

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Hulder Henrique Zaparoli

**Utilização de Nanopartículas de Zinco em Fantoma Encefálico Para Simulação de
Lesões em Imagens de Ressonância Magnética**

Bauru

2022

Hulder Henrique Zaparoli

**Utilização de Nanopartículas de Zinco em Fantoma Encefálico Para Simulação de
Lesões em Imagens de Ressonância Magnética**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado à Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como requisito parcial para a obtenção
do título de Bacharel em Física de Materiais

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Marina Piacenti da Silva

Bauru

2022

Z35u

Zaparoli, Hulder Henrique

Utilização de nanopartículas de zinco em fantoma encefálico para
simulação de lesões em imagens de ressonância magnética / Hulder Henrique

Zaparoli. -- Bauru, 2022

47 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Física) - Universidade
Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientadora: Marina Piacenti da Silva

Coorientadora: Marcela de Oliveira

1. Nanomateriais. 2. Física médica. 3. Ressonância magnética. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho de conclusão de curso a todos que fizeram parte da minha vida pessoal e acadêmica durante esses quatro anos de graduação.

Primeiramente, agradeço a Deus, que foi meu conselheiro e meu deu forças nos momentos difíceis do meu curso, me fez persistir, acreditar em mim mesmo, me ajudando em todas as minhas conquistas e decisões, conseguindo, assim, chegar ao final dessa graduação com muita felicidade.

Aos meus pais e avós que me incentivaram e me ajudaram, por acreditarem em mim e fornecerem todo suporte necessário para minha formação.

A todos da turma 2018, em especial a Daniela; Denisson; Isis; João; Juliana e Silvio, amigos que conheci e vou levar para vida toda, e jamais esquecer dos momentos incríveis que passamos juntos e por terem me aturado durante toda a graduação, com conselhos, incentivos, motivação, trabalhos em grupo, viagens com a turma e provas. Todos tiveram um papel fundamental nessa jornada e, sem eles, seria impossível chegar até onde cheguei.

A todos os professores que se dedicaram em ensinar, por compartilhar sabedoria e transmitir os conteúdos das disciplinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), juntamente com a UNESP, que proporcionaram oportunidades incríveis como fazer iniciação científica e ser professor de física de um cursinho pré-vestibular. Além de todas as semanas da física, workshops, congressos, simpósios e apresentações de trabalho que contribuíram para minha formação acadêmica.

A todos do Grupo de Física Aplicada à Medicina e Nanotecnologia (GFAMN) por todo aprendizado e conhecimento que adquiri durante toda minha iniciação científica com minha pesquisa. Em especial, gostaria de agradecer a duas mulheres incríveis que me acompanharam durante meus dois últimos anos de graduação, minhas orientadoras, Marina Piacenti da Silva e Marcela de Oliveira. Obrigado por todo ensinamento, puxão de orelha, orientação, incentivo, confiança, conselhos, amizade, trabalhos e conquistas que alcançamos até aqui. Saibam que tudo que conquistei até hoje, não seria possível sem vocês. Meus mais sinceros agradecimentos e admiração por vocês e se Deus quiser juntos teremos muito mais conquistas.

Meu mais sincero obrigado a todos!

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune caracterizada por causar danos na bainha de mielina, que ao se danificarem prejudicam a condução eficiente de impulsos neurais. A causa da EM engloba fatores genéticos e ambientais que contribuem para o risco da doença. Embora se acredite que esta doença seja multifatorial em etiologia, estudos apontam para um papel conjunto da exposição ambiental a metais pesados, a suscetibilidade a genes associados à resposta imune e o subsequente desenvolvimento da EM. Dentre os possíveis metais envolvidos como agentes externos causadores da esclerose múltipla, encontra-se o Zinco (Zn), pois este elemento pode desempenhar um papel significativo na patogênese da EM, caracterizado pela sua alta concentração no sistema nervoso central e do seu envolvimento na fisiologia do cérebro. Assim, a interrupção da homeostase do Zn pode estar associada ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

O principal exame utilizado para detectar alterações encefálicas em pacientes com esclerose múltipla é a imagem por ressonância magnética (MRI). Na imagem, a EM é caracterizada por apresentar lesões encefálicas onde ocorre o processo de neurodegeneração. Estudos em MRI buscam incluir o mapeamento quantitativo de marcadores, além de uma avaliação qualitativa da imagem. Embora o mapeamento quantitativo de marcadores como metais possa aumentar significativamente a quantidade, a confiabilidade e a comparabilidade dos dados obtidos em imagens médicas, exige-se padronização cuidadosa dos protocolos e o desenvolvimento de objetos de referência padrão ou estruturas de calibração (fantomas) para validar a precisão dessas medições *in vivo* e avaliar a capacidade de repetição e reprodutibilidade das medidas nas imagens. Assim, esse trabalho tem como propósito a identificação de metais nas imagens de ressonância magnética obtidas utilizando um objeto simulador (fantoma) de encéfalo.

Palavras-chaves: Nanopartículas de ZnO, Fantoma encefálico, Simulação de Lesões, Imagem de Ressonância Magnética.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by damage to the myelin sheath, which when damaged impairs the efficient conduction of neural impulses. The cause of MS encompasses genetic and environmental factors that contribute to the risk of the disease. Although this disease is believed to be multifactorial in etiology, studies point to a joint role of environmental exposure to heavy metals, susceptibility to genes associated with the immune response, and the subsequent development of MS. Among the possible metals involved as causative external agents in multiple sclerosis is Zinc (Zn), as this element may play a significant role in the pathogenesis of MS, characterized by its high concentration in the central nervous system and its involvement in brain physiology. Thus, disruption of Zn homeostasis may be associated with the development of neurodegenerative diseases.

The main test used to detect brain changes in patients with multiple sclerosis is magnetic resonance imaging (MRI). On imaging, MS is characterized by having brain lesions where the process of neurodegeneration occurs. MRI studies seek to include quantitative marker mapping in addition to qualitative image assessment. Although quantitative mapping of markers such as metals can significantly increase the quantity, reliability and comparability of data obtained in medical imaging, careful standardization of protocols and the development of standard reference objects or calibration structures (phantoms) is required to validate the accuracy of these measurements in vivo and to assess the repeatability and reproducibility of measurements on images. Thus, the purpose of this work is to identify metals in magnetic resonance images obtained using a brain phantom.

Keywords: ZnO Nanoparticles, Brain phantom, Lesion Simulation, Magnetic Resonance Imaging.

Hulder Henrique Zaparoli

Utilização de Nanopartículas de Zinco em Fantoma Encefálico Para Simulação de Lesões em Imagens de Ressonância Magnética

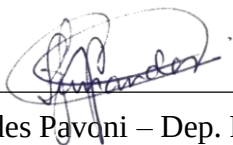
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Física de Materiais.

Aprovado em: 28 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Américo Sheitiro Tabata – Dep. Física FC Unesp



Juliana Fernandes Pavoni – Dep. Física USP/Ribeirão Preto



Luis Vicente de Andrade Scalvi – Dep. Física FC Unesp

Marina Piacenti
da Silva

Assinado de forma digital por
Marina Piacenti da Silva
Dados: 2023.03.16 10:03:17 -0400

Marina Piacenti da Silva – Dep. Física FC Unesp

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sequências de pulso T1, T2 e FLAIR de RM geralmente usadas em pacientes com EM. Os retângulos vermelhos características da EM são claramente melhor visualizados nas sequências de pulso FLAIR.....	14
Figura 2 – Representação de um equipamento de Ressonância Magnética	15
Figura 3 – Comparação do próton de hidrogênio a um pequeno dipolo magnético.	16
Figura 4 – Núcleos de Hidrogênio: a) com e sem a presença de um campo externo e b) <i>spin-up</i> , <i>spin-down</i> e diferença de energia entre os dois níveis de energia.	16
Figura 5 – Movimento de Precessão do átomo de Hidrogênio.	17
Figura 6 – Representação do Vetor de magnetização líquida.	17
Figura 7 – Curva exponencial: a) T1, característica do tecido, que consiste no tempo que leva para que a magnetização longitudinal se recupere em 63%. b) T2, característico do tecido, que consiste no tempo que leva para que a magnetização transversal diminua para 37%	19
Figura 8 – Representação do tempo de eco (TE) e do tempo de repetição (TR)	19
Figura 9 – Representação do sinal de indução livre	20
Figura 10 – Representação do espaço K.....	21
Figura 11 – Esquema simplificado de uma sequência de pulso Spin Eco (SE)	22
Figura 12 – Esquema simplificado da sequência de pulso FLAIR	23
Figura 13 – Fluxograma da síntese e caracterização das nanopartículas de zinco.	27
Figura 14 – Objeto simulador/fantoma; a) representação esquemática e b) foto real.....	28
Figura 15 – Indicações no objeto simulador para o procedimento experimental com as partículas de Zn.	29
Figura 16 – a) Equipamento de Ressonância Magnética b) fantoma posicionado no equipamento para realização do exame.	30
Figura 17 – a) Imagem original de RM, b) filtro de correção, e c) imagem corrigida	32
Figura 18 – Etapas da síntese das NPs- ZnO. A) Solução com ZnO amorfo, água Mili-Q, ácido nítrico e ácido cítrico. B) Processo de evaporação. C) Processo de cristalização. D) Pós cristalização. E) Mufla elétrica para realização do tratamento térmico. F) NPs-ZnO obtidas.	32
Figura 19 – a) Padrão DRX das nanopartículas de ZnO sintetizadas. b) Estrutura wurtzite de ZnO	33
Figura 20 – Espectros de FTIR das nanopartículas de ZnO	34
Figura 21 – Equipamentos utilizados para realização da microscopia eletrônica de varredura a) Equipamento MEV, b) metalizadora Quorum, modelo Q150R ES e c) Amostras devidamente posicionadas para recobrimento metálico.	35

