-Gastromark). O Lumirem (Europa/Brasil) é um agente de contraste fabricado pelo laboratório Patheon France e importado para o Brasil pela Guerbet Produtos Radiológicos Ltda. Composto por um núcleo de óxido de ferro de aproximadamente 10 nm de diâmetro revestido com sílica, com concentração de 0,1750 mg de ferro por mL do agente de contraste, é uma solução utilizada por via oral, eficaz na ressonância magnética gastrointestinal e no delineamento das estruturas normais e patológicas do intestino, tendo como alvo o sistema reticuloendotelial [37]. Com o revestimento, o tamanho hidrodinâmico total da nanopartícula fica em torno de 300 nm.

3.3. Processos de Relaxação em Nanopartículas Magnéticas

O tempo de relaxação de uma nanopartícula magnética é essencialmente o tempo necessário para reverter o momento magnético de um estado de equilíbrio para outro. Esta reversibilidade é dada principalmente por flutuações térmicas, quando a energia térmica é suficientemente grande para superar a energia de barreira (energia de anisotropia) promovida pela anisotropia magnética da partícula [40]. A anisotropia magnética da partícula é dependente da sua composição e de sua estrutura cristalográfica [7]. Além disso, para uma nanopartícula magnética ser considerada superparamagnética, a relaxação do momento magnético da nanopartícula deve ser mais rápida que o tempo de medida.

Quando nanopartículas superparamagnéticas estão contidas em um líquido, há dois mecanismos de relaxação ocorrendo ao mesmo tempo: a relaxação de Néel e a relaxação rotacional Browniana [40]. A relaxação de Néel se refere à relaxação do momento magnético eletrônico global de um cristal superparamagnético, e seu comportamento exponencial depende do volume da nanopartícula, como mostra a equação (3.10):

$$\tau_N = \tau_0 e^{KV/k_B T}, \quad (3.10)$$

onde V é o volume da partícula, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra e K é a constante de anisotropia magnetocristalina que, para a maioria dos óxidos de ferro e para nanopartículas não interagentes, tem um valor de 1×10^5 erg/cm³ [41, 42]. O fator pré-exponencial τ_0 é uma constante que depende de diversos parâmetros da partícula, tais como volume, energia de anisotropia, temperatura, etc [40]. Para a magnetita, τ_0 é aproximadamente igual a 10^{-9} s [7]. Para uma nanopartícula de magnetita esférica de raio 8 nm, $\tau_N \sim 0,2$ μ s, já para uma nanopartícula de magnetita de raio 16 nm, $\tau_N \sim 84$ anos. Isso mostra que pequenas variações no volume de uma nanopartícula causam mudanças significativas em seu tempo de relaxação.

Em um líquido, também ocorrem colisões entre as nanopartículas e as moléculas do solvente, o que faz com que a partícula gire aleatoriamente. O tempo de giro é caracterizado pelo tempo de relaxação rotacional Browniano, dado pela equação (3.11):

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T}, \quad (3.11)$$

onde η é a viscosidade dinâmica do solvente e V_H é o volume hidrodinâmico da nanopartícula [40]. É importante destacar que, para partículas em estado superparamagnético, a relaxação de Néel será muito mais rápida que a Browniana, ficando esta desprezível.

Embora a relaxação de Néel não diga respeito à relaxação magnética nuclear dos prótons das moléculas de água no processo de RMN, essa relaxação do momento magnético das nanopartículas irá influenciar nas taxas de relaxação desses prótons [7].

3.4. Relaxividade de Agentes de Contraste em MRI

A habilidade de um agente de contraste de modificar o tempo T1 e o tempo T2 é caracterizada pelas relaxividades r_1 e r_2 , respectivamente [29]. A relaxividade é

definida como o aumento da taxa de relaxação do solvente (água), induzida por 1 mM do íon ativo de um agente de contraste. A relaxividade é obtida pela equação (3.12):

$$\frac{1}{T_{i(\text{obs})}} = \frac{1}{T_{i(\text{d})}} + r_i[C]; \quad i = 1, 2 \quad (3.12)$$

Nessa equação $1/T_{i(\text{obs})}$ é a taxa de relaxação global do solvente na presença do agente de contraste, $1/T_{i(\text{d})}$ é a taxa de relaxação do sistema antes da adição do agente de contraste, C é a concentração do íon - ou do núcleo magnético - presente no agente de contraste, em mM e r_i é a relaxividade em Hz/mM [5, 29].

Um parâmetro utilizado para classificar os agentes de contraste é a razão r_2/r_1 . Esta razão varia entre 1 e 2 para quelatos paramagnéticos (agentes de contraste T1), e pode chegar até 50 para colóides superparamagnéticos (agentes de contraste T2) [29].

3.4.1. Mecanismos de Relaxação Magnética Nuclear

Os mecanismos de relaxação magnética nuclear acontecem quando ocorre uma interação entre o momento magnético eletrônico do agente de contraste e o momento magnético muito menor dos prótons que o circundam. Quando este agente de contraste interage com um campo magnético externo aplicado, seus momentos magnéticos se alinham com esse campo externo e isso ocasiona flutuações no campo magnético local experimentado pelos prótons das moléculas de água que circundam o agente de contraste [29].

Há três contribuições para a relaxação do próton: relaxação da esfera interna (*inner sphere*), relaxação da segunda esfera (*second sphere*) e relaxação da esfera externa (*outer sphere*) [5, 29]. A relaxação da esfera interna lida diretamente com a troca de energia entre os elétrons e os prótons localizados na primeira esfera de hidratação do agente de contraste e é dominada por acoplamento dipolar (dipolo-dipolo) e escalar dos spins (spin-spin direto) [5]. O acoplamento spin-spin se origina

quando a orientação do spin de um núcleo vizinho interfere na energia de outro núcleo e causa pequenas variações na localização da ressonância deste último [43]. Para agentes com baixo peso molecular, em torno de metade da relaxividade se deve ao efeito da esfera interna e a outra metade se divide entre o efeito da segunda esfera e o da esfera externa [29]. A figura 3.7 mostra uma representação esquemática dos mecanismos da relaxação para agentes de contraste à base de gadolínio.

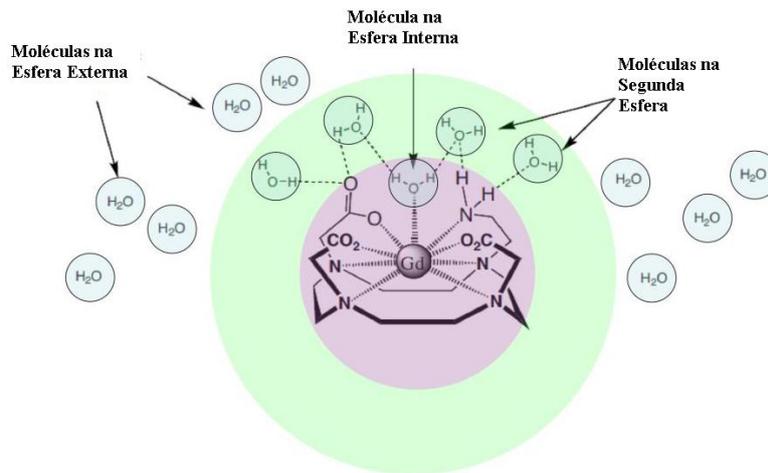


Figura 3.7. Representação esquemática dos mecanismos da relaxação paramagnética para agentes de contraste à base de gadolínio [29].

O círculo rosa representa uma molécula de água acoplada dipolarmente e escalarmente ao íon gadolínio sofrendo, assim, a influência do mecanismo de relaxação da esfera interna. O círculo verde representa moléculas de água ligadas às macromoléculas que revestem o íon sofrendo, assim, a influência do mecanismo de relaxação da segunda esfera. As esferas azuis representam moléculas de água que circundam o gadolínio e as macromoléculas ligadas a ele. Essas moléculas sofrem maior influência do mecanismo de relaxação da esfera externa. Para partículas superparamagnéticas, a contribuição da relaxação pelo mecanismo da esfera interna e da segunda esfera são menores e facilmente negligenciadas se comparadas a contribuição da relaxação pelo mecanismo da esfera externa [5].

3.4.1.1. Mecanismo de Relaxação da Esfera Externa

O mecanismo de relaxação da esfera externa está associado ao movimento dos prótons de água perto dos gradientes do campo magnético local gerado pelo núcleo magnético das nanopartículas, como mostra a Figura 3.8.

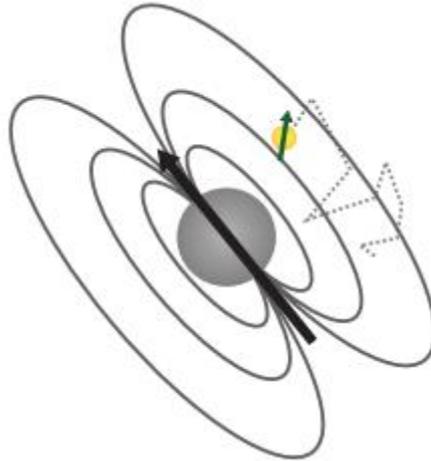


Figura 3.8. Representação de um núcleo da molécula de água (esfera menor), difundindo perto de uma nanopartícula superparamagnética [Adaptado de 40].

A interação entre os spins dos prótons com o momento magnético é de caráter dipolar. As não homogeneidades magnéticas são produzidas pelo campo das nanopartículas superparamagnéticas e as flutuações provêm da difusão do próton e das flutuações do momento magnético superparamagnético devido às relaxações rotacionais de Néel ou Browniana [40].

Quando os prótons das moléculas de água experimentam uma grande variedade de campos magnéticos durante a sua difusão nas vizinhanças das nanopartículas, esses prótons estão em uma condição denominada “condição de Redfield”, ou condição MAR (do inglês, *motional averaging regime*) [40]. Nessa condição, há quatro modelos teóricos que preveem o comportamento das taxas de relaxação dos núcleos das moléculas de água.

O primeiro modelo é o de baixa anisotropia magnética, e é utilizado para descrever as taxas de relaxação quando a concentração das nanopartículas em

meio aquoso é baixa, não há agregação das nanopartículas e a relaxação de Néel é dominante [40]. Nesse modelo, o fator que mais influencia a relaxividade no valor de campo magnético utilizado no MRI clínico é o tempo de correlação translacional (τ_D) [5]. O tempo de correlação translacional é o tempo que uma molécula de água leva para difundir da sua posição para a distância mínima entre ela e o núcleo magnético [44]. Esse tempo leva em conta uma constante de difusão relativa do solvente em relação ao centro magnético (D) e suas distâncias, no momento em que estão mais próximos (R) [5], como mostra a equação (3.13):

$$\tau_D = \frac{R^2}{D} \quad (3.13)$$

O segundo modelo utilizado é o de alta anisotropia magnética, também conhecido como modelo do dipolo rígido. Nesse modelo, a concentração das nanopartículas também deve ser baixa, não deve haver agregação das mesmas e a relaxação Browniana é a dominante [40]. Nesse modelo, a magnetização da nanopartícula tem uma influência na magnitude da relaxividade r_1 de uma maneira proporcional.

Esses dois modelos, embora adequados para prever o comportamento da relaxação longitudinal, não descrevem de uma maneira adequada o comportamento da relaxação transversal, principalmente quando o campo magnético aplicado aumenta. Para resolver esse problema, outro modelo foi proposto, denominado “modelo de ferro trifásico”. Nesse modelo, a nanopartícula é composta, supostamente, de três fases: um núcleo superparamagnético, inclusões antiferromagnéticas no núcleo e uma fase paramagnética [40]. Para a utilização desse modelo, técnicas de caracterização estrutural devem ser empregadas, tais como magnetometria, TEM e DRX, para se ter certeza da estrutura da nanopartícula avaliada.

Em campos magnéticos tendendo ao infinito, a taxa de relaxação longitudinal sempre tende a zero, enquanto a taxa de relaxação transversal converge para um valor denominado “termo secular”, que não depende do campo aplicado [40, 44]. O termo secular resulta da flutuação da componente do campo interno paralelo ao

campo magnético externo B_0 , o que ocasiona mudanças de fase na precessão de Larmor da magnetização do conjunto de prótons que contribuem para a taxa de relaxação transversal [44].

Com um campo magnético alto, a magnetização das nanopartículas está bloqueada ao longo da direção de B_0 , e seus tempos de relaxação, tanto de Néel quanto Browniano, se tornam infinitos, o que leva a uma simplificação dos modelos teóricos anteriores [40]. Com isso, as equações que expressam a taxa de relaxação transversal no modelo de Néel e no modelo Browniano são simplificadas e podem ser expressas em uma lei de escala (do inglês, *scaling law*), no regime MAR, que mostra que a relaxividade r_2 aumenta quadraticamente com o aumento do raio e da magnetização das nanopartículas [40].

Quando o tamanho ou a magnetização de uma nanopartícula aumenta a ponto da molécula de água parecer estática durante a relaxação em comparação à nanopartícula, as propriedades da nanopartícula estão fora do regime MAR. Nesse caso, o regime adotado é o SDR (do inglês, *static dephasing regime*), ou regime estático, onde a taxa de relaxação transversal é independente do tamanho da nanopartícula e é dependente somente da concentração da nanopartícula e do seu momento magnético [40].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse capítulo é dedicado à descrição dos materiais, equipamentos, procedimentos e análises realizadas no desenvolvimento desse trabalho.

4.1. Síntese e Características Físicas das Nanopartículas

As nanopartículas investigadas nesse trabalho foram sintetizadas previamente por meio de diferentes rotas investigadas em trabalhos anteriores do nosso grupo [19, 20]. As sínteses estabilizadas com citrato e com revestimento de dextran foram preparadas pelo método da coprecipitação. As nanopartículas de óxido de ferro revestidas de óxido de silício (SiO_2) foram preparadas por hidrólise e condensação de tetraetil ortossilicato (TEOS), utilizando o processo sol-gel por Stöber [45, 46, 47, 48, 49].

Amostras de oito sínteses de nanopartículas constituídas por um núcleo de óxido de ferro e diferentes recobrimentos foram preparadas para a análise da relaxação magnética nuclear, como disposto na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resumo das principais características das nanopartículas analisadas.