Figura 22 – Estruturas das nanopartículas de ZnO obtidas a partir da caracterização por MEV de três amostras diferentes a, b e c.....	36
Figura 23 – Análise das regiões a, b e c nas nanopartículas de óxido de zinco com seus respectivos espectros e porcentagem atômica e massa dos elementos químicos presentes.	37
Figura 24 – Imagem de RM obtidas da sequência axial FLAIR dos cinco experimentos realizados. A seta vermelha indica o gadolínio como substância padrão de controle e os orifícios do fantoma numerados de 1 a 9.....	38
Figura 25 – Curvas de calibração relacionando a taxa de relaxação $1/T_1$ (ms^{-1}) com o aumento da concentração da Solução Padrão de Zn (μl).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de ZnO utilizadas nos exames de RM.	29
Tabela 2 – Protocolo das sequências realizadas para obtenção das MRI do Fantoma.	31
Tabela 3 – Valor do pixel para cada orifício nos cinco exames normalizados pela intensidade de sinal da água.....	38
Tabela 4 – Protocolo de RM e seus respectivos parâmetros de aquisição.	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
1.1 Doenças Neurodegenerativas e a Esclerose Multipla	12
1.2 Papel do Zinco na Esclerose Multipla	13
1.3 Exame de Ressonância Magnética.....	14
1.4 Princípios Físicos e Formação da imagem de RM	15
1.5 Sequências de Pulsos	21
1.6 Anatomia cerebral na Esclerose Múltipla.....	23
1.7 Mapeamento quantitativo de metais	24
2. OBJETIVOS	25
3. METODOLOGIA.....	25
3.1 Síntese das nanopartículas de ZnO	25
3.2 Caracterização das nanopartículas	26
3.3 Preparo do objeto simulador do encéfalo	28
3.4 Obtenção das imagens de RM	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ZnO	32
4.2 Avaliação da presença de nanopartículas nas imagens.....	37
4.3 Construção de uma curva de calibração	40
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Doenças Neurodegenerativas e a Esclerose Múltipla

As doenças neurodegenerativas podem ser classificadas de acordo com características clínicas primárias, a distribuição anatômica da neurodegeneração ou sua anormalidade molecular principal. São caracterizadas inicialmente por episódios de déficits neurológicos reversíveis, que geralmente são seguidos por deterioração neurológica progressiva, afetando a substância cinza do cérebro e as funções ligadas a substância branca, como por exemplo a Esclerose Múltipla (EM) (FILIPPI et al., 2018).

A EM é uma doença neurológica crônica, degenerativa, autoimune e desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), que afeta o cérebro e a medula espinhal, danificando a bainha de mielina, o material que envolve e protege as células nervosas (CHOI; JUNG; SUH, 2017). A doença possui distribuição mundial, sendo mais comum em indivíduos caucasianos, acometendo principalmente mulheres e indivíduos na faixa etária de 15 a 50 anos, rara nos extremos de idade, levando a disfunções motoras como paralisias dos membros superiores e inferiores e distúrbios sensitivos (LERAY et al., 2016). Segundo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, até 2016 essa doença atingia cerca de 35 mil pessoas no país (ABEM - Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, 2020).

A constituição da placa esclerosada é a principal característica da EM que corresponde a etapa final de um processo que envolve a inflamação, desmielinização e remielinização, o esgotamento de oligodendrócitos e astrócitos e a degeneração neuronal do axônio (CASTRO, 2016).

O prognóstico da doença é variável e seu curso imprevisível. Sua etiologia é complexa e multifatorial, que depende da interação de diversos componentes genéticos e fatores ambientais. Vários fatores de risco ambiental são estudados, tais como poluição, infecção pelo vírus Epstein-Barr e tabagismo, mas apesar de as causas da EM serem amplamente conhecidas, ainda não existem fatores de risco bem estabelecidos para auxiliar na prevenção da doença (BELBASIS et al., 2015).

Embora se acredite que a EM seja multifatorial em etiologia, estudos recentes mostram um possível papel da exposição ambiental a metais pesados e a suscetibilidade a genes associados a uma resposta imune e o subsequente desenvolvimento de diversas doenças neurológicas, incluindo a EM (BREDHOLT; FREDERIKSEN, 2016; ELITT; FAHRNI; ROSENBERG, 2019; NAPIER et al., 2016; ORABY et al., 2019; TAMBURRO et al., 2015).

Assim, trabalhos baseados em estudos de concentração de metais em amostras cerebrais

relacionando o possível papel da exposição de metais na etiologia de diversas doenças neurológicas, incluindo a EM, tem contribuído para o melhor conhecimento de suas causas (DE OLIVEIRA et al., 2020; GROCHOWSKI et al., 2019).

1.2 Papel do Zinco na Esclerose Múltipla

Dentre os possíveis metais envolvidos como agentes externos causadores da EM o elemento de interesse neste trabalho foi o zinco (Zn), um oligoelemento essencial para a vida humana.

O Zn é crucial para o desenvolvimento do sistema nervoso, a mielinização das fibras nervosas e a excitabilidade neuronal. É componente de sistemas enzimáticos envolvidos em funções celulares primordiais, fatores de transcrição e proteínas, incluindo a proteína básica da mielina e metaloproteinases de matriz (MMPs) (BREDHOLT; FREDERIKSEN, 2016; ORABY et al., 2019). A homeostase do Zn é essencial para várias vias biológicas e sua interrupção pode impactar diversos processos do sistema nervoso, como na patologia de algumas doenças neurodegenerativas (STRONG et al., 2020).

A relação entre o Zn e a imunopatogênese da EM é bastante complexa. A ideia de o Zn desempenhar um papel significativo na patogênese da EM pode surgir de sua alta concentração no SNC e do seu envolvimento na fisiologia do cérebro. Através de estudos que mostraram que a toxicidade relativa ao Zn facilita a proliferação de células T, células reativas que atravessam a barreira hematoencefálica liberam mediadores inflamatórios causando lesão neuronal e glial (CHOI; JUNG; SUH, 2017; VISCONTI et al., 2005).

Alterações no nível de Zn têm consequências no sistema nervoso, reprodutivo e imunológico. Através de análise de pacientes com EM verificou-se que níveis mais baixos de Zn sérico estão associados a maior incapacidade da doença (BREDHOLT; FREDERIKSEN, 2016). Nas últimas décadas, grupos de pesquisadores relacionaram o surgimento do estresse oxidativo, o principal mediador da neuro e glio-toxicidade do Zn, como a principal causa de EM, possibilitando a avaliação desse metal na patologia da doença (CHOI; JUNG; SUH, 2017).

Outra contribuição importante, realizado por, PIERRE et al., 2018, foi a análise do papel do transportador de Zn em fenótipos de imagem por RM, onde demonstraram que a intensidade de sinal do encéfalo pode ser alterada pela homeostase do Zn. Outro estudo também demonstrou que o Zn pode atingir concentrações que se encontram dentro de um gama de sensibilidade dos agentes de contraste, podendo ser mapeado por ressonância magnética (RM) (STRONG et al.,

2020).

1.3 Exame de Ressonância Magnética

O principal exame utilizado para detectar alterações encefálicas em pacientes com esclerose múltipla é a Imagem por Ressonância Magnética (MRI, do inglês: *Magnetic Resonance Imaging*) (THOMPSON et al., 2018).

A MRI apresenta grande sensibilidade para demonstração in vivo das lesões desmielinizantes no encéfalo e medula espinhal (BERNARDINO; CARVALHO, 2016; THOMPSON et al., 2018). A imagem comumente é obtida utilizando exames com sequências T1 pré e pós-gadolínio intravenoso, e sequências T2 ou FLAIR (do inglês *Fluid Attenuated Inversion Recovery*) para a localização das lesões, permitindo o adequado preenchimento dos critérios diagnósticos da doença (KLEIN, 2016).

As imagens observadas em T1 possuem um sinal de alta intensidade (hiperintenso) na substância branca saudável e um sinal de baixa intensidade (hipointenso) nas lesões, as quais possuem tons mais escuros conhecidos como *black holes* (BAKSHI et al., 2008). Já as imagens realizadas nas sequências T2 e FLAIR, em ambas as lesões escleróticas apresentam um sinal de alta intensidade, sendo assim visualizadas por um hipersinal na imagem. A diferença entre ambas é que na sequência T2 tanto a água como o líquido cefalorraquidiano (líquor) também apresentam um sinal de alta intensidade. Já a sequência FLAIR torna-se a sequência mais utilizada no diagnóstico da EM, pois consegue eliminar o sinal do líquido, atingindo níveis de contraste satisfatórios para a detecção de lesões (FARIAS, 2014). As sequências de pulso de RM típicas usadas em um ambiente clínico são mostradas na figura 1.

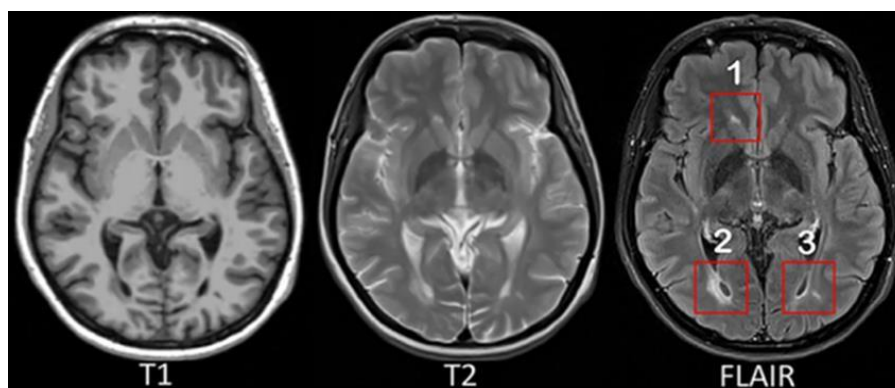


Figura 1: Sequências de pulso T1, T2 e FLAIR de RM geralmente usadas em pacientes com EM. Os retângulos vermelhos características da EM são claramente melhor visualizados nas sequências de pulso FLAIR (WEI et al., 2019).