Síntese	Recobrimento
SPION-UC	Sem recobrimento. Estabilizada com citrato e cloreto de sódio
SPION-D	Dextran não reticulado e não aminado
SPION-DCL-NH₂	Dextran reticulado e aminado
SPION-(D/2)CL-NH₂	Dextran reticulado e aminado, com 50% menos dextran
SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5	Dextran reticulado e aminado + fluoróforo
SPION-(D/4)CL-NH₂	Dextran reticulado e aminado, com 75% menos dextran
SPION@SiO₂	Óxido de Silício
USPION@SiO₂	Óxido de Silício

A síntese SPION–UC são nanopartículas de Fe_3O_4 sem revestimento, somente estabilizadas com citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de sódio. Na síntese SPION–D o núcleo foi revestido com dextran T10, $(\text{H}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_x\text{OH})$, com peso molecular de 10 kDa, não reticulado e não aminado.

A síntese SPION–DCL– NH_2 são nanopartículas de Fe_3O_4 , onde o núcleo foi revestido com dextran T10, reticulado com epícloridrina ($\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$) e aminado. Nessa síntese, a massa de dextran e de sais de ferro foram iguais e a temperatura de reação foi de 80 °C. Na síntese SPION–(D/2)CL– NH_2 , o núcleo também foi revestido com dextran T10, reticulado com epícloridrina e aminado. Nessa síntese, as massas de sais de ferro utilizadas foram iguais as da síntese SPION–DCL– NH_2 , mas a massa de dextran adicionada foi a metade e a temperatura de reação foi menor (75 °C). A síntese SPION–(D/2)CL– NH_2 –Cy5.5 é a mesma síntese SPION–(D/2)CL– NH_2 , porém funcionalizada com uma molécula fluorófora denominada Cianina 5.5 NHS Ester ($\text{C}_{44}\text{H}_{46}\text{ClN}_3\text{O}_4$), que emite no infravermelho próximo.

Na síntese SPION–(D/4)CL– NH_2 , nanopartículas de óxido de ferro revestidas com dextran T10 foram preparadas com metade da massa de dextran utilizada na síntese SPION–(D/2)CL– NH_2 , com a mesma massa de sais de ferro e temperatura de reação de 78 °C. As sínteses SPION@ SiO_2 e USPION@ SiO_2 , são nanopartículas de óxido de ferro revestidas com SiO_2 . Todas as sínteses foram realizadas no Laboratório de Síntese de Materiais Nanoestruturados (LASINE), da Escola de Ciências da PUCRS.

4.1.1. Determinação da Concentração de Ferro nas Soluções Aquosas

Para se obter a concentração de Fe foram realizadas medidas de absorção óptica ou medidas da taxa de relaxação longitudinal das soluções de nanopartículas.

As medidas de absorção óptica foram feitas no Espectrofotômetro UV-Vis modelo Lambda 35, fabricado pela Perkin Elmer, que pode realizar medidas de absorção óptica na faixa de 190 a 1100 nm de comprimento de onda.

As medidas de absorvância foram utilizadas para quantificar o conteúdo de ferro das sínteses SPION–D, SPION–DCL–NH₂, SPION–(D/2)CL–NH₂, SPION–(D/2)CL–NH₂–Cy5.5 e SPION–(D/4)CL–NH₂. Inicialmente, preparou-se 8 soluções padrão de Fe, em balão volumétrico de 50 mL de capacidade, a partir de solução certificada de 1,0 e 10,0 mg/mL de ferro. Em cada balão volumétrico preparou-se alíquotas de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/mL. Foram utilizadas cubetas descartáveis poliméricas, de caminho óptico de 10 mm.

Em cada cubeta adicionou-se 10 µL da solução padrão com concentração variando entre 0,1 a 8,0 mg/mL, 10 µL de H₂O₂ 3% e 980 µL de ácido clorídrico 6 M totalizando 1,0 mL em cada cubeta, usando-se como branco a mistura entre o peróxido e o ácido clorídrico na proporção dita anteriormente. Homogeneizou-se a solução e aguardou-se cerca de 60 minutos para realizar a leitura no espectrofotômetro. Nesse tempo, ocorre a digestão ácida do composto, liberando Fe⁺³ livre.

Para leitura das absorvâncias, foi utilizado o comprimento de onda $\lambda = 410$ nm. Em seguida, foi construída uma curva de calibração com esses valores de absorvância com as suas respectivas concentrações já conhecidas.

Para a determinação da concentração das amostras contendo as nanopartículas, foram pipetados 10 µL na cubeta e seguiu-se a adição dos reagentes conforme a preparação das amostras padrão. Realizou-se a leitura da absorvância no mesmo comprimento de onda obtendo-se, assim, a concentração.

Para as sínteses SPION–UC e USPION@SiO₂, a concentração de ferro foi determinada medindo a taxa de relaxação longitudinal R1 [50, 51]. As amostras foram digeridas em microondas (MLS-1200 Mega, Milestone), e o valor de R1 das soluções resultantes foi analisado em um relaxômetro de 0,47 T (Minispec mq-20, Bruker), a 37 °C, o que permitiu a determinação da concentração de ferro usando a equação:

$$[\text{Fe}] = (R1_{\text{amostra}} - R1_{\text{diamagnético}}) \times 0.0915 \quad (4.1)$$

onde R1 diamagnético é a taxa de relaxação diamagnética da água (0,36 Hz) e 0.0915 (Hz/mM) é a inclinação da curva de calibração.

4.1.2. Medidas de Magnetização

As medidas de magnetização das soluções de nanopartículas foram realizadas em um magnetômetro de amostra vibrante (VSM – EZ9), no Laboratório de Magnetismo (LAM) do Instituto de Física/UFRGS, com as amostras das sínteses SPION–UC, SPION–DCL–NH₂, SPION–(D/2)CL–NH₂, SPION–(D/2)CL–NH₂–Cy5.5 e USPION@SiO₂ liofilizadas. As medidas foram realizadas num campo máximo de 19000 Oe.

4.1.3. Difração de Raios X (DRX)

As medidas de difração de raios X foram realizadas usando um Bruker D8 Advanced, no Laboratorio de Magnetismo de la Materia, na Universidad de Cantabria (Espanha), trabalhando com uma potência de 40 kV/30 mA, com um tubo de Cu, utilizando-se um comprimento de onda de $\lambda = 1.5418 \times 10^{-10}$ m. A configuração utilizada foi com um conjunto de janelas fixas de 0,5 mm de divergência e antivergência de 0,5 mm com um detector de cintilação (contador de cintilação). Um volume de 80 μ L de cada amostra foi depositado em um suporte de amostra convencional. O espectro foi coletado nos ângulos 2θ , entre 5° e 70° ($\Delta 2\theta = 0,05^\circ$) à temperatura ambiente, com um tempo de integração de 5 s por etapa.

4.1.4. Espectroscopia Raman

O espectro Raman da síntese SPION–(D/4)CL–NH₂ foi obtido no Laboratorio de Magnetismo de la Materia, na Universidad de Cantabria (Espanha), depositando-se as nanopartículas em silício e utilizando um espectrômetro Raman confocal T64000 da Horiba com um monocromador triplo na configuração subtrativa (resolução espectral de 0,6 cm^{-1}). Uma linha de 647,1 nm de um laser Coherent Innova Spectrum 70C Ar⁺-Kr⁺ foi utilizado como fonte de excitação e um CCD refrigerado com nitrogênio (Jobin-Yvon Symphony) foi usado como detector. A

medida foi realizada a temperatura ambiente com uma objetiva de 20X e uma potência do laser de 162 mW. Não foi possível obter o espectro das demais sínteses devido a impossibilidades técnicas.

4.1.5. Medidas ZFC/FC

Medidas magnéticas estáticas em função da temperatura da síntese SPION–(D/4)CL–NH₂ (amostra líquida e depositada em silício), foi obtida no Laboratório de Magnetismo de la Materia, na Universidad de Cantabria (Espanha), utilizando-se um magnetômetro Quantum Design MPMS XL-5 SQUID. Para o estudo magnético, as amostras foram contidas numa cápsula de Teflon selada. O recipiente de Teflon foi medido nas mesmas condições das amostras, antes que as medidas das amostras fossem tomadas, e depois subtraídas do sinal magnético total para se obter os dados magnéticos.

As curvas de Zero Field Cooled (ZFC) e de Field Cooled (FC) foram tiradas entre 5 K e 300 K usando o seguinte protocolo: as amostras foram arrefecidas de 300 K para 5 K em campo magnético zero, então um campo magnético estático de 100 Oe foi aplicado e o M_{ZFC} (magnetização na curva ZFC), foi medido enquanto as amostras estavam aquecendo. Após o último ponto ser medido, as amostras foram novamente arrefecidas até a temperatura basal mantendo o mesmo campo (processo FC); então, os dados de Magnetização vs Temperatura foram medidos para temperaturas crescentes. Novamente, não foi possível obter as curvas das demais sínteses devido a impossibilidades técnicas.

4.2. Construção do Simulador

Um simulador foi construído para a aquisição dos dados de relaxação magnética nuclear. O simulador, construído de espuma, é um disco de 24 cm de diâmetro por 5 cm de altura, com 16 orifícios concêntricos, a 8 cm do centro e um orifício central. Os orifícios concêntricos serviram para alocar seringas de 3 mL com as soluções de nanopartículas e o orifício central para alocar um tubo de centrifugação do tipo falcon de 50 mL, com um buffer salino e/ou água, que serviu

como referência nas medidas de relaxação. A figura 4.1 mostra fotos do simulador construído.

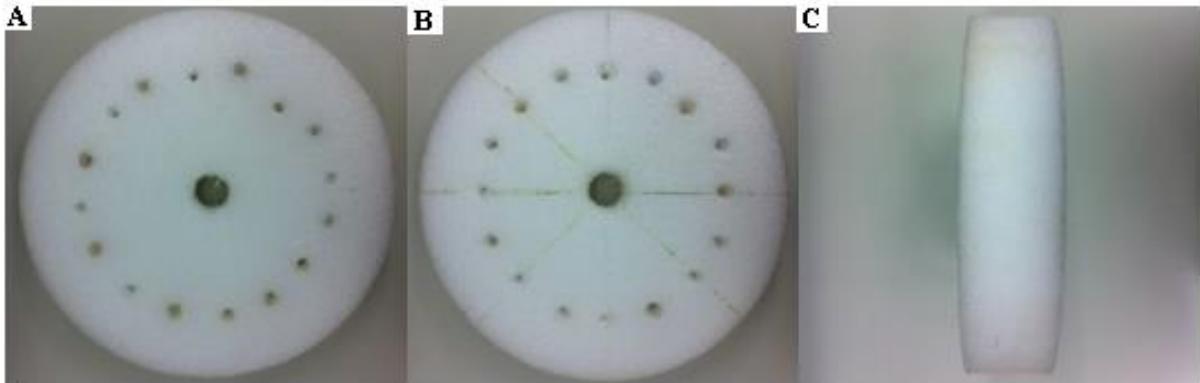


Figura 4.1. Fotos do simulador construído para as medidas de relaxação magnética nuclear. A) Lado superior. B) Lado inferior. C) Lateral.

4.3. Aquisição dos Dados de Relaxação Magnética Nuclear

A análise da relaxação magnética nuclear das nanopartículas foi realizada no Hospital São Lucas da PUCRS, no aparelho de Ressonância Magnética, modelo 450W gem, da GE, com campo de 1,5 T. A Figura 4.2 mostra o simulador no MRI e as imagens geradas.

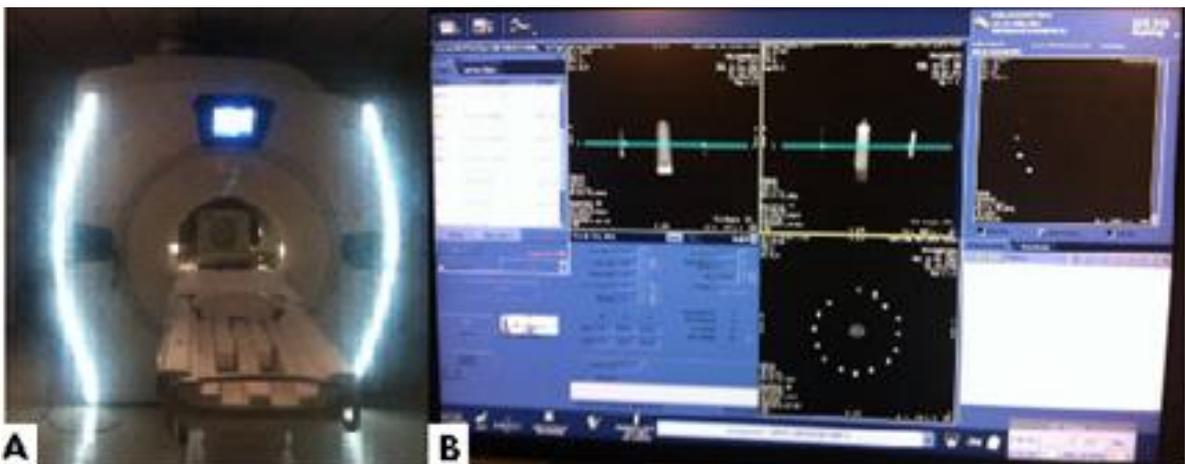


Figura 4.2. A) Simulador instalado no equipamento de MRI. B) Visualização dos dados no console.

Para as sínteses SPION-UC, SPION-D, SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5, SPION-(D/4)CL-NH₂, USPION@SiO₂ e o agente de contraste comercial Lumirem foram utilizadas soluções diluídas com as nanopartículas, em água qualidade Milli-Q, nas seguintes concentrações: C₀/100; C₀/200; C₀/500; C₀/1000; C₀/2000, sendo C₀ a concentração de nanopartículas na solução estoque. Essas amostras diluídas foram colocadas em seringas de 3 mL e dispostas no simulador. Um recipiente com buffer salino de citrato de sódio 20 mM e cloreto de sódio 150 mM, diluído 2000 vezes, no centro, serviu de referência para a análise das sínteses SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5, SPION-(D/4)CL-NH₂ e do agente de contraste Lumirem. Para a análise das sínteses SPION-UC, SPION-D, SPION@SiO₂ e USPION@SiO₂, foi utilizado água qualidade Milli-Q no recipiente central. A síntese SPION@SiO₂ foi primeiramente diluída em 10 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) puro e, logo após, diluída em água qualidade Milli-Q nas mesmas concentrações das sínteses anteriores.

As medidas foram efetuadas com bobina de crânio vascular (Head 24), em três cortes do simulador, usando sequências de *fast spin echo* (FSE), para a obtenção dos valores de T2 e *inversion recovery* (IR), para a obtenção dos valores de T1 das amostras.