As lesões de EM em pacientes, aparecem na maioria das vezes como lesões elípticas ou ovóides, particularmente na substância branca periventriculares, possuem localização "Dawson Fingers", apresentam bordas ou margens bem circunscritas e tamanhos que variam de 3 a 5 milímetros (PINTO, 2017). Para o diagnóstico e acompanhamento da EM, verifica-se na imagem elementos essenciais como: a disseminação espacial das lesões escleróticas (associada a surtos clínicos e expressando episódios inflamatórios agudos em áreas diversas do SNC); e a disseminação temporal (episódios acontecendo em momentos distintos na história da doença do paciente) (SANTOS, 2019).

1.4 Princípios Físicos da Formação da imagem de RM

A Ressonância Magnética (RM) é um exame que reproduz imagens de grande resolução e clareza de qualquer parte do interior do corpo humano, totalmente indolor e não utiliza radiação ionizante. A RM também pode demonstrar, com precisão e alta qualidade, lesões muito pequenas (BANGERTER; MORRELL; GRECH-SOLLARS, 2020).

A estrutura do equipamento de RM, conforme mostra o esquema na figura 2, possui alguns componentes fundamentais para o seu funcionamento, sendo eles: magneto, bobina de corpo, bobina de transmissão e de recepção de radiofrequência (RF), bobinas de gradiente, estação de trabalho e mesa para o exame (DÓRIA; PERLATO, 2016).

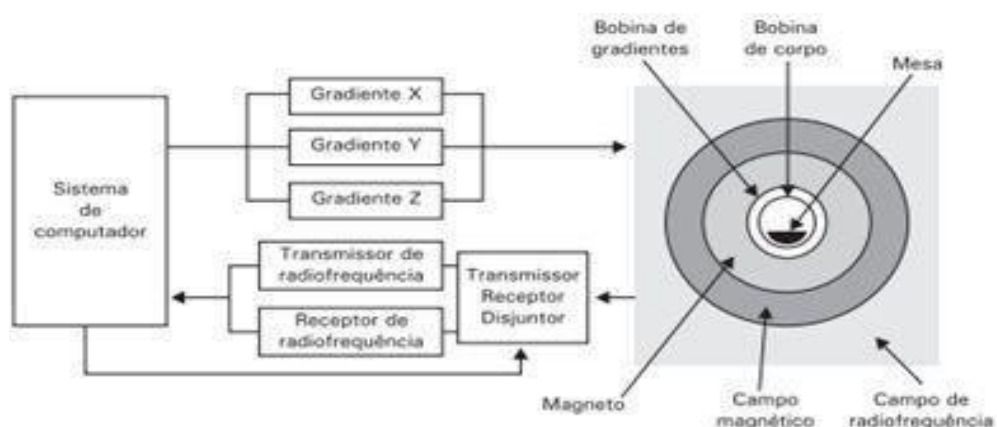


Figura 2: Representação de um equipamento de Ressonância Magnética (FERREIRA; NACIF, 2011).

O princípio de funcionamento da RM tem como base a estrutura atômica, com enfoque em átomos com núcleo constituído por número diferente de prótons e nêutrons. Além disso, a principal característica que um núcleo deve conter é possuir um momento magnético associado a um momento angular intrínseco, também denominado spin nuclear (HORE, 2015).

Dentre os átomos mais abundantes que compõem o tecido humano, o hidrogênio é o principal escolhido na RM em decorrência de alguns fatores tais como: o elemento mais abundante no corpo humano, possui um único próton em seu núcleo e possui a maior razão giromagnética dentre os demais átomos e assim, uma maior sensibilidade a um campo magnético externo (MAZZOLA, 2009). Os núcleos de hidrogênio (prótons), por possuírem um spin nuclear, se comportam como pequenos ímãs rotativos, representados por vetores (figura 3). A soma de todos os minúsculos momentos magnéticos de cada spin é chamada de magnetização líquida ou magnetização macroscópica (MAZZOLA, 2009).

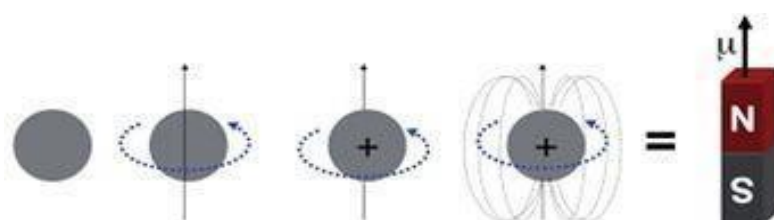


Figura 3: Comparação do próton de hidrogênio a um pequeno dipolo magnético (MAZZOLA, 2009).

Normalmente, a direção desses vetores é distribuída aleatoriamente, como mostrado na figura 4.a. os momentos magnéticos do núcleo de hidrogênio apresentam orientação aleatória, o que resulta em uma magnetização líquida nula (NASCIMENTO; BLOCH, 2001). Dentro de um grande campo magnético externo (B_0), momentos magnéticos do núcleo de hidrogênio que se alinham ao campo (figura 4.b). Alguns núcleos de baixa energia alinham seus momentos magnéticos paralelamente ao campo externo (*spin-up*) e os núcleos de alta energia se alinham de forma antiparalela com o campo (*spin-down*), como destacado na Figura 4.b. O núcleo de hidrogênio em si não muda de sentido, mas simplesmente gira em seu próprio eixo.

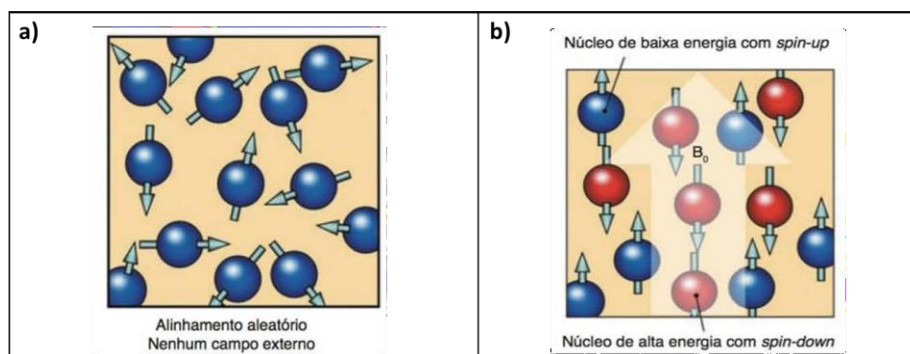


Figura 4: Núcleos de Hidrogênio: a) com e sem a presença de um campo externo e b) *spin-up*, *spin-down* e diferença de energia entre os dois níveis de energia (WESTBROOK; ROTH, 2011)

Cada núcleo de hidrogênio gira em torno de seu próprio eixo e com a aplicação de um campo magnético externo, os momentos magnéticos do hidrogênio adquirem uma rotação adicional ao redor do campo aplicado. Essa trajetória circular é chamada de precessão, ou seja, a rotação ou oscilação dos momentos magnéticos dos prótons em torno de seu eixo, como pode-se observar na figura 5. Essa trajetória é denominada precessional e sua velocidade ao redor do campo magnético é denominada de frequência precessional. A frequência de ressonância, chamada frequência de Larmor (ω_0) ou frequência de precessão, é proporcional à intensidade do campo magnético principal (SHAN; A WORTHOFF; FELDER, 2018).

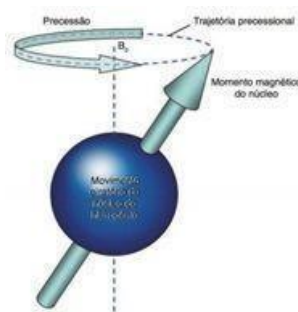


Figura 5: Movimento de Precessão do átomo de Hidrogênio (WESTBROOK; ROTH, 2011).

O vetor magnético de prótons em rotação pode ser dividido em dois componentes ortogonais: uma componente longitudinal ou Z e uma componente transversal, situado no plano XY, como o esquema da figura 6. A precessão corresponde à rotação do componente transversal em torno do eixo longitudinal (HAGE; IWASAKI, 2009). Dentro do campo magnético B_0 há mais spins alinhados com o campo do que spins alinhados contra o campo. Devido a este ligeiro excesso de spins paralelos, a magnetização líquida (M_0) tem um componente longitudinal (ao longo do eixo Z positivo) alinhado com B_0 (HAGE; IWASAKI, 2009).

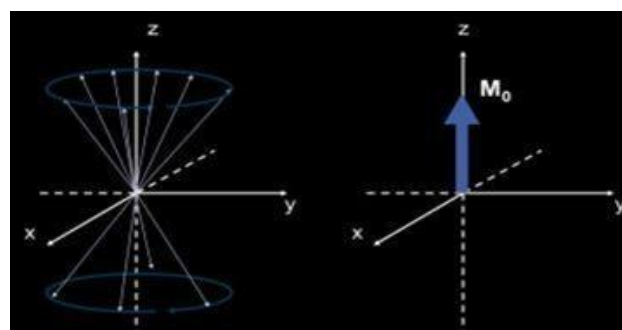


Figura 6: Representação do Vetor de magnetização líquida (MAZZOLA, 2009).

A troca de energia entre dois sistemas em uma mesma frequência específica é chamada de ressonância. A ressonância magnética corresponde à interação energética entre spins e radiofrequência eletromagnética (RF) (SILVA, 2011). Somente prótons que giram com a mesma frequência do pulso de RF eletromagnético responderão a esse pulso de RF. Há uma modificação do equilíbrio do spin e da absorção da energia eletromagnética pelos núcleos atômicos, que é chamada de excitação. Quando o sistema retorna deste estado de desequilíbrio para o equilíbrio (relaxamento), há uma emissão de energia eletromagnética (HENDEE; MORGAN, 1984).