Para as sínteses SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e o agente de contraste Lumirem foram utilizados as seguintes condições para a aquisição das imagens de FSE: 4 mm de espessura do corte, 5 mm de espaçamento entre os cortes, tempo de repetição (TR), de 1000 ms, uma matriz de 512×512 pixels, e tempo de eco (TE), variável: 7,4; 10; 14; 18; 25; 35; 50; 75; 100; 150; 200; 250 ms. Para aquisição das imagens de IR, as seguintes condições foram adotadas: 4 mm de espessura de corte, 5 mm de espaçamento entre os cortes, matriz 512×512 pixels, TR de 3000 ms, TE de 20 ms, e tempo de inversão (TI) em: 50, 70, 90, 110, 130, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300, 1600, 1900, 2500 ms.

Para as sínteses SPION-UC e SPION-D, os parâmetros utilizados foram os mesmos da análise das sínteses SPION-DCL-NH₂ e SPION-(D/4)CL-NH₂, com exceção da espessura do corte, que de 4 mm passou para 5 mm; o espaçamento

entre os cortes foi de 5 mm para 15 mm. Para as sínteses SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5, SPION@SiO₂ e USPIO@SiO₂ os parâmetros utilizados foram os mesmos das sínteses SPION-DCL-NH₂ e SPION-(D/4)CL-NH₂, com exceção da espessura do corte, que de 4 mm passou para 2 mm e o espaçamento entre os cortes, que de 5 mm passou para 3 mm. Todos os cortes foram realizados no plano axial, com FOV de 299,98 mm x 299,98 mm.

4.4. Análise das Imagens do MRI

As imagens do MRI foram analisadas com o software ImageJ versão 1.38x. Adotando-se uma ROI de 7 x 7 mm², mediu-se a média do nível de cinza dos pixels de cada uma das seções transversais das seringas contendo a amostra de interesse, para um dos cortes da imagem, para cada um dos tempos de eco e tempos de inversão, e se construíram curvas de intensidade do sinal em função desses tempos, para cada concentração das amostras.

O tamanho do pixel na imagem é de aproximadamente 0,59 mm, o que é muito pequeno se comparado ao diâmetro da seringa utilizada para as medidas de MRI, que foi cerca de 10 mm, o que reduziu os efeitos de volume parcial nas imagens.

Para ajustar as curvas de decaimento e de recuperação do sinal em função do tempo de eco efetivo e do tempo de inversão, foi utilizada a equação do decaimento da magnetização transversal (3.7) e da recuperação da magnetização longitudinal (3.6), com o software KaleidaGraph versão 4.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo serão apresentados os resultados e uma discussão sobre os mesmos.

5.1. Caracterização Estrutural

5.1.1. Raman

Na espectroscopia Raman foi possível observar picos característicos da magnetita, com uma banda principal centrada em 668 cm^{-1} , referente a um modo de estiramento totalmente simétrico dos átomos de oxigênio ao longo das ligações Fe-O (A_{1g}) [52] e uma banda a 306 cm^{-1} , devido a um modo de torção simétrico do oxigênio em relação ao Fe (E_g) [53]. O pico mais intenso é atribuído ao silício, onde as nanopartículas foram depositadas. Os picos característicos da magnetita foram ajustados por uma curva lorentziana. A Figura 5.1 mostra o espectro Raman obtido da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂.

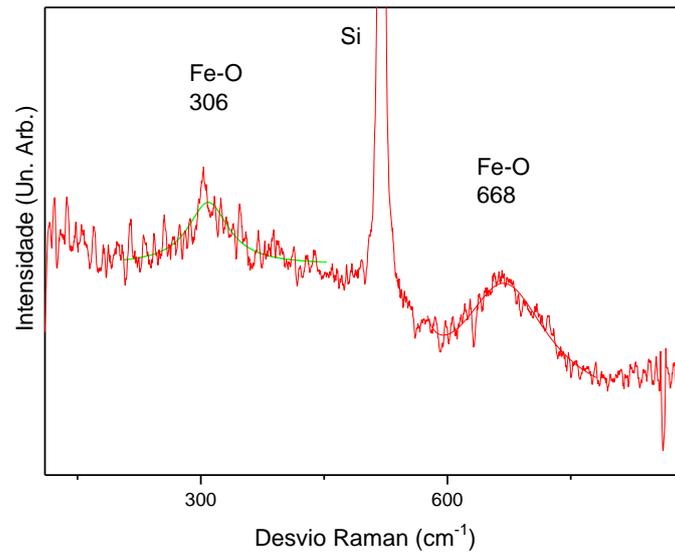


Figura 5.1. Espectro Raman da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂ depositada em silício..

5.1.2. Medidas de Difração de Raios-X

As medidas de difração de raios-X revelam informações estruturais, fase e tamanho aproximado do núcleo cristalino das nanopartículas de óxido de ferro. Nos difratogramas, o padrão de difração mostrou picos em 2θ de aproximadamente 30.3° , 35.6° , 43.3° , 53.8° , 57.2° e 62.7° . Comparando com a carta cristalográfica para a magnetita, PDF n° 19-629 JCPDS, observa-se que as amostras possuem picos correspondentes à estrutura de espinélio inverso da magnetita (Fe_3O_4), representando os planos cristalinos (220), (311), (400), (422), (511) e (440). A Figura 5.2 mostra a comparação entre os difratogramas das diferentes nanopartículas.

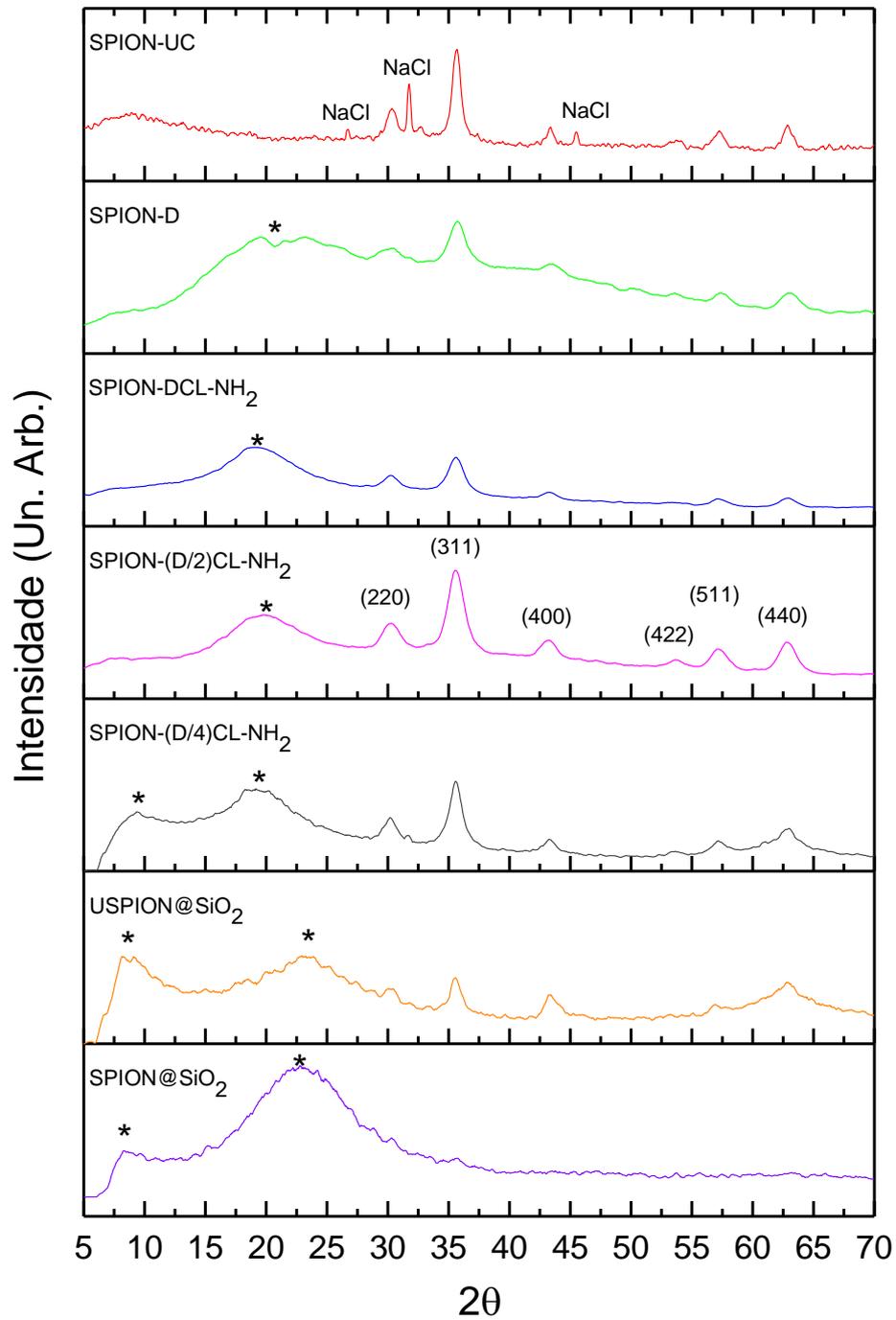


Figura 5.2. Difratogramas das sínteses analisadas. As posições angulares dos materiais de revestimento estão marcadas com um asterisco (*).

Usando dados do pico de maior intensidade (311), o tamanho do cristalito foi estimado de acordo com a equação de Scherrer [54]:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)}, \quad (5.1)$$

em que K é uma constante igual a 0,94 para uma partícula esférica, λ é o comprimento de onda dos raios-X, β é a largura a meia altura (FWHM, do inglês *Full Width at Half Maximum*) do pico e θ é o ângulo de Bragg. Os tamanhos do cristalito, estimados pela Equação 5.1, para as diferentes sínteses variaram entre 6,5 e 11,3 nm e estão dispostos na Tabela 5.1. Também estão dispostos, na Tabela 5.1, os diâmetros hidrodinâmicos e medidas de tamanho por TEM, obtidos em trabalhos anteriores [19, 20].

Tabela 5.1. Valores dos diâmetros dos núcleos e dos diâmetros hidrodinâmicos das diferentes sínteses.

Síntese	Diâmetro do Núcleo (nm) - DRX	Diâmetro do Núcleo (nm) - TEM	Diâmetro Hidrodinâmico (nm) - DLS
SPION-UC	11,3	9,5 ± 1,8	49,4 ± 23,4
SPION-D	6,5	6,6 ± 1,8	11,7 ± 0,9
SPION-DCL-NH₂	6,8	9,3 ± 1,6	16,2 ± 7,4
SPION-(D/2)CL-NH₂	6,5	-	21,8 ± 6,7
SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5	-	-	28,2 ± 6,3
SPION-(D/4)CL-NH₂	8,4	17,4 ± 2,4	48,5 ± 8,9
SPION@SiO₂	-	-	207,2 ± 18,5
USPION@SiO₂	9,5	-	30,4 ± 1,3

As estimativas dos diâmetros dos núcleos obtidos por DRX e TEM são muito próximas entre si, exceto para a síntese SPION-(D/4)CL-NH₂. Isso pode ser atribuído a pouca massa de dextran utilizado na síntese, o que ocasionou um menor revestimento das nanopartículas e uma maior instabilidade coloidal, levando a uma agregação das nanopartículas.

Não foi possível determinar o tamanho de núcleo para a síntese SPION@SiO₂, devido a não definição do pico no plano (311), atribuído ao revestimento de óxido de silício. Na síntese SPION-UC há três picos referentes ao cloreto de sódio (PDF n° 5-628 JCPDS), correspondente ao sal halita, com picos em 2θ de aproximadamente 27.4°, 31.9° e 45.5°, devido ao buffer salino utilizado na síntese. Todas as amostras exibem reflexões para ângulos baixos, devido ao material de revestimento, exceto a síntese SPION-UC.

5.2. Medidas Magnéticas

5.2.1. Curvas de Magnetização

As curvas de magnetização dos diferentes sistemas de nanopartículas analisados apresentaram histerese mínima, com coercividade (H_c) menor ou igual a 22 Oe, o que é um indicativo do comportamento superparamagnético. O valor da magnetização de saturação variou entre 3,8-61,6 emu/g, e é menor do que para a magnetita pura (100-85 emu/g) [55]. Para essa medida, a massa considerada foi de toda a amostra. A Figura 5.3 mostra as curvas de magnetização em função do campo magnético externo, em temperatura ambiente, para amostra das sínteses SPION-UC, SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e USPION@SiO₂. A Tabela 5.2 mostra os valores da magnetização de saturação para todas as sínteses analisadas.

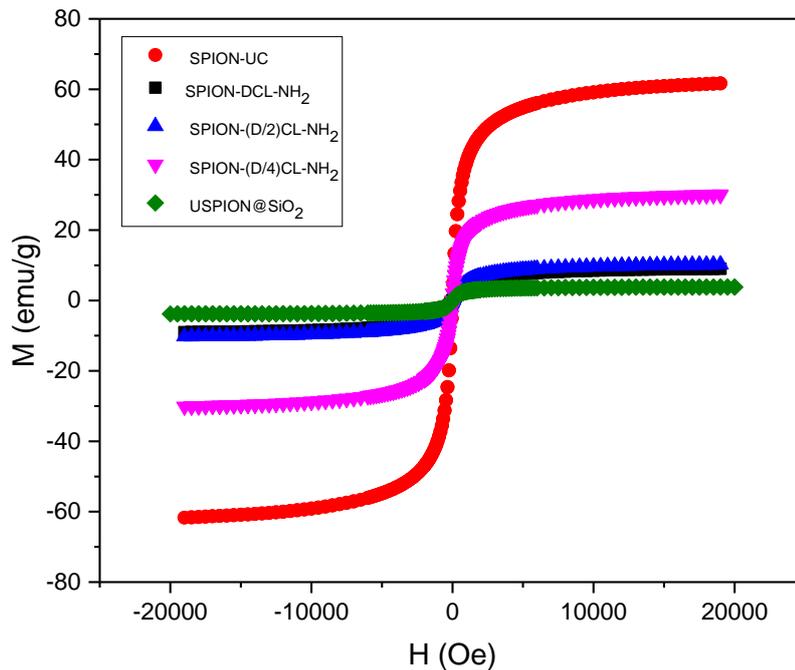


Figura 5.3. Curvas de magnetização em função do campo magnético em temperatura ambiente das sínteses SPION-UC, SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e USPIO@SiO₂.

Tabela 5.2. Valores da magnetização de saturação para cada síntese analisada.