O ângulo pelo qual o vetor de magnetização efetivo (VME) sai do alinhamento é chamado de ângulo de inclinação (*flip angle*) e depende da força e da duração do pulso de RF. Quando o pulso de RF é desligado, o VME tenta voltar ao plano longitudinal sob influência de B_0 , para isso, deve ocorrer uma perda de energia dos núcleos em spin-down, o qual lhes foi fornecida pelo pulso de RF, retornando à população de baixa energia alinhando seus momentos em spin-up (MACOMBER, 1998). Esse processo de perda de energia é denominado relaxamento. Durante o relaxamento, a energia eletromagnética é retransmitida e combinada em dois mecanismos diferentes: relaxamento longitudinal que corresponde à recuperação da magnetização longitudinal; e relaxamento transversal que corresponde ao decaimento da magnetização transversal (COWAN, 2005).

O relaxamento longitudinal é devido à troca de energia entre os spins e a rede circundante (relaxamento da rede de spin), restabelecendo o equilíbrio térmico. Conforme os spins vão de um estado de alta energia para um estado de baixa energia, a energia de RF é liberada de volta para a rede circundante. A recuperação da magnetização longitudinal segue uma curva exponencial. A taxa de recuperação é caracterizada pela constante de tempo T_1 específica do tecido. Conforme representado na figura 7.a, após o tempo T_1 , a magnetização longitudinal volta a 63% de seu valor final (ANDRADE, 2008).

O relaxamento transversal resulta de spins saindo de fase. Conforme os spins se movem juntos, seus campos magnéticos interagem (interação spin-spin), modificando ligeiramente sua taxa de precessão. Essas interações são temporárias e aleatórias. Assim, o relaxamento spin-spin causa uma perda cumulativa na fase, resultando na decadência da magnetização transversal (RIBEIRO, 2018). O decaimento da magnetização transversal é descrito por uma curva exponencial, caracterizada pela constante de tempo T_2 . Após o tempo T_2 , a magnetização transversal perdeu 63% de seu valor original (figura 7.b). O relaxamento transversal é mais rápido do que o relaxamento longitudinal. O tempo T_2 é específico do tecido, sempre menor

que T1 e não está relacionado à intensidade do campo (ANDRADE, 2008).

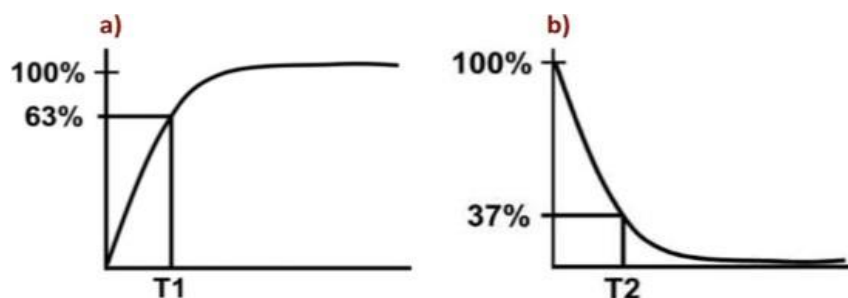


Figura 7: Curva exponencial: a) T1, característica do tecido, consiste no tempo que leva para que a magnetização longitudinal se recupere em 63% b) T2, característico do tecido, consiste no tempo que leva para que a magnetização transversal diminua para 37% (HILL, 2015).

Parâmetros de sincronização de pulsos são utilizados para explicar as combinações de pulsos de RF, sinais e período de recuperação intervenientes. Uma maneira simplificada de demonstrar a variedade de parâmetros de sincronização usados em sequências mais complicadas é a divisão do parâmetro em dois tempos medidos em milissegundos (ms). O primeiro denominado tempo de repetição (TR) que corresponde a intervalos de tempo desde a aplicação de um pulso de RF até a aplicação do pulso de RF seguinte, ou seja, corresponde ao relaxamento T1. Já o segundo, corresponde ao tempo de eco (TE) que é o intervalo de tempo desde a aplicação do pulso de RF até o pico máximo do sinal induzido na bobina, ou seja, corresponde ao decaimento T2 (WESTBROOK; TALBOT, 2018). A figura 8 representa a ocorrência desses dois tipos de pulsos, TE e TR.

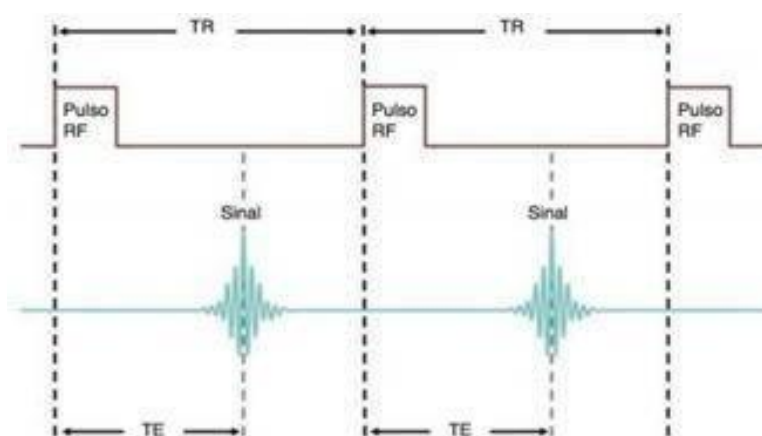


Figura 8: Representação do tempo de eco (TE) e do tempo de repetição (TR) (WESTBROOK; ROTH, 2011).

Para gerar a imagem de RM, um ponto importante é a formação de ecos, o qual é um processo natural que consiste na aplicação de um pulso de excitação de 90° (que transfere o vetor magnetização líquida para o plano transversal) e após um período de tempo t , um segundo pulso de excitação de 180° é enviado (que inverte a direção do vetor magnetização líquida e restaura a coerência de fase). Dos pulsos aplicados são captados dois sinais na bobina, o primeiro correspondente ao sinal de indução livre (SIL) e o segundo justamente o eco que ocorre em um tempo igual a $2t$, devido à refasagem dos momentos magnéticos induzidos pelo segundo pulso de excitação, podendo esse sinal ser controlado pelo tempo de aplicação dos mesmos (figura 9) (MAZZOLA, 2009).

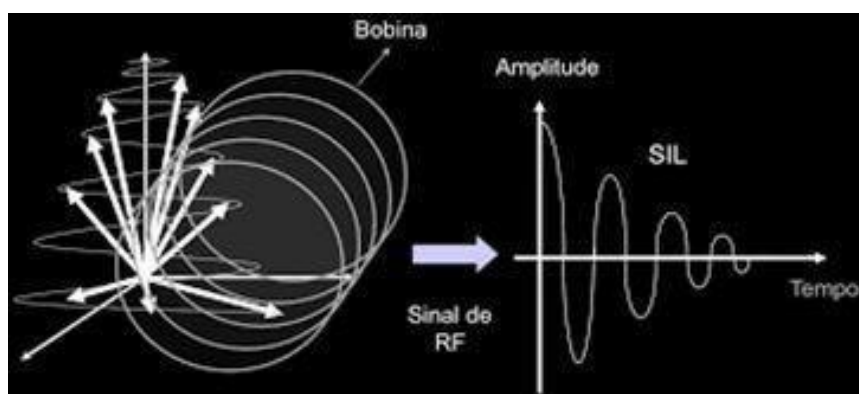


Figura 9: Representação do sinal de indução livre (MAZZOLA, 2009).

O sinal do SIL decai mais rápido do que T_2 poderia prever e diminui exponencialmente na constante de tempo T_2^* característica. Esta constante leva em consideração o relaxamento spin-spin específico do tecido e as não homogeneidades estáticas em campos magnéticos que aceleram a defasagem de spins (MAZZOLA, 2009).

A bobina receptora irá receber o sinal que contém informações de todo tecido da amostra que foi colocado dentro do campo magnético. Porém, não se pode identificar de que parte do tecido provém o sinal, deve-se então codificá-lo através do uso de gradientes especiais (MAZZOLA, 2009).

Existem três tipos de gradientes que atuam em direções diferentes, sendo cada um responsável pela modificação do campo magnético em uma direção e pela seleção de cortes axiais, sagitais e coronais. Os gradientes são utilizados tanto para o processo de defasagem quanto para refasagem dos momentos magnéticos do núcleo e também realizam três funções importantes no processo de seleção de corte, de codificação de fase e de codificação de frequência (ODÉEN; PARKER, 2019). O sinal coletado de cada corte estará mapeado em fase

e frequência. Utiliza-se um conceito abstrato de forma a auxiliar o processo de formação de imagem denominado espaço K. Este espaço consiste basicamente de uma matriz de pixels em tons de cinza, cujo número de linhas representam o gradiente de codificação de fase que varia sua amplitude para cada medida e o número de dados de cada linha representa o gradiente de codificação de frequências, ou seja, cada linha é preenchida com um eco (figura 10) (WESTBROOK; ROTH, 2011).

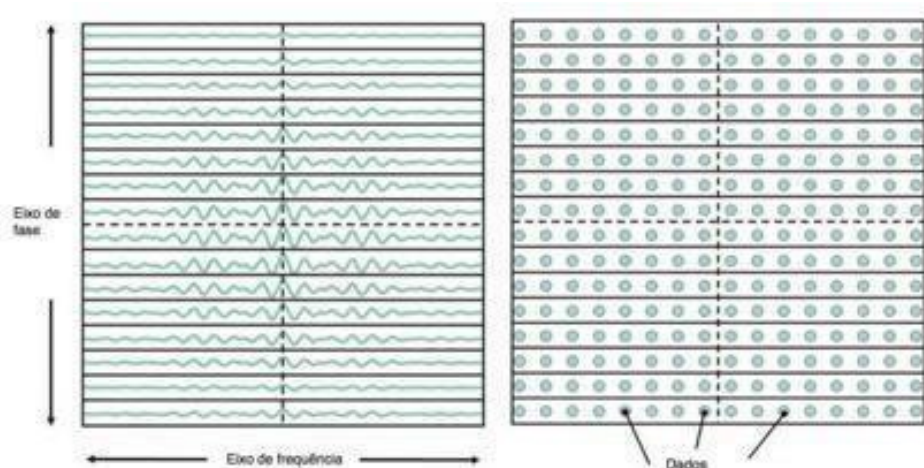


Figura 10: Representação do espaço K (WESTBROOK; ROTH, 2011).