Síntese	Magnetização de Saturação (emu/g)
SPION-UC	61,6
SPION-D	-
SPION-DCL-NH ₂	9,0
SPION-(D/2)CL-NH ₂	10,2
SPION-(D/2)CL-NH ₂ -Cy5.5	-
SPION-(D/4)CL-NH ₂	29,9
SPION@SiO ₂	-
USPIO@SiO ₂	3,8

Como esperado, a nanopartícula com o maior núcleo apresentou a maior magnetização de saturação (SPION-UC) [56], assim como as nanopartículas com o menor conteúdo de Dextran (SPION-(D/2)CL-NH₂ e SPION-(D/4)CL-NH₂).

Também se observa uma redução significativa da magnetização na síntese recoberta com silício (USPION@SiO₂), o que indica que os valores de magnetização de saturação diminuem devido ao aumento de conteúdo não magnético ocasionado pelos recobrimentos [57].

5.2.2. Curvas ZFC/FC

A medida de ZFC/FC foi realizada em um campo de 100 Oe em uma amostra líquida de SPION-(D/4)CL-NH₂, como mostra a Figura 5.4. Nessa medida, a massa magnética da síntese foi estimada, com base no volume do porta amostra e na concentração da síntese, obtendo-se a magnetização apenas considerando a massa magnética.

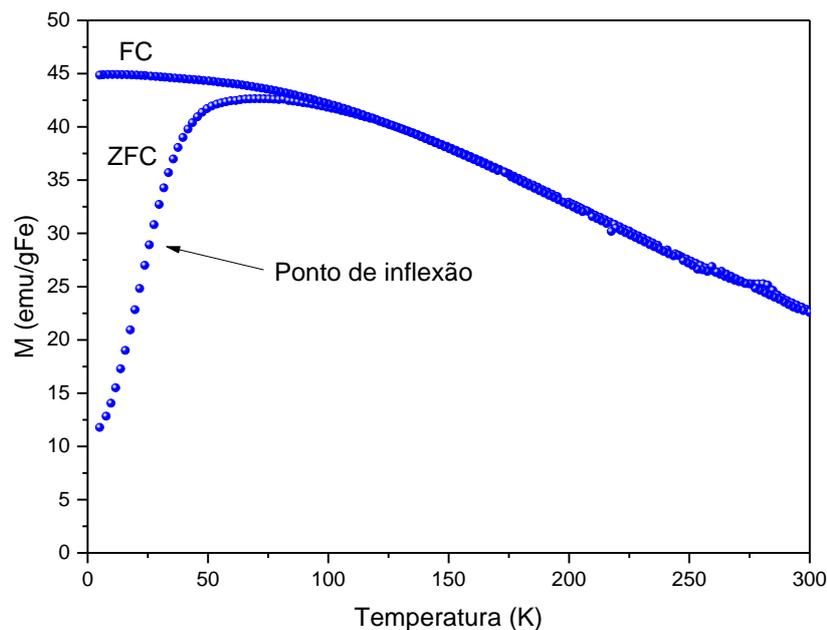


Figura 5.4. Curva ZFC/FC para uma amostra líquida da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂.

Há três maneiras de se determinar a temperatura de bloqueio (T_b), de nanopartículas magnéticas. A primeira maneira é utilizando o ponto de inflexão da curva ZFC. Esse é um bom método para uma estimativa da temperatura de bloqueio médio das nanopartículas, mas não leva em conta a distribuição de tamanhos das nanopartículas em solução [58]. A partir da curva, a média de T_b para a amostra líquida da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂ foi de aproximadamente 25 K.

A segunda maneira é pegando-se o ponto máximo na curva ZFC. Nanopartículas maiores requerem maior temperatura para que a energia térmica exceda a energia de barreira, e assim serem desbloqueadas, entrando no estado superparamagnético. Nesse ponto há a garantia de que todas as nanopartículas do sistema estão desbloqueadas [41]. A partir da curva, a T_b no ponto máximo da curva ZFC foi de aproximadamente 75 K.

A terceira maneira leva em conta a distribuição de tamanhos das nanopartículas em solução. Como há uma distribuição de tamanhos, também haverá uma distribuição de temperaturas de bloqueio. É possível usar uma relação, que não é estritamente exata nesse caso, mas pode ser muito útil para se ter uma ideia da distribuição das temperaturas de bloqueio. Essa relação é dada por $\rho(T) \propto -\frac{1}{T} \frac{d\Delta M}{dT}$ [59], onde $\rho(T)$ é a distribuição das temperaturas de bloqueio, T é a temperatura e ΔM é a diferença entre a magnetização na curva FC (M_{FC}) e a magnetização na curva ZFC (M_{ZFC}).

Com essa relação, uma limitação vem do fato de que o ruído experimental será amplificado primeiro pela derivação e segundo pela multiplicação $1/T$ [59]. Às vezes, o ruído torna impossível fazer essa estimativa, como no caso dessa amostra. Para contornar esse problema, uma segunda medida foi realizada, só que dessa vez com a solução de nanopartículas depositada em silício.

A distribuição mostra que a síntese tem a maioria das nanopartículas com uma distribuição de T_b abaixo dos 50 K, com um pico em 10 K. A Figura 5.5 mostra a curva ZFC/FC para a solução da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂ e a distribuição das temperaturas de bloqueio para a mesma amostra.

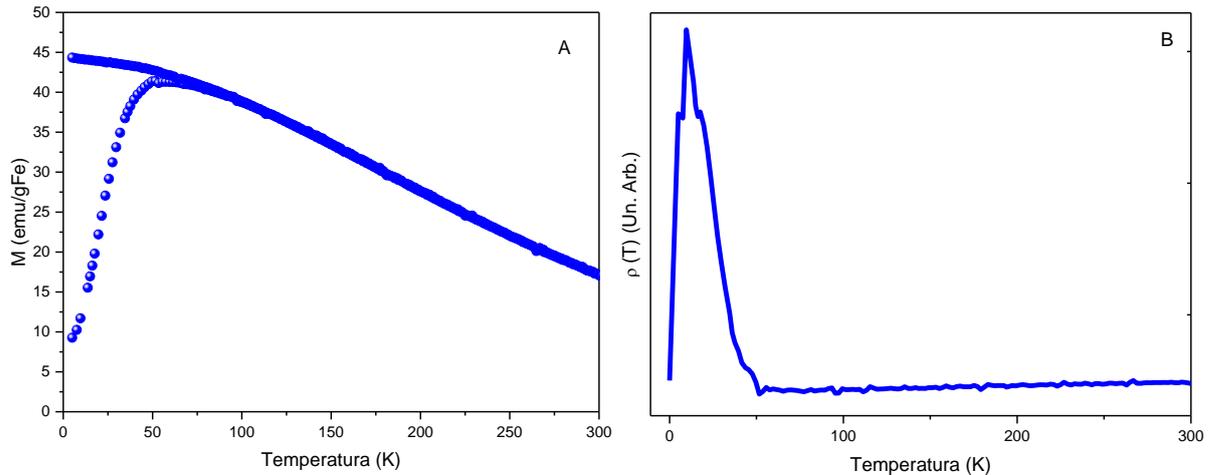


Figura 5.5. Curva ZFC/FC para uma amostra depositada em silício da síntese SPION-(D/4)CL-NH₂ (A). Distribuição das T_b para a mesma amostra (B).

Essa medida é representativa para as outras sínteses de nanopartículas recobertas com dextran. A síntese SPION-(D/4)CL-NH₂ é a síntese mais instável de todas devido à pequena massa de dextran na síntese e, mesmo com essa tendência, foi possível obter uma distribuição de T_b estreita.

5.3. Medidas de Relaxividade

5.3.1. Concentração de Ferro

Para se obter a relaxividade, é necessário estipular a concentração de ferro nas soluções de nanopartículas. Utilizando a técnica de espectrofotometria por UV-Vis foi possível determinar a concentração de ferro das sínteses SPION-D, SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 e SPION-(D/4)CL-NH₂. Seguindo procedimentos apresentados em [19, 60], primeiramente foi feita a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 410 nm dos padrões de ferro de concentração conhecidas. Com esses dados foi construída uma curva de calibração absorvância versus concentração. Três curvas de calibração foram obtidas, uma curva para a análise da síntese SPION-D (curva 1), outra curva para análise das sínteses SPION-(D/2)CL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 (curva 2) e

uma curva para a análise das sínteses SPION–DCL–NH₂ e SPION–(D/4)CL–NH₂ (curva 3). A Figura 5.6 mostra as curvas de calibração construídas.

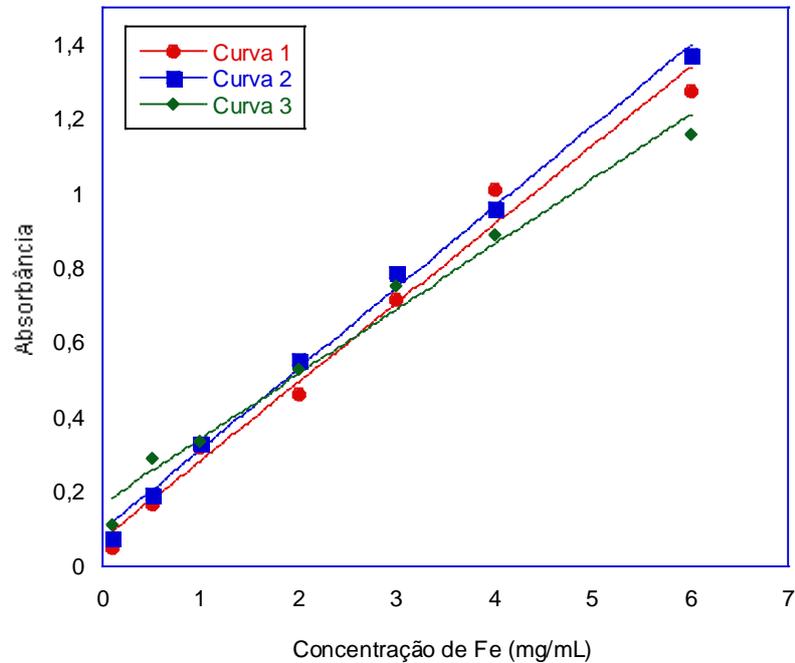


Figura 5.6. Curvas de calibração para análise das sínteses. Curva 1 ($R^2 = 0,98532$), curva 2 ($R^2 = 0,99604$), curva 3 ($R^2 = 0,98244$).

Com a equação da reta de cada uma das curvas de calibração e as absorbâncias das amostras da solução aquosa das nanopartículas foi determinada a concentração das soluções estoque para cada síntese. Para as sínteses SPION–UC e USPION@SiO₂ analisadas por relaxometria, as concentrações medidas foram de, respectivamente, 3.98 mg/mL e 0.46 mg/mL. Os valores são encontrados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Valores de concentração de ferro de cada uma das soluções estoque das diferentes nanopartículas.

Síntese	Concentração de Fe (mg/mL)
SPION-UC	3,98
SPION-D	10,8
SPION-DCL-NH₂	6,75
SPION-(D/2)CL-NH₂	11,2
SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5	9,30
SPION-(D/4)CL-NH₂	1,44
SPION@SiO₂	-
USPION@SiO₂	0,46

A concentração da síntese SPION-UC foi medida por relaxometria devido a sua alta instabilidade, o que poderia acarretar em erros no valor de sua absorvância se a concentração dessa síntese fosse obtida por espectrofotometria. A concentração da síntese USPION@SiO₂ foi obtida por relaxometria devido a não a digestão ácida do silício no processo de preparação para a leitura das absorvâncias na espectrofotometria. Não foi possível obter a concentração da síntese SPION@SiO₂ devido ao seu alto teor de silício.

Os valores da concentração de ferro obtidos para essas sínteses são maiores do que os valores da concentração de ferro para agentes de contraste comercialmente disponíveis, como por exemplo, o agente de contraste Lumirem.

5.3.2. Medidas do Tempo de Relaxação T2

As medidas dos tempos de relaxação T2 foram obtidas com o uso do simulador e da metodologia descrita na seção 4.4. As imagens de MRI da Figura 5.7, mostram cortes do simulador para a obtenção dos valores de T2, com soluções de nanopartículas das sínteses SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e do agente de contraste Lumirem em cinco diferentes concentrações. As imagens são referentes à segunda fatia adquirida e os círculos menores correspondem às seções transversais

de cada seringa. A Tabela 5.5 identifica o material em cada seringa no simulador, aonde o número após a barra indica o grau de diluição (de 100 a 2000 vezes).

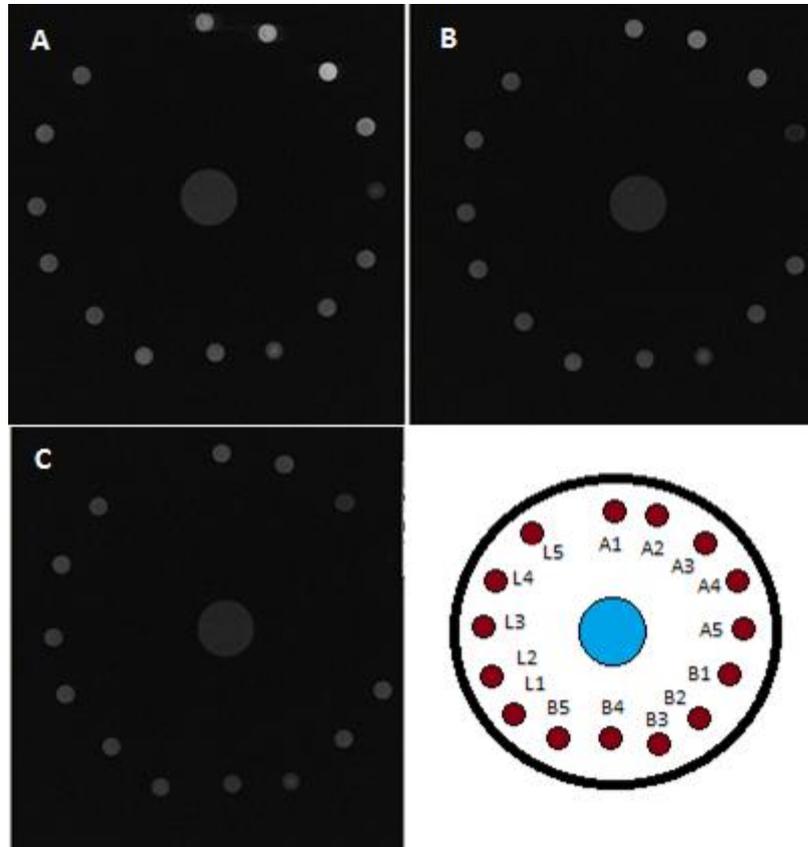


Figura 5.7. Imagens de MRI de dispersões aquosas contendo as nanopartículas das sínteses SPION–DCL–NH₂, SPION–(D/4)CL–NH₂ e do agente de contraste Lumirem. Nas aquisições foi utilizado um TR de 1000 ms e TE efetivo de 22.116 ms (A), 51.604 ms (B) e 103.208 ms (C). A Tabela 5.4 define as diluições das amostras rotuladas de A1-A5 (SPION–DCL–NH₂), B1-B5 (SPION–(D/4)CL–NH₂) e L1-L5 (Lumirem).