Para a formação da imagem de RM em si é utilizada a transformada de Fourier (TF), que no espaço K passa o sinal do domínio do tempo para o domínio de frequências, obtendo a imagem de RM. Assim, cada pixel recebe uma cor em uma escala de cinza que corresponde à amplitude das frequências específicas vindas da mesma localização espacial representada pelo pixel (figura 10). Essa transformação é necessária visto que os gradientes localizam espacialmente o sinal de acordo com sua frequência, e não seu tempo (OLIVEIRA, 2008).

1.5 Sequências de Pulsos

Uma sequência de pulso é uma série de RF, aplicações de gradientes e intervalos de tempo de intervenção, ou seja, é uma série de eventos cuidadosamente coordenados que servem para gerar um tipo específico de contraste de imagem, no qual a qualidade e a ponderação da imagem são determinadas (BERNSTEIN; KING; ZHOU, 2004). Existem diferentes sequências de pulsos que são utilizadas para gerar uma imagem de RM. Dependendo da região do paciente que se queira analisar utiliza-se uma determinada sequência com aplicações e parâmetros mais adequados a fim de promover uma melhor análise do exame (BERNSTEIN; KING; ZHOU, 2004).

Cada sequência de pulso tem um propósito específico. Neste trabalho serão descritas as sequências de pulsos mais comuns utilizadas no protocolo da esclerose múltipla (NÓBREGA, 2006; WESTBROOK; TALBOT, 2018).

Essas sequências podem ser divididas em dois grupos. O primeiro grupo é denominado sequência de pulso spin-eco, neste caso os spins são defasados com um pulso de defasagem de 180° e as principais sequências utilizadas são: o spin-eco convencional, o spin-eco rápido ou turbo e a inversão-recuperação (WESTBROOK; TALBOT, 2018). O segundo grupo é instituído como sequências de pulso gradiente-eco, ou seja, diferente do primeiro grupo, neste caso os spins são defasados por um gradiente e as principais sequências são: o gradiente-eco coerente, o gradiente-eco incoerente, a precessão livre no estado estacionário, o gradiente-eco balanceado, o gradiente-eco rápido e a imagem ecoplanar (WESTBROOK; TALBOT, 2018). Cada caso tem três situações de sequenciamento: Saturação, recuperação do estado de saturação e recuperação de inversão.

Spin-eco convencional (SE): A sequência de pulso spin-eco convencional geralmente utiliza um pulso de excitação de 90° seguido por um ou mais pulsos de 180° que provocam a refasagem do vetor de magnetização líquida em direção do plano transversal para gerar o spin-eco (figura 11). Geralmente a produção de um eco pode ser empregada para a formação de uma imagem em T1, para isso emprega-se um tempo de eco (TE) e um tempo de repetição (TR) curtos (WESTBROOK; ROTH, 2011). No entanto, a produção de dois ecos é utilizada para a formação de imagens por densidade protônica (DP), neste caso o primeiro eco apresenta um TE curto e um TR longo, e imagens ponderadas em T2, que apresentam tanto TE como TR longos (WESTBROOK; ROTH, 2011).

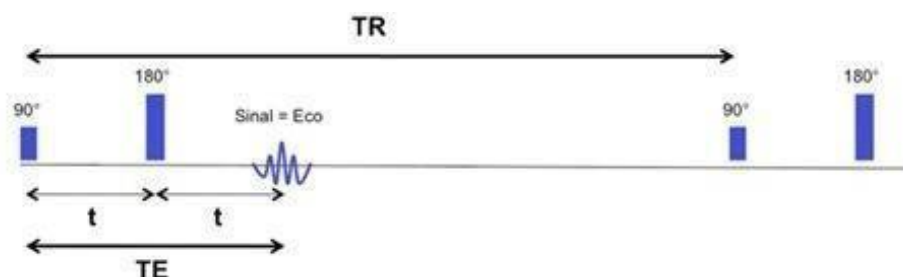


Figura 11: Esquema simplificado de uma sequência de pulso Spin Eco (SE) (MAZZOLA, 2009).

Essas sequências são denominadas “padrão-ouro”, pois são utilizadas na maioria dos processos de aquisição de imagem e empregadas em quase todos os tipos de exame por RM. A boa qualidade das imagens, a versatilidade, a identificação de contrastes a partir dos tempos de

relaxamento T1 e T2 dos tecidos, as imagens ponderadas em T1 úteis para mostrar a anatomia e as imagens ponderadas em T2 sensíveis à patologia são algumas das vantagens da eficácia da utilização da SE convencional, com ressalva no tempo de escaneamento ser relativamente longo em comparação a outras sequências (MAZZOLA, 2009).

FLAIR (fluid attenuated inversion recovery): A sequência FLAIR é uma variação da sequência de inversão-recuperação (IR). Essa sequência utiliza um tempo de inversão (TI) longo que corresponde a recuperação de 180° para o plano transversal removendo o sinal do líquido cefalorraquidiano (LCR) nas imagens resultantes. Conforme o esquema da figura 12, um pulso de RF é aplicado para cada TR, seguido por um pulso de excitação após um tempo de inversão de TI. Posteriormente, os dados são adquiridos por um período de leitura (T_{RO}), seguido por um tempo de recuperação (T_{rec}) (MADHURANTHAKAM et al., 2012). O tecido cerebral nas imagens FLAIR parece semelhante às imagens ponderadas em T2 com a substância cinzenta mais brilhante do que a substância branca, mas o LCR é escuro em vez de brilhante (NÓBREGA, 2006).

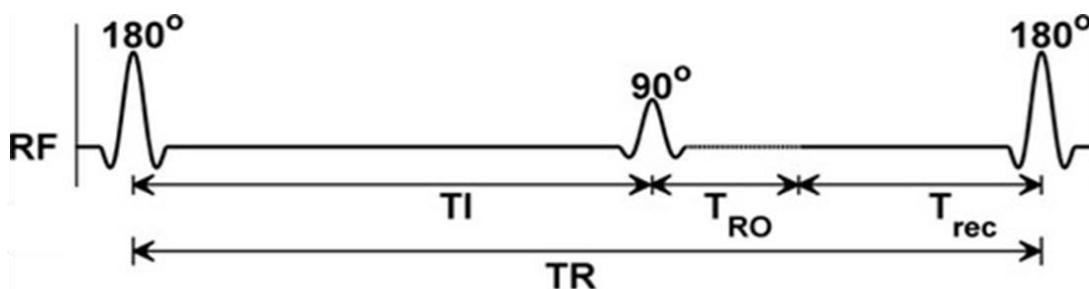


Figura 12: Esquema simplificado da sequência de pulso FLAIR (MADHURANTHAKAM et al., 2012).

1.6 Anatomia cerebral na Esclerose Múltipla

Estruturalmente o sistema nervoso é dividido em central (SNC) e periférico (SNP). Levando em consideração o objetivo deste trabalho, o sistema nervoso central é dividido em duas partes, a medula e o encéfalo. O encéfalo por sua vez, se divide em mais três partes constituídas pelo cérebro que se divide em telencéfalo e diencéfalo, o cerebelo e o tronco encefálico onde encontra-se o mesencéfalo, a ponte e o bulbo (TORTORA; DERRICKSON, 2016). O SN possui duas principais substâncias nervosas: branca e cinzenta estando relacionadas com a concentração de axônios, ou seja, microscopicamente, uma área que possui uma grande concentração de axônios é denominada de substância cinzenta (LIMA et al., 2006). Em contrapartida, a substância branca possui alguns tipos neuronais, como a células diaforase

positivas e uma grande quantidade de axônios mielinizados, estrutura condicionante do aspecto esbranquiçado (LIMA et al., 2006).

Outra substância importante no SNC é o LCR ou líquido e seus envoltórios (meninges). O LCR é formado dentro das cavidades ventriculares do SNC nos plexos coróides, onde são localizados o cerebelo e a coluna espinal dorsal e está presente nos ventrículos cerebrais e no espaço subaracnóideo. A principal função do LCR é a proteção mecânica que amortece o encéfalo e a medula espinal contra choques e pressão. Essa substância também tem a capacidade de flutuação, de defesa do SNC contra agentes infecciosos, de remover resíduos e de circular nutrientes, mantendo, assim, o dinamismo dos elementos nele presentes (ERRANTE et al., 2016).

Portanto, essas três principais substâncias são importantes para o entendimento da anatomia cerebral, juntamente com as funções cerebrais e também têm um papel fundamental na análise e entendimento das imagens de RM e na classificação dos tecidos e lesões provocadas pela esclerose múltipla.

1.7 Mapeamento quantitativo de metais

Assim como em outras modalidades de imagens médicas, estudos em MRI buscam incluir o mapeamento quantitativo de marcadores, além de uma avaliação qualitativa da imagem. Embora o mapeamento quantitativo de marcadores como metais possa aumentar significativamente a quantidade, a confiabilidade e a comparabilidade dos dados obtidos em imagens médicas, exige-se padronização cuidadosa dos protocolos e o desenvolvimento de fantasmas (objetos de referência padrão ou estruturas de calibração) para validar a precisão dessas medições *in vivo* e avaliar a capacidade de repetição e reprodutibilidade das medidas nas imagens (KEENAN et al., 2018).