Tabela 5.4. Localizador das amostras no simulador.

Localização	Amostra
A1	SPION–DCL–NH ₂ /100
A2	SPION–DCL–NH ₂ /200
A3	SPION–DCL–NH ₂ /500
A4	SPION–DCL–NH ₂ /1000
A5	SPION–DCL–NH ₂ /2000
B1	SPION–(D/4)CL–NH ₂ /100
B2	SPION–(D/4)CL–NH ₂ /200

B3	SPION-(D/4)CL-NH ₂ /500
B4	SPION-(D/4)CL-NH ₂ /1000
B5	SPION-(D/4)CL-NH ₂ /2000
L1	Lumirem/100
L2	Lumirem/200
L3	Lumirem/500
L4	Lumirem/1000
L5	Lumirem/2000

Pode-se verificar, por meio das imagens, que existem diferenças no contraste (nível de cinza dos pixels da imagem) com a variação da concentração de ferro presente na solução das sínteses SPION-DCL-NH₂ e SPION-(D/4)CL-NH₂. Quanto maior a concentração de ferro na amostra, mais rapidamente o sinal de MRI decai. Não houve diferença aparente no contraste dado pelo agente de contraste Lumirem, em relação à referência utilizada. Isso pode ser atribuído a alta diluição do agente de contraste, já que a concentração de ferro presente é muito baixa.

Os resultados para as curvas de decaimento do sinal em função do tempo de eco efetivo para as dispersões a base de SPION-UC e SPION-D são mostrados na Figura 5.8. Para as demais sínteses, os dados aparecem como segue: SPION-DCL-NH₂ e SPION-(D/2)CL-NH₂ (Fig. 5.9), SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 e SPION-(D/4)CL-NH₂ (Fig. 5.10), SPION@SiO₂ e USPION@SiO₂ (Fig. 5.11) e o agente de contraste Lumirem (Fig. 5.12).

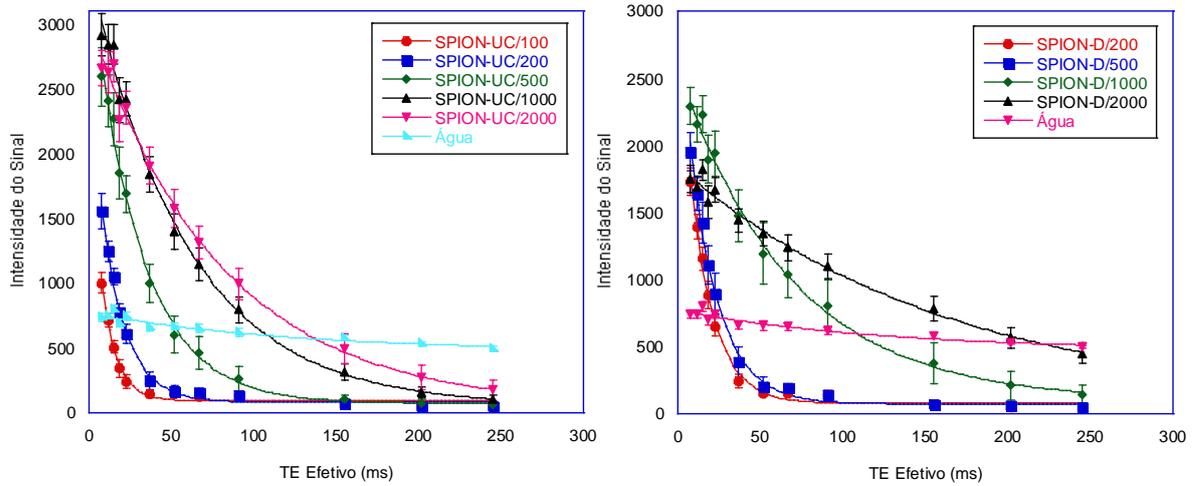


Figura 5.8. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-UC (esquerda) e SPION-D (direita).

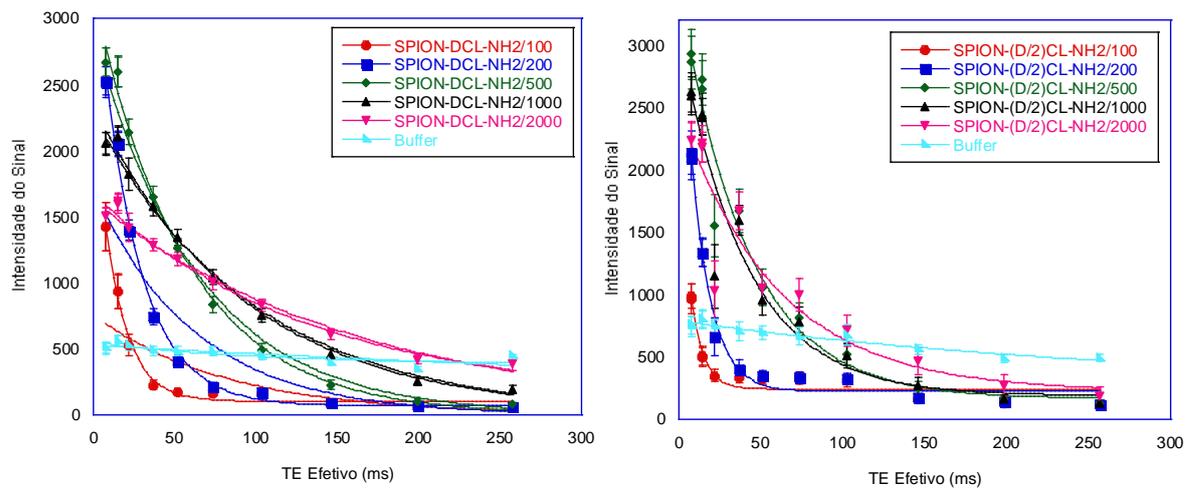


Figura 5.9. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-DCL-NH₂ (esquerda) e SPION-(D/2)CL-NH₂ (direita).

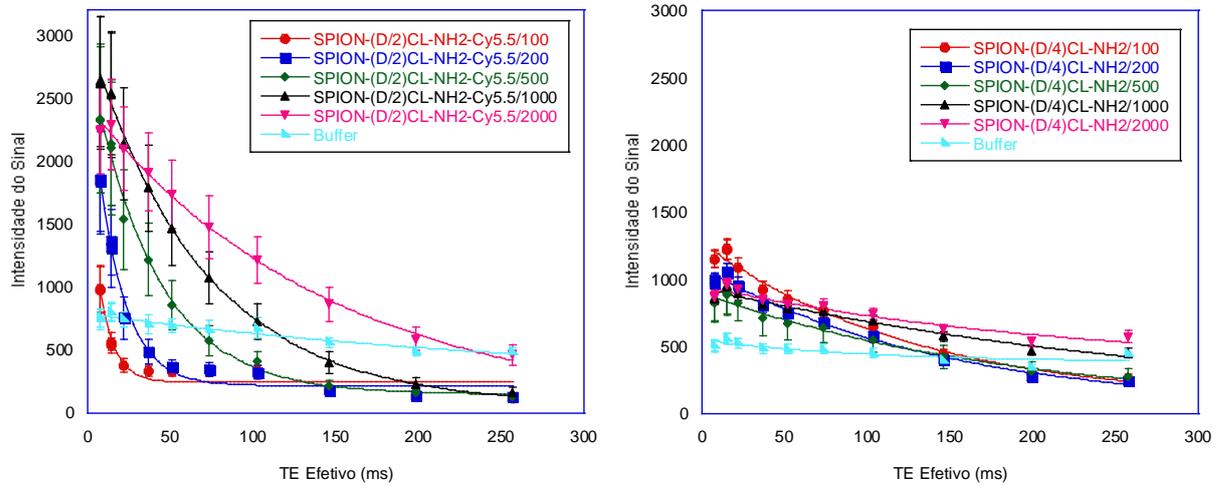


Figura 5.10. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 (esquerda) e SPION-(D/4)CL-NH₂ (direita).

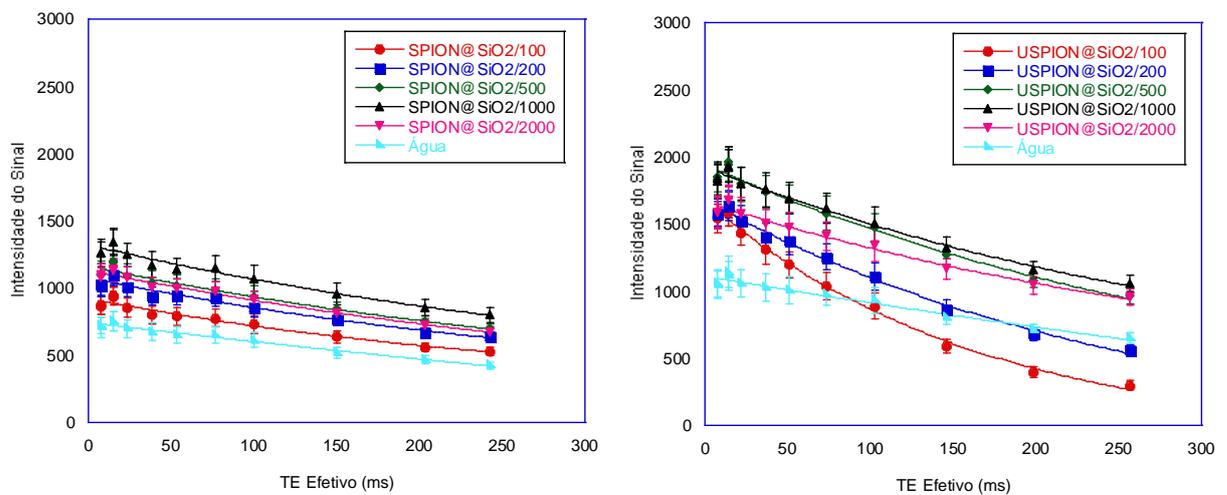


Figura 5.11. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION@SiO₂ (esquerda) e USPION@SiO₂ (direita).

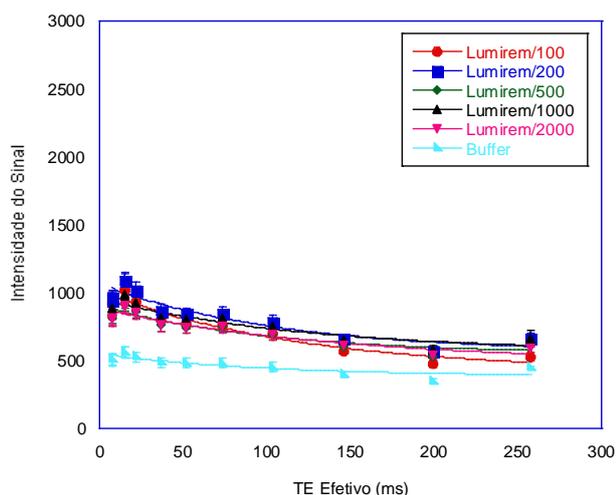


Figura 5.12. Curvas de intensidade do sinal em função de TE efetivo para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas do agente de contraste Lumirem.

Com as curvas de decaimento do sinal, obtiveram-se os valores dos tempos de relaxação T2 e das taxas de relaxação R2 obtidos para cada síntese analisada, os quais estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Valores dos tempos de relaxação T2 e da taxa de relaxação R2.

Síntese	Diluição	Concentração de Fe (mg/mL)	Concentração de Fe (mM)	T2 (ms)	R2 (Hz)
SPION-UC	100	0,0398	0,7126	9,13 ± 0,86	109,50 ± 10,34
	200	0,0199	0,3563	14,79 ± 0,95	67,61 ± 4,36
	500	0,0080	0,1425	29,80 ± 1,92	33,56 ± 2,16
	1000	0,0040	0,0712	59,23 ± 4,20	16,88 ± 1,20
	2000	0,0020	0,0356	79,58 ± 7,80	12,56 ± 1,23
	Água	0	0	124,41 ± 60,44	8,04 ± 3,90
SPION-D	200	0,0540	0,9669	14,67 ± 0,97	68,16 ± 4,53
	500	0,0216	0,3867	17,77 ± 1,07	56,29 ± 3,39
	1000	0,0108	0,1934	68,21 ± 5,97	14,66 ± 1,28
	2000	0,0054	0,0967	163,42 ± 37,01	6,12 ± 1,39
	Água	0	0	124,41 ± 60,40	8,04 ± 3,90
SPION-DCL-NH ₂	100	0,0675	1,2085	14,17 ± 0,93	70,57 ± 4,65
	200	0,0337	0,6043	24,25 ± 1,57	41,24 ± 2,68
	500	0,0135	0,2417	56,97 ± 4,68	17,55 ± 1,44
	1000	0,0067	0,1209	92,52 ± 10,77	10,81 ± 1,26