O objeto simulador, também conhecido como fantoma, é um dispositivo amplamente utilizado na área de controle de qualidade e dosimetria de equipamentos de imagens médicas. São objetos de referência e calibração que garantem, em um controle de qualidade, a boa formação e reprodutibilidade da imagem (KEENAN et al., 2018). Esses equipamentos simulam características anatômicas, fisiológicas e biológicas de uma determinada região do corpo, permitindo simular uma área específica de interesse e o estudo de suas características (KEENAN et al., 2018; LAUBACH et al., 1998; MATTILA et al., 2007).

Dessa forma, o propósito desse trabalho foi a utilização de nanopartículas de ZnO (NPs-ZnO) para simulação de lesões de EM em um fantoma encefálico, possibilitando sua identificação nas imagens por ressonância magnética.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A partir do tema proposto anteriormente, este trabalho utilizou nanopartículas metálicas em um objeto simulador de encéfalo para simular lesões cerebrais ocasionadas por EM possibilitando sua identificação através de MRI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este objetivo foi alcançado por meio das seguintes etapas específicas:

- Síntese das nanopartículas de zinco a partir do processo de sol-gel e pó de óxido de zinco (ZnO) amorfo;
- Caracterização das nanopartículas de zinco utilizando técnicas de difração de Raios X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho com método de refletância total atenuada (FTIR ATR Vertex 70 – Bruker), microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e energia dispersiva de Raios X (EDX-MEV);
- Preparo das soluções com as nanopartículas e montagem do objeto simulador do encéfalo;
- Obtenção das MRI;
- Avaliação da presença de nanopartículas nas imagens.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese das nanopartículas de ZnO

As NPs-ZnO tiveram a finalidade de simular lesões escleróticas nas imagens de ressonância magnética. Elas foram produzidas seguindo procedimentos adaptados de (LA et al., 2019), obtidas usando o processo sol-gel e o pó amorfo de ZnO (Sigma-Aldrich) como precursor.

Inicialmente foi preparada em um béquer uma solução de 100 ml de água deionizada com 15 ml de ácido nítrico, levadas a um agitador magnético de 300 rpm a uma temperatura de aproximadamente 90°C, e gradualmente foi adicionado ao líquido 5,5 g ZnO amorfo. Em seguida, em outro béquer, preparou-se uma segunda solução composta por 5,5 g de ácido cítrico

em 190 ml de água deionizada. Os dois conteúdos líquidos foram misturados no béquer maior para reagir com o ácido cítrico. Após a espera de 15 minutos, adicionou-se 10,5 ml de etilenoglicol, o qual ficou em agitação por algumas horas para iniciar a medição do pH à temperatura de aproximadamente 290°C. Após atingir um pH básico, a temperatura foi reduzida para 180°C e depois 70°C até a evaporação do solvente. Após ocorrer a cristalização, o produto foi levado para secagem em uma mufla elétrica por um período de 2 horas à 350°C com taxa de aquecimento de 1°C/min., seguido de um período de 30 minutos à 500°C com taxa de aquecimento de 5°C/min.

3.2 Caracterização das nanopartículas

Todos os equipamentos utilizados são pertencentes aos laboratórios da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru. As caracterizações das nanopartículas sintetizadas foram feitas por meio das seguintes técnicas para o estudo da morfologia das NPs-ZnO.

I. Difração de raio-X (DRX): A caracterização por Difratoograma de Raios X é uma poderosa técnica não destrutiva que possibilita a caracterização de materiais cristalinos. Utilizando essa técnica foi possível obter através do espectro, as informações estruturais das NPs-ZnO (SILVA, 2020). Os picos de DRX foram produzidos por interferência construtiva de um feixe monocromático de Raios X, espalhados em ângulos específicos, neste trabalho foram usados ângulos de 20° a 45°, de cada conjunto de planos de rede da amostra, com passo de varredura de 0.02° min⁻¹ com velocidade de 2° min⁻¹, a 40 kV/20 mA. Foi utilizado o equipamento D/MAX-2100/PC, Rigaku, com radiação Cu-K α (λ = 1.54056 Å). As intensidades dos picos foram determinadas pelas posições atômicas dentro dos planos da rede. Os espectros obtidos foram comparados com os padrões de referência PCPDF 65–3411 para o ZnO.

II. Espectroscopia na região do infravermelho com método de refletância total atenuada (FTIR-ATR Vertex 70 – Bruker): O FTIR-ATR é uma técnica de análise que normalmente requer uma mínima preparação da amostra para análise, obtendo-se espectros na região do infravermelho de materiais que são espessos e fortemente absorventes aptos a serem analisados por espectroscopia de transmitância. É útil para dar informações sobre as propriedades da superfície do material, abrangendo sua identificação, modificação e adsorção em superfícies (CAPANEMA, 2014). A caracterização por FTIR foi feita na região do intermediário com faixa de varredura entre 4000 e 400 cm⁻¹ pelo método de refletância total

atenuada. As amostras foram colocadas com cristal de diamante como suporte e 32 varreduras foram obtidas em resolução 4 cm^{-1} . Os espectros resultantes forneceram a composição química dos grupos funcionais existentes nas amostras.

III. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que permite obter informações acerca da morfologia e tamanho dos grãos das amostras analisadas. Esta é uma técnica que fornece informações da textura, topografia e da superfície de pós ou de filmes (COSTA, 2016). As caracterizações por MEV foram realizadas para o estudo da morfologia das partículas, utilizado um microscópio eletrônico de varredura FESEM, JEOL 7500F, operando com um feixe de energia de excitação de 10 kV.

IV. Energia Dispersiva de Raios X (EDX-MEV): A técnica de EDX é capaz de fornecer informações qualitativas ou quantitativas a respeito da composição de amostras contendo elementos químicos com número atômico maior do que três, por meio da excitação por Raios X. Cada elemento na amostra emite fótons de Raios X em um comprimento de onda característico devido à quantização dos níveis de energia. O equipamento coleta estes fótons de modo a identificar quais elementos estão presentes na amostra (KOHLI; MITTAL, 2019). Foi utilizado o mesmo microscópio eletrônico de varredura da caracterização por MEV.

O fluxograma da síntese e as técnicas de caracterizações estão representadas na figura 13.

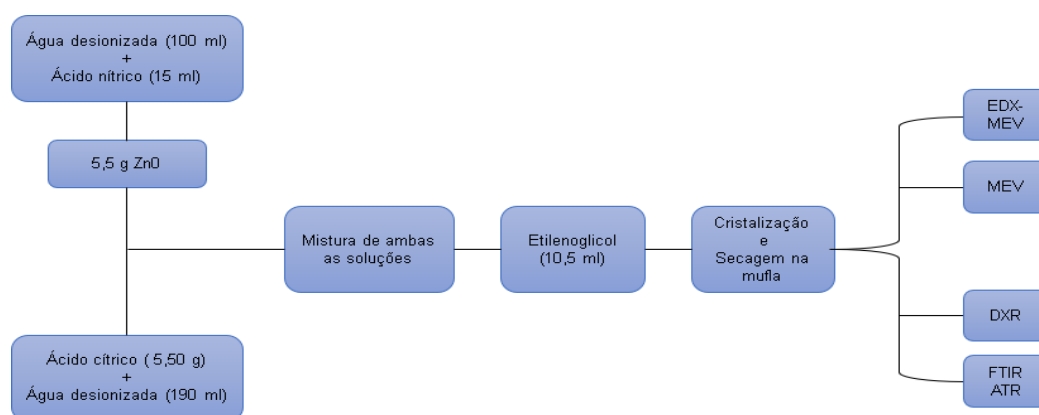


Figura 13: Fluxograma da síntese e caracterização das nanopartículas de zinco (Fonte: próprio autor).

3.3 Preparo do objeto simulador do encéfalo

Após a síntese e caracterização das nanopartículas, foram feitas soluções com diferentes concentrações de NPs-ZnO e adicionadas no objeto simulador.

O fantoma foi confeccionado em acrílico (polimetil-metacrilato - PMMA), e é constituído por 9 orifícios, no qual foram inseridas soluções aquosas em diferentes concentrações das partículas de ZnO. Depois da montagem do fantoma, o mesmo foi submetido ao exame de ressonância magnética para obtenção das imagens. A sequência de pulsos e o protocolo utilizado foram os mesmos utilizados na obtenção das imagens de ressonância magnética para pacientes com EM, seguindo as recomendações descritas pelo *Consortium of Multiple Sclerosis Centers* (SIMON et al., 2006).

O fantoma que foi utilizado no trabalho e sua representação de forma esquemática estão representados na figura 14.

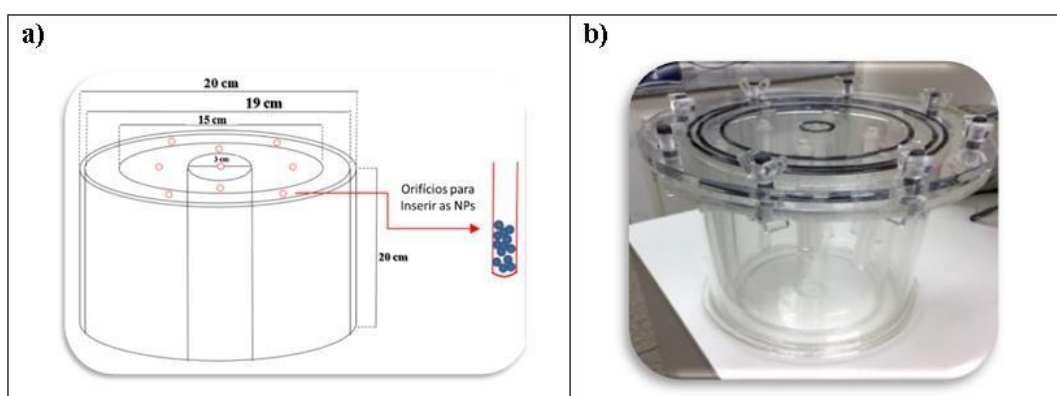


Figura 14: Objeto simulador/fantoma; a) representação esquemática e b) foto real (Fonte: próprio autor).