	2000	0,0033	0,0604	131,90 ± 28,01	7,58 ± 1,61
	Buffer	0	0	270,88 ± 271,08	3,69 ± 3,69
SPION-(D/2)CL-NH ₂	100	0,1120	2,0053	7,46 ± 1,63	134,08 ± 29,31
	200	0,0560	1,0027	12,30 ± 1,20	81,33 ± 7,95
	500	0,0224	0,4011	41,38 ± 7,49	24,17 ± 4,37
	1000	0,0112	0,2005	40,61 ± 10,63	24,62 ± 6,44
	2000	0,0056	0,1002	59,81 ± 21,83	16,72 ± 6,10
	Buffer	0	0	298,53 ± 245,04	3,35 ± 2,75
SPION-(D/2)CL-NH ₂ -Cy5.5	100	0,0930	1,6652	8,82 ± 1,96	113,34 ± 25,20
	200	0,0465	0,8326	16,57 ± 1,84	60,34 ± 6,70
	500	0,0186	0,3330	39,86 ± 3,31	25,09 ± 2,08
	1000	0,0093	0,1665	69,45 ± 4,42	14,40 ± 0,92
	2000	0,0046	0,0832	146,45 ± 19,67	6,83 ± 0,92
	Buffer	0	0	298,53 ± 245,04	3,35 ± 2,75
SPION-(D/4)CL-NH ₂	100	0,0144	0,2578	130,39 ± 27,86	7,67 ± 1,64
	200	0,0072	0,1289	143,67 ± 33,68	6,96 ± 1,63
	500	0,0029	0,0516	182,43 ± 61,06	5,48 ± 1,83
	1000	0,0014	0,0258	303,10 ± 219,84	3,30 ± 2,39
	2000	0,0007	0,0129	223,57 ± 168,56	4,47 ± 3,37
	Buffer	0	0	270,88 ± 271,08	3,69 ± 3,69
SPION@SiO ₂	100	-	-	300,83 ± 238,92	3,32 ± 2,64
	200	-	-	337,31 ± 288,89	2,96 ± 2,54
	500	-	-	387,73 ± 401,51	2,58 ± 2,67
	1000	-	-	382,76 ± 342,97	2,61 ± 2,34
	2000	-	-	428,86 ± 317,74	2,33 ± 1,73
	Água	0	0	1106,5 ± 2287,3	0,90 ± 1,87
USPION@SiO ₂	100	0,0046	0,0820	164,60 ± 27,30	6,07 ± 1,01
	200	0,0023	0,0410	267,49 ± 77,80	3,74 ± 1,09
	500	0,0009	0,0164	339,91 ± 181,81	2,94 ± 1,57
	1000	0,0004	0,0082	340,03 ± 181,76	2,94 ± 1,57
	2000	0,0002	0,0041	357,64 ± 219,84	2,80 ± 1,72
	Água	0	0	1046,7 ± 2205,8	0,95 ± 2,01
Lumirem	100	0,00175	0,0313	71,39 ± 15,69	14,01 ± 3,08
	200	0,000875	0,0157	98,30 ± 20,58	10,17 ± 2,13
	500	0,00035	0,0063	133,03 ± 28,81	7,52 ± 1,63

	1000	0,000175	0,0031	165,55 ± 31,67	6,04 ± 1,15
	2000	0,0000875	0,0016	204,06 ± 31,53	4,90 ± 0,76
	Buffer	0	0	270,88 ± 271,08	3,69 ± 3,69

Nesses resultados é importante destacar as medidas relacionadas ao buffer e a água. Um dos grandes problemas para se obter o tempo T2 da água ou do buffer é o ajuste da exponencial do decaimento do sinal com os dados experimentais. Em sistemas muito diluídos, ou com uma grande quantidade de íons presentes, como no caso do buffer, o decaimento não segue uma exponencial perfeita, o que leva a erros no ajuste da medida, tão grandes quanto a própria medida.

Outra dificuldade que pode ser encontrada é em relação à própria reprodutibilidade das medidas no equipamento de MRI. Em princípio, se o sistema medido é o mesmo, não deveria haver variações na medida. Um estudo de 2014 demonstrou variações significativas em medidas de sinal em sequências EPI, utilizando um equipamento de 3,0 T, com medidas realizadas no mesmo dia, entre manhã e noite, o que indicou instabilidade em equipamentos de MRI [61].

5.3.3. Medidas do Tempo de Relaxação T1

As imagens de MRI da Figura 5.13 mostram cortes do simulador para a obtenção dos valores de T1, com soluções de nanopartículas das sínteses SPION–DCL–NH₂, SPION–(D/4)CL–NH₂ e o agente de contraste Lumirem em cinco diferentes concentrações. As imagens são referentes à segunda fatia adquirida e os círculos menores correspondem às seções transversais de cada seringa. As posições das amostras no simulador são as mesmas da Tabela 5.5.

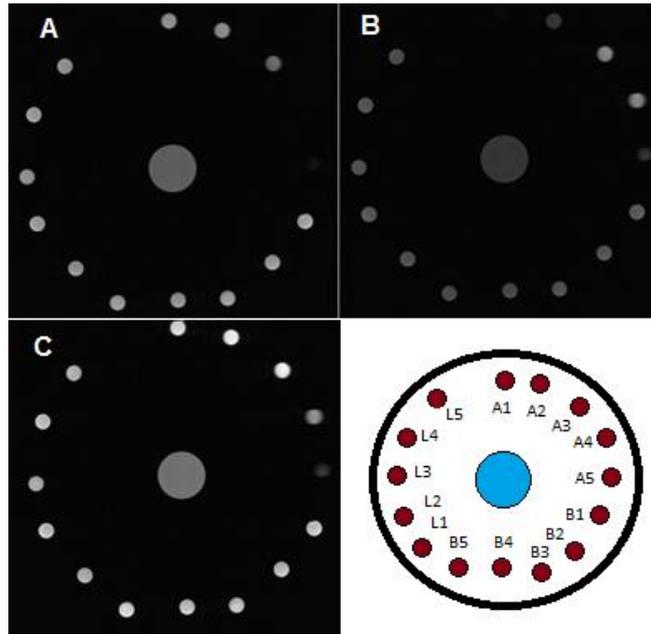


Figura 5.13. Imagens de MRI de dispersões aquosas contendo nanopartículas das sínteses SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/4)CL-NH₂ e do agente de contraste Lumirem. Nas aquisições foi utilizado um TR de 3000 ms e TI de 70 ms (A), 400 ms (B) e 2500 ms (C).

As Figuras 5.14 a 5.17 mostram os gráficos da função da recuperação do sinal em função do tempo de inversão para as diferentes sínteses e o agente de contraste Lumirem (5.18).

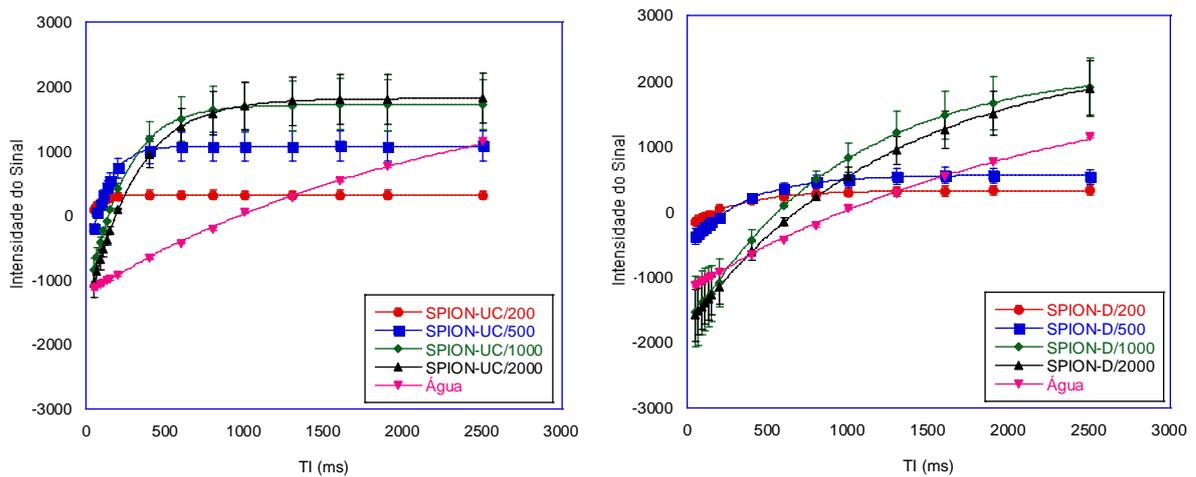


Figura 5.14. Curvas de intensidade do sinal em função do TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-UC (esquerda) e SPION-D (direita).

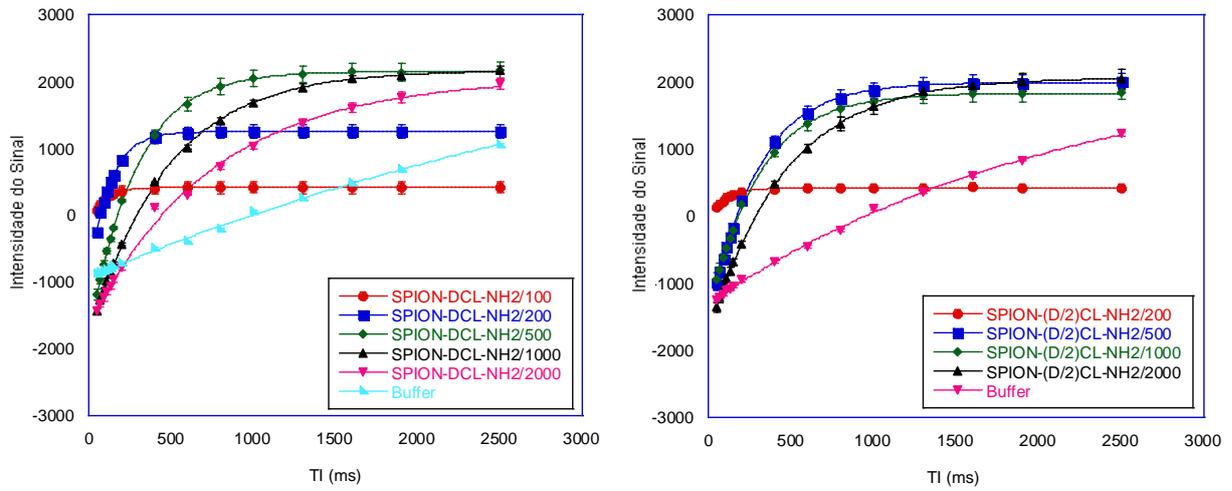


Figura 5.15. Curvas de intensidade do sinal em função do TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION- DCL-NH₂ (esquerda) e SPION-(D/2)CL-NH₂ (direita).

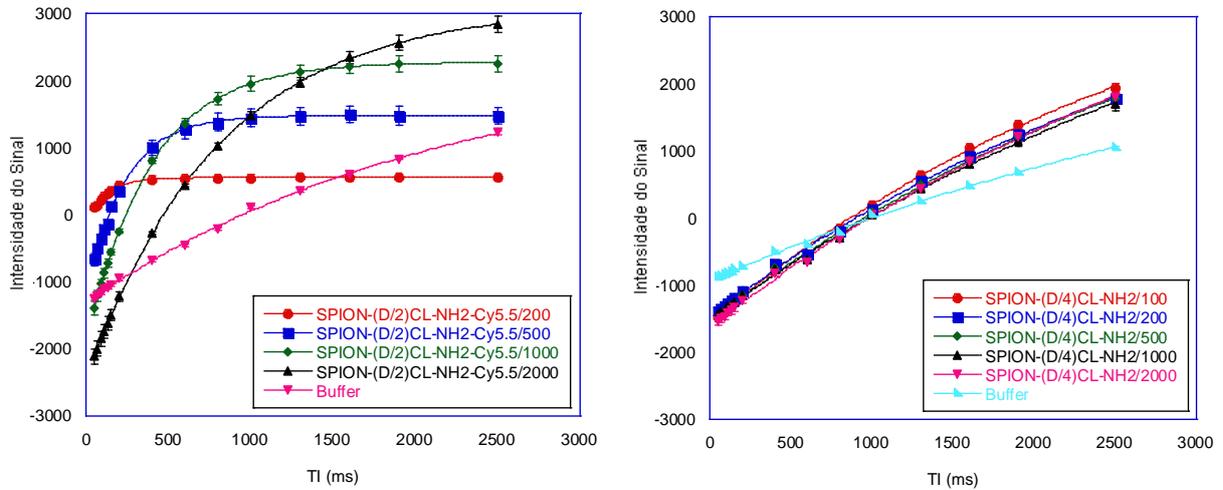


Figura 5.16. Curvas de intensidade do sinal em função do TI para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 (esquerda) e SPION-(D/4)CL-NH₂ (direita).

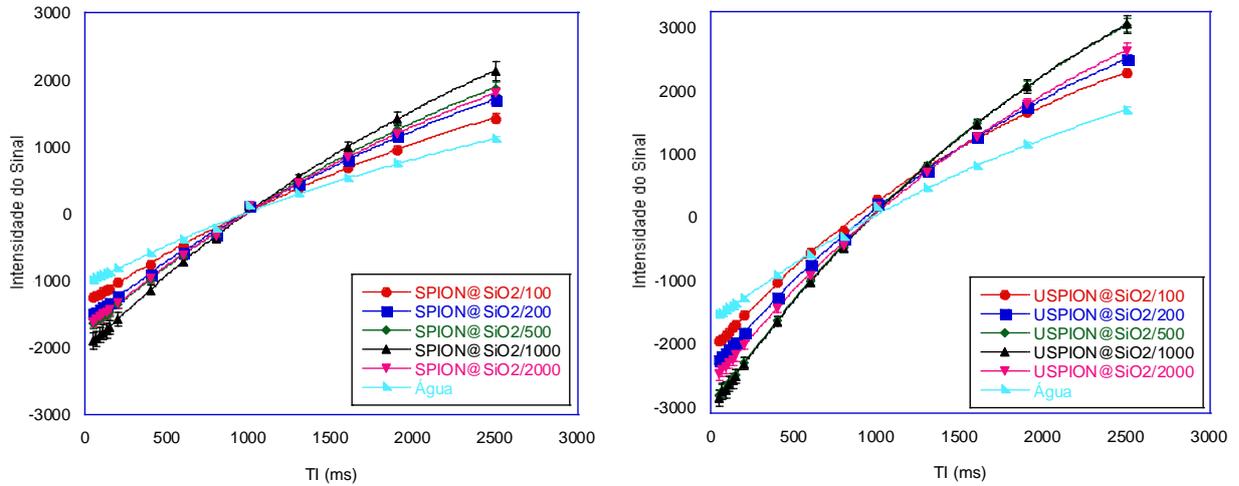


Figura 5.17. Curvas de intensidade do sinal em função do T1 para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas das sínteses SPION@SiO₂ (esquerda) e USPIO@SiO₂ (direita).

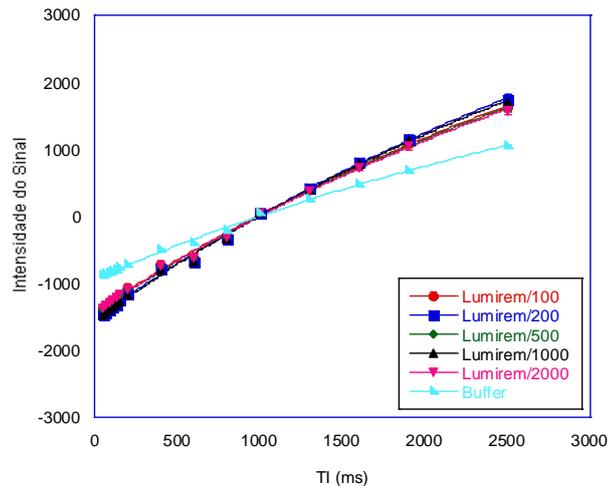


Figura 5.18. Curvas de intensidade do sinal em função de T1 para soluções aquosas com diferentes concentrações de nanopartículas do agente de contraste Lumirem.