Nos testes realizados, para representar o tecido biológico do organismo, utilizou-se água Mili-Q para simulação da substância branca, do líquido cefalorraquidiano interno, da substância cinzenta e do líquido cefalorraquidiano externo. A figura 15 ilustra o planejamento experimental utilizado no preparo e posicionamento das concentrações das partículas de ZnO para simulação das lesões escleróticas. Nos orifícios numerados de 1 a 8 foram inseridas soluções com diferentes concentrações de Zn e o orifício 9 foi preenchido com gadolínio (substância padrão de controle).

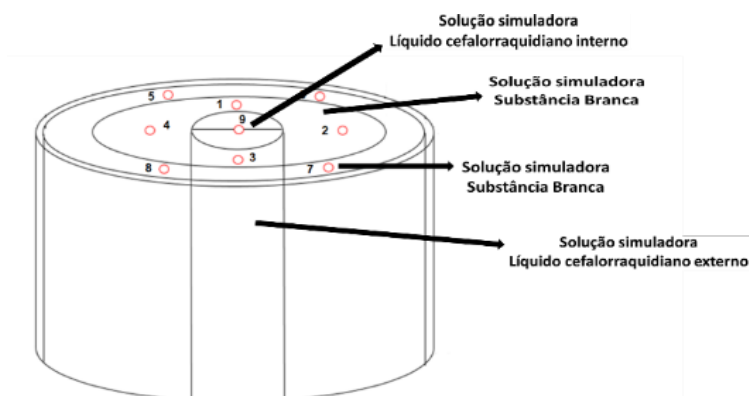


Figura 15: Indicações no fantoma para o procedimento experimental com as partículas de Zn
(Fonte: próprio autor).

As concentrações das soluções foram baseadas em estudos das concentrações de metais em amostras cerebrais utilizando técnicas analíticas (DE OLIVEIRA et al., 2020; GROCHOWSKI et al., 2019). Desta forma, foram preparadas soluções com concentrações de zinco variando entre 1,0 e 100 µg/g nos orifícios (GROCHOWSKI et al., 2019).

Realizou-se cinco estudos experimentais, ao longo do desenvolvimento do trabalho, a fim de simular lesões escleróticas através das NPs-ZnO e determinar seu limite de detecção. A quantidade (concentração) de NPs nos cinco exames (E1, E2, E3, E4 e E5), inseridas em cada orifício, estão listadas na Tabela 1. O restante dos compartimentos foram preenchidos com água Mili-Q para simular as substâncias brancas e cinzentas e o líquido cefalorraquidiano. Os orifícios 2, 8 e 9 tiveram um volume total de 2 ml e os demais 3 ml.

Tabela 1 - Concentração de ZnO utilizadas nos exames de RM.

Orifícios	E1 (g/l)	E2 (g/l)	E3 (g/l)	E4 (g/l)	E5 (g/l)
1	0,03	1,67	5	66,7	150
2	0,10	3,00	30	150	250
3	0,20	4,03	35	133,4	233,4
4	0,40	7,00	50	166,7	333,4
5	1,67	10,00	vazio	3,4 *	6
6	2,00	16,67	HNO ₃	6,7 *	20
7	4,03	15,83	10,00 *	13,4 *	50
8	10,50	15,00 *	30,00 *	30 *	112,5
9	Gadolínio	Gadolínio	Gadolínio	Gadolínio	Gadolínio

Os valores com * representam os orifícios com concentração de nanopartículas de ZnO em g/l diluídas em HNO₃. Os valores em negrito representam a concentração em g/l de uma solução padrão de Zn.

Nos exames E1 e E2 foram utilizadas as NPs-ZnO sintetizadas e caracterizadas, e suas respectivas concentrações em cada orifício estão listadas na Tabela 2. Já nos exames E3 e E4, em alguns orifícios também se utilizou as NPs diluídas em ácido nítrico, além de uma solução padrão de Zn nos orifícios de 1 a 4 variando sua quantidade de 5 – 166,7 g/L. No E5 foram utilizados apenas a solução padrão de Zn com quantidade variando de 6 – 333,4 g/L. A quantidade de gadolínio utilizada nos quatro exames foi de 0,005 g.

Os testes realizados permitiram avaliar quais concentrações estariam abaixo ou acima dos limites para a visualização na imagem. Desta forma, o fantoma foi especialmente utilizado com o intuito de avaliar o limite de detecção das nanopartículas metálicas em imagens de ressonância magnética.

3.4 Obtenção das imagens de RM

A obtenção das imagens de RM do objeto simulador foi feita no equipamento *Siemens Verio 3.0 T*. Na figura 16, estão registradas as imagens do equipamento de Ressonância Magnética (16.a) e do objeto simulador posicionado no equipamento (16.b).

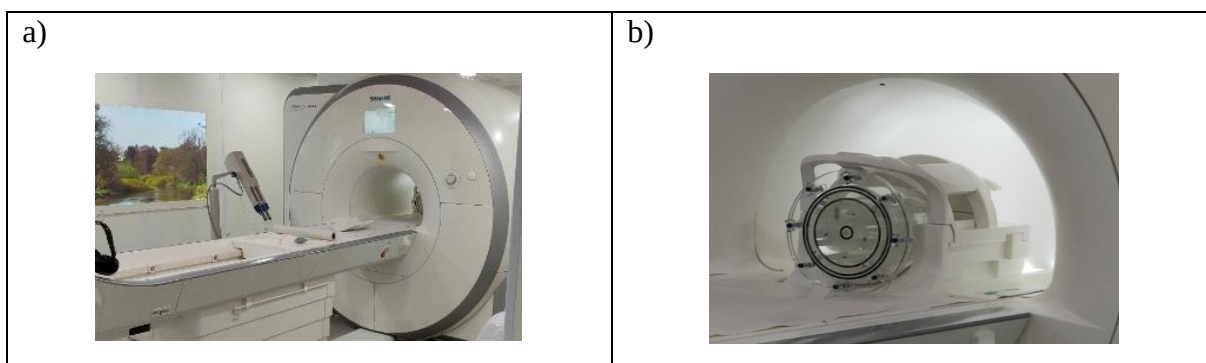


Figura 16: a) Equipamento de Ressonância Magnética b) fantoma posicionado no equipamento para realização do exame (Fonte: próprio autor).

As MRIs seguiram o protocolo de rotina para EM, utilizando as indicações descritas pelo *Consortium of Multiple Sclerosis Centers* (MELO, 2016; SIMON et al., 2006). Foram obtidas imagens nas sequências T1, T2 e FLAIR, com suas respectivas dimensões (416x512x40), (384x384x30) e (512x512x40) para o plano axial na região de interesse deste trabalho (crânio), devidamente simulado pelo fantoma. A Tabela 2 mostra os detalhes das

sequências que foram utilizadas para obtenção das MRI.

Tabela 2 - Protocolo das sequências realizadas para obtenção das MRI do Fantoma

Planos	Sequência	Voxel (mm ³)	Resolução (Pixel/mm)	Tempo de Eco (ms)	Tempo de Repetição (ms)
Axial	T1	0,43 x 0,43 x 4,0	2,33	6,5	334
	T2	0,57 x 0,57 x 4,0	1,755	96	9090
	FLAIR	0,43 x 0,43 x 4,0	2,33	95	8000

Após a realização dos exames de RM foi possível obter as imagens do objeto simulador para os experimentos. As análises das imagens foram feitas pelos Softwares ImageJ e 3D Slicer.

Inicialmente as imagens passaram por um pré-processamento para garantir que tivessem a mesma padronização e normalização (correção de homogeneidade e alinhamento espacial). O alinhamento espacial foi realizado para que as diferentes sequências (T1, T2 e FLAIR), tivessem a mesma dimensão espacial. Este procedimento foi realizado com o operador *Resample Image* (BRAINS) do 3D Slicer (JOHNSON; HARRIS; WILLIAMS, 2007) o qual aplicou uma transformação de dimensão para que as sequências T2 e FLAIR assumissem o mesmo tamanho de T1. Assim, todas as sequências ficaram com uma dimensão de (0,43 x 0,43 x 4,0 mm³ e 416 x 512 x 40 pixels). A homogeneidade foi corrigida no mesmo software com o operador morfológico N4ITK, o qual foi responsável por realizar a correção de *bias* (TUSTISON et al., 2010). Para tal correção, o algoritmo utilizou um filtro de normalização de intensidades, permitindo então a homogeneidade da intensidade de sinal na imagem. Todas as sequências passaram pela correção de homogeneidade. Ainda no ImageJ, foi possível determinar espacialmente o volume da região representativa da lesão esclerótica, referente às nanopartículas metálicas.

A figura 17 mostra um exemplo da imagem original FLAIR, o filtro de correção de homogeneidade e a imagem final corrigida.



Figura 17: a) Imagem original de RM, b) filtro de correção, e c) imagem corrigida (Fonte: próprio autor).