Os valores dos tempos de relaxação T1 e das taxas de relaxação R1 obtidos a partir da regressão dos pontos da curva para cada concentração e para cada síntese analisada são apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Valores dos tempos de relaxação T1 e da taxa de relaxação R1.

Síntese	Diluição	Concentração de Fe (mg/mL)	Concentração de Fe (mM)	T1 (ms)	R1 (Hz)
SPION-UC	200	0,0199	0,3563	60,75 ± 1,06	16,46 ± 0,29
	500	0,0080	0,1425	115,39 ± 1,64	8,67 ± 0,12
	1000	0,0040	0,0712	223,54 ± 1,14	4,47 ± 0,02
	2000	0,0020	0,0356	293,88 ± 1,34	3,40 ± 0,02
	Água	0	0	2254,70 ± 133,28	0,44 ± 0,03
SPION-D	200	0,0540	0,9669	333,34 ± 20,71	3,00 ± 0,19
	500	0,0216	0,3867	359,95 ± 10,59	2,78 ± 0,08
	1000	0,0108	0,1934	946,01 ± 27,55	1,06 ± 0,03
	2000	0,0054	0,0967	1269,20 ± 15,87	0,79 ± 0,01
	Água	0	0	2254,70 ± 133,28	0,44 ± 0,03
SPION-DCL-NH ₂	100	0,0675	1,2085	75,68 ± 0,77	13,21 ± 0,13
	200	0,0337	0,6043	120,62 ± 2,80	8,29 ± 0,19
	500	0,0135	0,2417	279,86 ± 1,73	3,57 ± 0,02
	1000	0,0067	0,1209	474,38 ± 5,15	2,11 ± 0,02
	2000	0,0033	0,0604	758,84 ± 47,22	1,32 ± 0,08
	Buffer	0	0	4201,5 ± 660,88	0,24 ± 0,04
SPION-(D/2)CL-NH ₂	100	0,1120	2,0053	-	-
	200	0,0560	1,0027	86,87 ± 4,12	11,51 ± 0,55
	500	0,0224	0,4011	289,06 ± 3,34	3,46 ± 0,04
	1000	0,0112	0,2005	302,20 ± 3,55	3,31 ± 0,04
	2000	0,0056	0,1002	461,50 ± 3,76	2,17 ± 0,02
	Buffer	0	0	2172,7 ± 142,6	0,46 ± 0,03
SPION-(D/2)CL-NH ₂ -Cy5.5	100	0,0930	1,6652	-	-
	200	0,0465	0,8326	117,00 ± 6,20	8,55 ± 0,45
	500	0,0186	0,3330	233,91 ± 6,84	4,27 ± 0,12
	1000	0,0093	0,1665	392,19 ± 3,25	2,55 ± 0,02
	2000	0,0046	0,0832	812,31 ± 5,63	1,23 ± 0,01
	Buffer	0	0	2172,7 ± 142,6	0,46 ± 0,03
SPION-(D/4)CL-NH ₂	100	0,0144	0,2578	2976,80 ± 326,93	0,34 ± 0,04
	200	0,0072	0,1289	3271,70 ± 388,65	0,31 ± 0,04
	500	0,0029	0,0516	3625,9 ± 470,0	0,28 ± 0,04
	1000	0,0014	0,0258	3860,60 ± 471,58	0,26 ± 0,03

	2000	0,0007	0,0129	3875,90 ± 453,23	0,26 ± 0,03
	Buffer	0	0	4201,5 ± 660,88	0,24 ± 0,04
SPION@SiO ₂	100	-	-	3087,20 ± 258,34	0,32 ± 0,03
	200	-	-	3154,60 ± 231,79	0,32 ± 0,02
	500	-	-	3150,60 ± 204,71	0,32 ± 0,02
	1000	-	-	3120,60 ± 177,68	0,32 ± 0,02
	2000	-	-	3064,40 ± 215,06	0,33 ± 0,02
	Água	0	0	3046,90 ± 344,76	0,33 ± 0,04
USPION@SiO ₂	100	0,0046	0,0820	2175,70 ± 83,93	0,46 ± 0,02
	200	0,0023	0,0410	2451,60 ± 89,41	0,41 ± 0,01
	500	0,0009	0,0164	2590,80 ± 81,17	0,39 ± 0,01
	1000	0,0004	0,0082	2644,50 ± 95,95	0,38 ± 0,01
	2000	0,0002	0,0041	2625,90 ± 119,01	0,38 ± 0,02
	Água	0	0	2748,30 ± 248,97	0,36 ± 0,03
Lumirem	100	0,00175	0,0313	1929,00 ± 55,77	0,52 ± 0,01
	200	0,000875	0,0157	2298,60 ± 51,09	0,43 ± 0,01
	500	0,00035	0,0063	2860,10 ± 40,92	0,350 ± 0,005
	1000	0,000175	0,0031	3765,50 ± 39,89	0,275 ± 0,003
	2000	0,0000875	0,0016	4172,40 ± 42,66	0,240 ± 0,002
	Buffer	0	0	4201,5 ± 660,88	0,24 ± 0,04

Novamente, assim como nos tempos de relaxação T2, os tempos de relaxação T1 da água e do buffer sofrem variações com o dia da medida. Desta vez não houve dificuldade com o ajuste da curva exponencial aos dados experimentais, mas como os tempos de inversão, em todos os casos medidos, não foram o suficiente para saturar o sinal de MRI para os casos da água e do buffer, pode ter ocorrido uma subestimação ou superestimação dos valores.

5.3.4. Relaxividade

A Figura 5.19 mostra os gráficos da taxa de relaxação R2 e da taxa de relaxação R1 em função da concentração de ferro para todas as sínteses, exceto SPION@SiO₂.

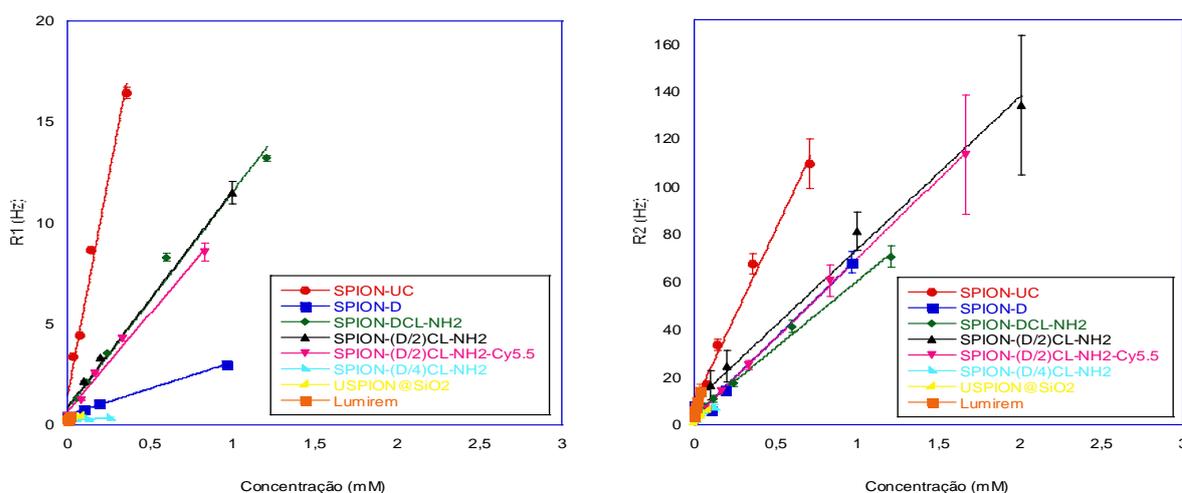


Figura 5.19. Gráfico da taxa de relaxação R1 em função da concentração de ferro em mM para as sínteses SPION-UC ($R^2 = 0,98412$), SPION-D ($R^2 = 0,9981$), SPION-DCL-NH₂ ($R^2 = 0,98649$), SPION-(D/2)CL-NH₂ ($R^2 = 0,99569$), SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 ($R^2 = 0,99142$), SPION-(D/4)CL-NH₂ ($R^2 = 0,94768$), USPION@SiO₂ ($R^2 = 0,98049$) e o agente de contraste Lumirem ($R^2 = 0,93965$), esquerda. Gráfico da taxa de relaxação R2 em função da concentração de ferro em mM para as sínteses SPION-UC ($R^2 = 0,99$), SPION-D ($R^2 = 0,98545$), SPION-DCL-NH₂ ($R^2 = 0,99639$), SPION-(D/2)CL-NH₂ ($R^2 = 0,99027$), SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 ($R^2 = 0,99923$), SPION-(D/4)CL-NH₂ ($R^2 = 0,96672$), USPION@SiO₂ ($R^2 = 0,95879$) e o agente de contraste Lumirem ($R^2 = 0,96508$), direita.

O coeficiente angular de cada uma das retas da Figura 5.19 representam a relaxividade r_1 e r_2 de cada síntese, ou seja, o quanto as nanopartículas afetam a taxa de relaxação spin-rede e spin-spin dos prótons nas moléculas de água circundantes. Devido a escala de concentração, a curva relacionada ao agente de contraste Lumirem não aparece se comparada aos demais, pois a concentração de nanopartículas é muito baixa. Os valores das relaxividades r_2 e r_1 , da razão entre elas e demais parâmetros físicos e estruturais das sínteses analisadas e do agente de contraste Lumirem estão dispostos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Valores das relaxividades e de outros parâmetros físicos e estruturais das sínteses analisadas e do agente de contraste Lumirem.

Síntese	r_2 (mMs) ⁻¹	r_1 (mMs) ⁻¹	r_2/r_1	Diâmetro do Núcleo (nm) - DRX	Diâmetro do Núcleo (nm) - TEM	Diâmetro Hidrodinâmico (nm) - DLS	Magnetização de Saturação (emu/g)
SPION-UC	148,10 ± 5,09	47,34 ± 2,84	3,13 ± 0,22	11,3	9,5 ± 1,8	49,4 ± 23,4	61,6
SPION-D	66,24 ± 2,92	2,67 ± 0,08	24,78 ± 1,31	6,5	6,6 ± 1,8	11,7 ± 0,9	-
SPION-DCL-NH ₂	56,75 ± 1,21	11,38 ± 0,53	4,99 ± 0,26	6,8	9,3 ± 1,6	16,2 ± 7,4	9,0
SPION-(D/2)CL-NH ₂	68,14 ± 3,36	11,20 ± 0,48	6,08 ± 0,40	6,5	-	21,8 ± 6,7	10,2
SPION-(D/2)CL-NH ₂ -Cy5.5	66,45 ± 0,65	10,03 ± 0,38	6,62 ± 0,26	-	-	28,2 ± 6,3	-
SPION-(D/4)CL-NH ₂	26,94 ± 2,59	0,42 ± 0,04	63,85 ± 8,99	8,4	17,4 ± 2,4	48,5 ± 8,9	29,9
USPION@SiO ₂	65,31 ± 5,90	1,16 ± 0,04	56,31 ± 5,37	9,5	-	30,4 ± 1,3	3,8
Lumirem	358,25 ± 30,66	13,59 ± 2,43	26,37 ± 5,24	-	-	~ 300	-

As altas relaxividades apresentadas pela síntese SPION-UC podem ter relação com a ausência de recobrimento, diminuindo a distância mínima de aproximação das moléculas de água ao núcleo magnético. Com o aumento da proximidade, aumenta-se tanto a interação spin-spin quanto a spin-rede, aprimorando a defasagem na precessão dos spins dos hidrogênios das moléculas de água e a troca de energia com a rede [40].

A ausência de recobrimento dessa síntese também acarreta sua instabilidade coloidal, facilitando a agregação entre as partículas. Com a agregação, a magnetização das nanopartículas aumenta, e como consequência a influência sobre as moléculas de água circundantes também aumenta, aprimorando as taxas de relaxação R1 e R2, e as relaxividades [40].

A síntese SPION-D apresenta relaxividades menores se comparada com a SPION-UC. De uma maneira geral, isso pode ser atribuído ao revestimento de dextran que, além de estabilizar as nanopartículas, diminuindo a agregação, influencia na distância mínima de aproximação entre os prótons da água e as nanopartículas [40].

As sínteses SPION-DCL-NH₂, SPION-(D/2)CL-NH₂ e SPION-(D/2)CL-NH₂-Cy5.5 não apresentaram diferenças significativas nos valores de relaxividade, muito provavelmente devido às suas características físicas e estruturais similares.

A síntese SPION-(D/4)CL-NH₂, se comparada com as demais sínteses onde as nanopartículas também foram encapsuladas com dextran, apresenta valores de relaxividade menores que as demais. Isso pode estar relacionado ao volume hidrodinâmico das partículas dessa síntese. Se o volume hidrodinâmico medido para essa síntese representa uma barreira entre as moléculas de água e as partículas, e as moléculas de água não conseguirem difundir pelas camadas de dextran que recobrem as partículas, temos que a distância mínima de aproximação das moléculas de água será maior do que nas demais sínteses com dextran, o que ocasiona uma diminuição nas relaxividades [62].

A síntese USPIO@SiO₂, apesar de apresentar um valor de relaxividade r_2 , parecido com as sínteses cujo o revestimento é o dextran, apresenta um valor de relaxividade r_1 muito menor. Isso pode ser atribuído ao revestimento de sílica, que é muito denso, o que leva a uma baixa área de superfície interna e menor porosidade. Assim, a maioria das moléculas de água circundantes não difundem pelo recobrimento, e uma quantidade muito insignificante pode permanecer nas proximidades do núcleo magnético [57].

Com esses resultados, é possível classificar os diferentes sistemas em agentes de contraste do tipo T1 ou do tipo T2. Todas as sínteses analisadas nesse trabalho podem ser classificadas como agentes de contraste do tipo T2. Seu uso em MRI ocasiona um hiposinal na região analisada, ocasionando um escurecimento dessa região. Os valores da razão entre as relaxividades encontradas não estão distantes dos valores encontrados para estes sistemas na literatura, para campos de 0,47 T e 1,5 T [6, 7, 37, 40].

6. CONCLUSÕES

Foram analisados oito sistemas de nanopartículas, sintetizados pelo método da coprecipitação ou por Stöber, resultando em nanopartículas recobertas com dextran e com óxido de silício. As análises por espectrofotometria e relaxometria indicaram soluções de nanopartículas com concentração de ferro variando entre 1,44 a 11,2 mg/mL, dependendo da síntese.

As curvas de magnetização das nanopartículas não apresentaram magnetização residual quando o campo magnético foi removido e nem histerese, indicando comportamento superparamagnético. Com essas medidas, foi possível obter a magnetização de saturação dos diferentes sistemas, variando entre 3,8 a 61,6 emu/g.

Os resultados de difração de raios X demonstraram um núcleo de óxido de ferro cristalino composto por magnetita e maguemita, com diâmetros médios em torno de 6,5-11,3 nm. Corroborando os resultados de difração, a espectroscopia Raman demonstrou picos característicos da magnetita, com uma banda principal centrada em 668 cm^{-1} (A_{1g}) e outra banda em 306 cm^{-1} (E_g). Medidas de ZFC/FC demonstraram uma distribuição das temperaturas de bloqueio das nanopartículas não excedendo 50 K, com uma temperatura de bloqueio média de 25 K.

As medidas de tempos de relaxação T1 e T2 mostraram efeitos de contraste das nanopartículas, reduzindo os tempos de relaxação T1 e T2 e aumentando as taxas de relaxação. A aglomeração das nanopartículas na síntese sem recobrimento demonstrou um aumento das relaxividades. O recobrimento com dextran reduziu as relaxividades, devido a um afastamento das moléculas de água ao núcleo magnético. A presença do fluoróforo não influenciou nas relaxividades das nanopartículas e a encapsulação com o silício demonstra uma diminuição na

relaxividade r_1 , atribuída a rigidez do encobrimento, impossibilitando a difusão das moléculas de água perto do núcleo magnético. Os valores da taxa de relaxação r_1 variaram de 0,42 a 47,34 (mMs)⁻¹ e para r_2 de 26,94 a 358,25 (mMs)⁻¹.

A razão entre as relaxividades r_2/r_1 encontradas para as sínteses e para o agente de contraste Lumirem variaram de 3,13 a 64,14. Os valores de relaxividade das nanopartículas de óxido de ferro obtidas estão dentro dos valores esperados para agentes de contraste compostos por óxido de ferro, podendo ser utilizadas como agente de contraste do tipo T2. Em razão das características físico-químicas da síntese, maior estabilidade coloidal, tamanho do núcleo, tamanho hidrodinâmico, magnetização de saturação e razão entre as relaxividades a que se mostrou mais promissora para uso como agente de contraste foi a síntese SPION-DLC-NH₂.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

No decorrer deste trabalho, visou-se a caracterização física de nanopartículas e testes para seu uso como agente de contraste em MRI, puramente no âmbito experimental. Esse tipo de sistema demonstra um ótimo efeito de contraste nas imagens de MRI, mas os mecanismos moleculares pelos quais esses efeitos ocorrem ainda não são muito claros, principalmente na relaxação transversal. Diversos modelos teóricos foram propostos para resolver tal problema, mas não há um modelo único que explique os diversos sistemas e comportamentos apresentados.

Portanto, para uma análise complementar desses sistemas, propõe-se, em trabalhos futuros, a realização de simulações de Monte Carlo que corroborem os resultados experimentais. Além disso, perfis de dispersão da relaxação magnética nuclear (NMRD, do inglês *Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion*), também são importantes para demonstrar como esses sistemas se comportam em diferentes campos magnéticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] McCARTHY, J. R.; KELLY, K. A.; SUN, E. Y.; WEISSLEDER, R. **Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles.** *Nanomedicine* 2, 153-167 (2007).
- [2] YALLAPU, M. M. et. al. **PEG-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging Applications.** *Pharm Res* 27:2283–2295 (2010).
- [3] AMIRI, H. et. al. **Alzheimer’s Disease: Pathophysiology and Applications of Magnetic Nanoparticles as MRI Theranostic Agents.** *ACS Chem. Neuroscience*, 4, 1417–1429 (2013).
- [4] BAEZA, A.; ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. **Thermoseeds for interstitial magnetic hyperthermia: from bioceramics to nanoparticles.** *J. Phys.: Condens. Matter* 25 (2013).
- [5] LAURENT, S. et. al. **Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications.** *Chem. Rev.* 108, 2064-2110 (2008).

-
- [6] WANG, Y. X. J.; HUSSAIN, S. M.; KRESTIN, G. P. **Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging**. *European Radiology*: v. 11, p. 2319-2331, 2001.
- [7] GOSSUIN, Y.; GILLIS, P.; HOCQ, A.; VUONG, Q. ROCH, A. **Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles**. *Advanced Reviews*: v. 1, p. 299-310, 2009.
- [8] COROT, C. et. al. **Superparamagnetic Contrast Agents**, in *Molecular and Cellular MR Imaging* (editado por M. M. J. Modo e J. W. M. Bulte). CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [9] PANKHURST, Q. A. et. al. **Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine**. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R167–R181.
- [10] McCARTHY, J. R. **The future of theranostic nanoagents**. *Nanomedicine* 4, 639-695 (2009).
- [11] SERVICE, R.F. **Nanotechnology Takes Aim at Cancer**. *Science* 310, 1132-1134, 2005.
- [12] WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J. **Imaging in the era of molecular oncology**. *Nature* 452. 580-589, 2008.

-
- [13] HAGLUND, E.; SEALE-GOLDSMITH, M.; LEARY, J. F. **Design of Multifunctional Nanomedical System.** *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 37, No. 10, October 2009 pp. 2048–2063.
- [14] DAVIS, M. E. et. al. **Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer.** *Nature Reviews Drug Discovery* 7. pp. 771-782 (2008)
- [15] NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. **Nanotechnology Applications in Cancer.** *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007. 9:257–88 (2007).
- [16] CAI, W.; CHEN, X. **Nanoplataforms for Targeted Molecular Imaging In Living Subjects.** *Small* 3, pp. 1840-1854. (2007).
- [17] CORR, S. A.; RAKOVISH, Y. P.; GUN'KO, Y. K. **Multifunctional Magnetic-fluorescent Nanocomposites for Biomedical Applications.** *Nanoscale Res Lett* 3 pp. 87–104 (2008).
- [18] JIN, R.; et. al. **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: design considerations and clinical applications.** *Current Opinion in Pharmacology.* pp. 18-27 (2014).
- [19] OLIVEIRA, E. M. N. **Desenvolvimento de sondas nanoestruturadas de óxido de ferro para imageamento biomédico não invasivo.** Porto Alegre. 2014. 123p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

-
- [20] OLIVEIRA, E. M. N. et. al. Iron Oxide Nanoparticles Labeled with an Excited State Intramolecular Proton Transfer Dye. **ChemPhysChem**. 2016, 17, 1 – 6.
- [21] BLOCH, F. et al. The nuclear induction experiment. **Physical Review**, New York, v.70, n.7-8, p.474-485, 1946.
- [22] HUETTEL, S. A. SONG, A. W. MCCARTHY. **Functional Magnetic Resonance Imaging**. 2^a ed. Sunderland: Sinauer, 2009, 542p.
- [23] HASHEMI, R.H.; BRADLEY, W. G. **MRI The Basics**. 1^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 307p.
- [24] STOREY, P. Introduction to Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. In: **Magnetic Resonance Imaging: Methods and Biologic Applications**. Totowa, 2006, p. 3-57.
- [25] ÁVILA, L.F. **Física em ressonância magnética**. Parte A. São Paulo: Videoteca da Sociedade Brasileira de Radiologia, 2001. [Fita de Vídeo].
- [26] COLNAGO, L. A.; MORAES, T. B. Simulação de sinais de RMN através das equações de Bloch. **Química Nova**. São Carlos, v. 37, n. 8, jul, p. 1410-1416, 2014.
- [27] AAPM/RSNA PHYSICS TUTORIAL FOR RESIDENTS. RadioGraphics. Fundamental Physics of MR Imaging. Jacksonville, 2005. 12p.

[28] JASANOFF, A. Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: An Overview. In: **Cancer Imaging: Lung and Breast Carcinomas**. San Diego, 2008, v. 1, p. 63-77.

[29] VARGAS, E. R.; CHEN, J. W. Magnetic Resonance Imaging Agents. In: **Molecular Imaging: Principles and Practice**. Shelton, CT, 2010, p. 389-404.

[30] Reino Unido. European Medicines Agency. Science Medicines Health. Assesment report for Gadolinium-containing contrast agents. Londres: União Européia, 2010. 13 p.

[31] Magnevist. Wayne, New Jersey: Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc., 2007. Bula de remédio.

[32] TANG, J.; et. al. Macromolecular MRI contrast agents: Structures, properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 462-502, 2013.

[33] Gadovist. Dra. Dirce Eiko Mimura. São Paulo: Bayer S.A., 2014. Bula de Remédio.

[34] OptiMARK. Giselle Priscila Parada Coelho. São Paulo: Mallinckrodt do Brasil Ltda., 2014. Bula de Remédio.

[35] OptiMARK. St. Louis: Mallinckrodt Inc., 1998. Bula de Remédio.

-
- [36] HUANG, J.; et. al. Improving the Magnetic Resonance Imaging Contrast and Detection Methods with Engineered Magnetic Nanoparticles. **Theranostics**, p. 86-102, 2012.
- [37] TSOURKAS, A.; JOSEPHSON, L. Magnetic Nanoparticles. In: **Molecular Imaging: Principles and Practice**. Shelton, CT, 2010, p. 523-541.
- [38] PATAGIOTOPOULOS, N.; et. al. Magnetic particle imaging: current developments and future directions. **International Journal of Nanomedicine** 2015:10 3097–3114.
- [39] MAHMED, N.; HECZKO, O.; LANCOK, A.; HANNULA, S.P. The magnetic and oxidation behavior of bare and silica-coated iron oxide nanoparticles synthesized by reverse co-precipitation of ferrous ion (Fe^{2+}) in ambient atmosphere. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**: v. 353, p. 15–22, 2014.
- [40] VUONG, Q. L.; GILLIS, P.; ROCH, A.; GOSSUIN, Y. Magnetic resonance relaxation induced by superparamagnetic particles used as contrast agents in magnetic resonance imaging: a theoretical review. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**. v. 9, p. 1–22, 2017.
- [41] GOYA, G. F.; BERQUÓ, T. S.; FONSECA, F. C. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. **Journal of Applied Physics**. Vol. 94, no. 5 (2003). 3520-3528.

[42] LEAL, B. C.; et. al. Interacting Superparamagnetic Iron(II) Oxide Nanoparticles: Synthesis and Characterization in Ionic Liquids. **Inorganic Chemistry**. 2016, 55, 865-870.

[43] WELLER, M.; OVERTON, T.; ROURKE, J.; ARMSTRONG, F. Química Inorgânica. In: **Métodos físicos em química inorgânica**. Bookman, 2017, p. 234-269.

[44] GILLIS, P.; KOENIG, S. H. Transverse Relaxation of Solvent Protons Induced by Magnetized Spheres: Application to Ferritin, Erythrocytes and Magnetite. **Magnetic Resonance in Medicine**. 5, p. 323-345 (1987).

[45] ROSEN, J. E. et. al. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. **Nanomed-Nanotechnol**. 2012; 8: 275-290.

[46] MOHAMMAD-BEIGI, H. et. al. Effect of pH, citrate treatment and silane-coupling agent concentration on the magnetic, structural and surface properties of functionalized silica-coated iron oxide nanocomposite particles. **Physica E**. 2011, 44, 618-627.

[47] DIGIGOW, R. G. et. al. Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2014, 362, 72–79.

[48] STÖBER, W., FINK, A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**. 1968, 26, 62-69.

-
- [49] DENG, Y.H. et. al. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol–gel approach. **Colloids and Surfaces A**. 2005, 262, 87–93.
- [50] BOUTRY, S.; FORGE, D.; BURTEA, C.; MAHIEU, I.; MURARIU, O; LAURENT, S.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. How to quantify iron in aqueous or biological matrix: a technical note. **Contrast Media Mol. Imaging**, v. 4, p. 299-304, 2009.
- [51] HENOUMONT, C.; LAURENT, S.; ELST, L. V. How to perform accurate and reliable measurements of longitudinal and transverse relaxation times of MRI contrast media in aqueous solutions. **Contrast Media Mol. Imaging**, v. 4, p. 312-321, 2009.
- [52] PINNA, N. et. al. Magnetic Nanocrystals: Nonaqueous Synthesis, Characterization and Solubility. **Chem. Mater**. 2005, 17, 3044-3049.
- [53] SHEBANOVA, O. N.; LAZOR, P. Raman spectroscopy study of magnetite (FeFe_2O_4): a new assignment for the vibrational spectrum. **Journal of Solid State Chemistry**. 174, (2003), 424–430.
- [54] CULLITY, B. D. **Elements of X-rays Diffraction**. v. 1. 3^o ed., Addison-Wesley Publishing Co. Inc., USA, 1967, pp. 531.
- [55] CORNELL, M. R.; SCHWERTMANN, U. **The oxides-structure, properties, reaction, occurrences and uses**. 2^o ed. Freising, Wiley-VHC, 2003. 664 p.

[56] SMOLENSKY, E. D. et. al. Scaling Laws at the Nano Size: The Effect of Particle Size and Shape on the Magnetism and Relaxivity of Iron Oxide Nanoparticle Contrast Agents. **J Mater Chem B Mater Biol Med**. 2013 June 14; 1(22): 2818–2828.

[57] JOSHI, H. M. et. al. Effect of silica shell thickness of Fe₃O₄-SiO_x core-shell nanostructures on MRI contrast. **Contrast Media Mol. Imaging**. 2012; 7(5): 460-468.

[58] BRUVERA, I. J.; ZÉLIS, P. M.; CALATAYUD, M. P.; GOYA, G. F.; SÁNCHEZ, F.H. Determination of the blocking temperature of magnetic nanoparticles: The good, the bad and the ugly. **Journal of Applied Physics**. 118, 184304 (2015).

[59] TOURNUS, F.; TAMION, A. Magnetic susceptibility curves of a nanoparticle assembly II. Simulation and analysis of ZFC/FC curves in the case of a magnetic anisotropy energy distribution. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 323 (2011) 1118-1127.

[60] LIMA, F. A. P. **Síntese e caracterização de nanoestruturas magnéticas como agente de contraste em imagens biomédicas**. Porto Alegre. 2012. 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

[61] CAPAVERDE, A. S. **Desenvolvimento de um Dispositivo de Teste Dinâmico para Avaliação da Estabilidade de Imagens de Ressonância Magnética Funcional**. Porto Alegre. 2014. 121 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

[62] LACONTE, L. E. W. et. al. Coating Thickness of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Affects R_2 Relaxivity. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**. 26:1634-1641 (2007).



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