Após a realização do pré-processamento, descrito anteriormente, foi realizada uma avaliação visual de intensidade de sinal das imagens.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ZnO

I. Síntese Sol-Gel

As etapas da síntese realizada pelo método sol-gel das NPs-ZnO conforme descrita na seção 3.1, estão destacadas na figura 18 abaixo:

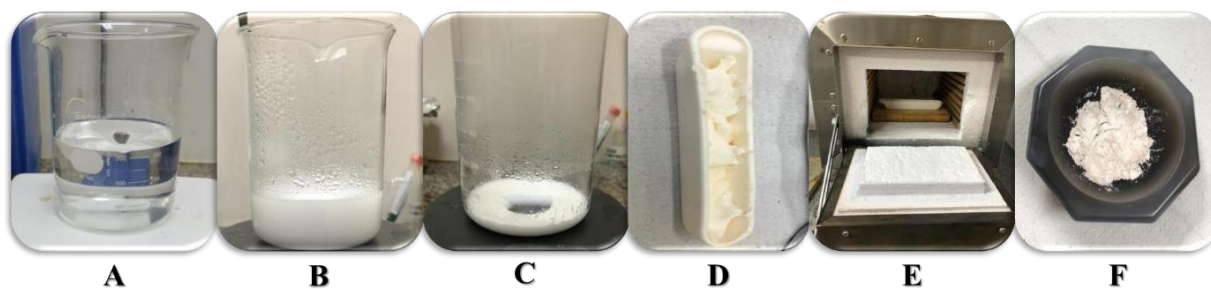


Figura 18: Etapas da síntese das NPs-ZnO. A) Solução com ZnO amorfo, água Mili-Q, ácido nítrico e ácido cítrico. B) Processo de evaporação. C) Processo de cristalização. D) Pós cristalização. E) Mufla elétrica para realização do tratamento térmico. F) NPs-ZnO obtidas (Fonte: próprio autor).

Após a síntese das NPs-ZnO foi possível realizar os processos de caracterização das mesmas e consequentemente preparar soluções com diferentes concentrações de metais e preencher os orifícios do fantoma para simulação das lesões escleróticas com base no exame de RM.

II. Difração de Raios X (DRX)

O padrão DRX das NPs-ZnO sintetizadas neste trabalho está ilustrado na figura 19.a. Com base no padrão observado nos difratogramas, as NPs-ZnO mostraram picos de difração característicos da estrutura cristalina hexagonal wurtzite (figura 19.b), tendo parâmetros da malha $a = 3.249$ e $c = 5.206 \text{ \AA}$. Estes resultados foram comparados com o DRX padrão de ZnO dado pelo Comitê Conjunto de Padrões de Difração de Pó (JCPDS 36-1451) para efeitos de confirmação (ALIM et al., 2005) e através de análises feitas em estudos aplicados ao mesmo método de caracterização (AL ABDULLAH et al., 2017; SHAMHARI et al., 2018; TALAM; KARUMURI; GUNNAM, 2012).

Os picos mais intensos observados a 2θ possuíam valores de $31,76^\circ$, $34,4^\circ$, $36,24^\circ$, $47,52^\circ$, $56,56^\circ$, $62,84^\circ$, $66,36^\circ$, $67,92^\circ$, $69,08^\circ$, $89,6^\circ$ e $95,28^\circ$ correspondentes aos planos da rede (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) e (202), respectivamente. Esses resultados mostraram que a síntese de NPs-ZnO foi adequada por ser ultrapura.

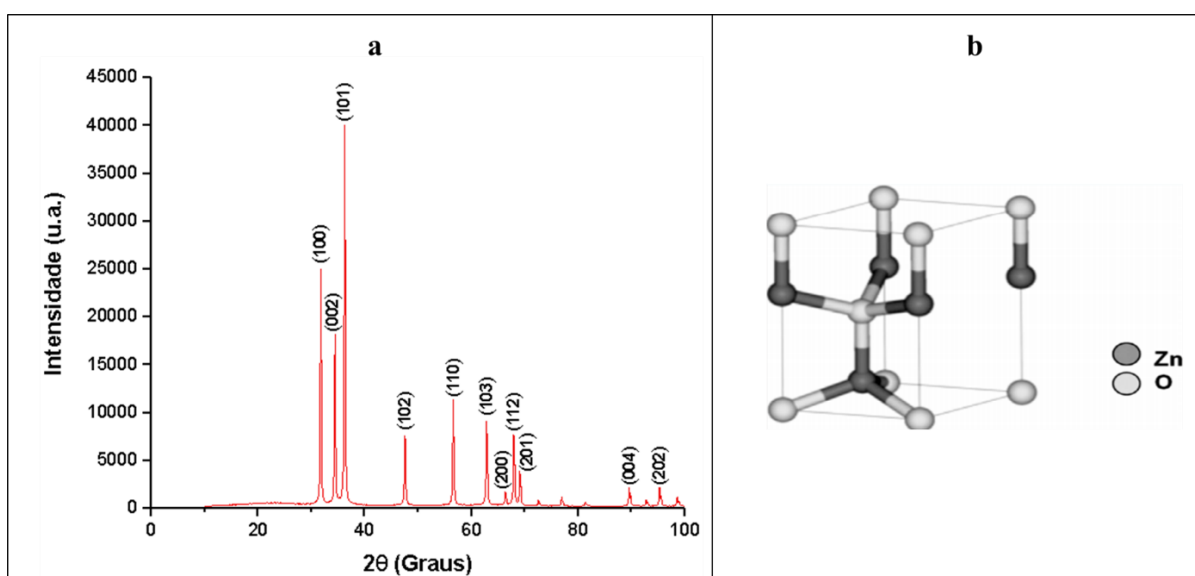


Figura 19: a) Padrão DRX das nanopartículas de ZnO sintetizadas. b) Estrutura wurtzite de ZnO (BARUAH; DUTTA, 2009).

III. Espectroscopia na região do infravermelho com método de refletância total atenuada (FTIR ATR Vertex 70 – Bruker)

O FTIR foi realizado a fim de estudar e determinar os grupos funcionais das NPs-ZnO sintetizadas. A figura 20 mostra o espectro FTIR das NPs-ZnO obtidas a partir do processo sol-gel, como mencionado anteriormente. A identificação de vários grupos funcionais e estruturas químicas nas NPs-ZnO foi feita analisando os picos de transmitância. A média de 5 testes foi

obtida para a identificação dos picos, com faixa de comprimento de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} , sendo colocadas em um cristal de diamante como suporte e 32 varreduras foram obtidas em resolução de 4 cm^{-1} .

Observou-se que as amostras apresentaram picos de transmitância, na faixa de comprimento de onda em 668, 878, 1379, 2341, 2358, 2975, 3367 e 3725 cm^{-1} . Por meio da literatura (DIAMANTI, 1999; KHAN et al., 2016; PONNUVELU et al., 2014), pode-se determinar os tipos de ligações presentes na nossa amostra.

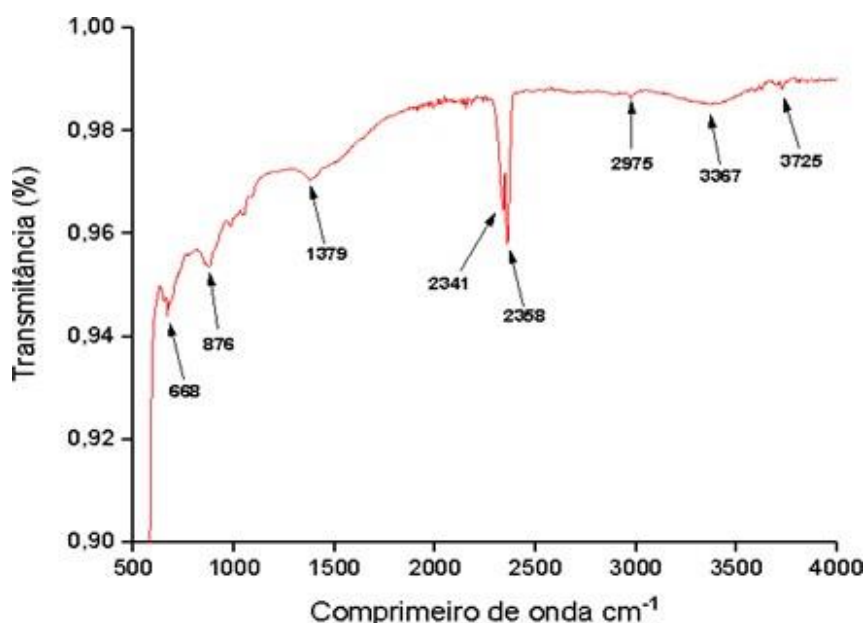


Figura 20: Espectros de FTIR das nanopartículas de ZnO (Fonte: próprio autor).

Os picos em torno de 3367 cm^{-1} correspondem às vibrações de alongamento O-H de moléculas de água fisissorvidas residuais ligadas nas nanomoléculas de ZnO. O grupo amino tem uma banda de absorção característica na região de 3500–4000 cm^{-1} , que é mascarada pela banda larga de absorção do grupo –OH. Os picos que aparecem entre 2800 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , no qual o mais evidente foi o pico de 2975 cm^{-1} , correspondem a vibrações de alongamento simétricas e assimétricas do grupo metileno C-H. Os picos duplos em 2341 cm^{-1} e 2358 cm^{-1} correspondem ao alongamento assimétrico do CO_2 atmosférico adsorvido no material. As bandas em torno de 1379 cm^{-1} são atribuídas à deformação dos grupos -CH₂ e -CH₃. Os óxidos metálicos geralmente exibem bandas de absorção na região abaixo de 1000 cm^{-1} , resultante de vibrações interatômicas. As vibrações de balanço do CH₂ aparecem em 878 cm^{-1} e os picos observados em torno de 668 cm^{-1} corresponde às vibrações de alongamento de ZnO,

correspondentes à estrutura hexagonal do cristal de ZnO wurtzite, confirmando a presença de NPs-ZnO na amostra.

IV. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A partir das caracterizações por MEV foi possível realizar uma análise descritiva da morfologia da superfície das nanopartículas. A figura 21 mostra uma foto do microscópio eletrônico de varredura, FE-SEM, JEOL 7500F, utilizado nesta pesquisa (figura 21.a, a metalizadora Quorum, modelo Q150R ES, (Figura 21.b), utilizada para metalização das amostras através do revestimento das nanopartículas de ZnO com uma liga de ouro-plástica e as amostras dentro da metalizadora posicionadas acima de uma fita de cobre antes do revestimento metálico (figura 21.c).

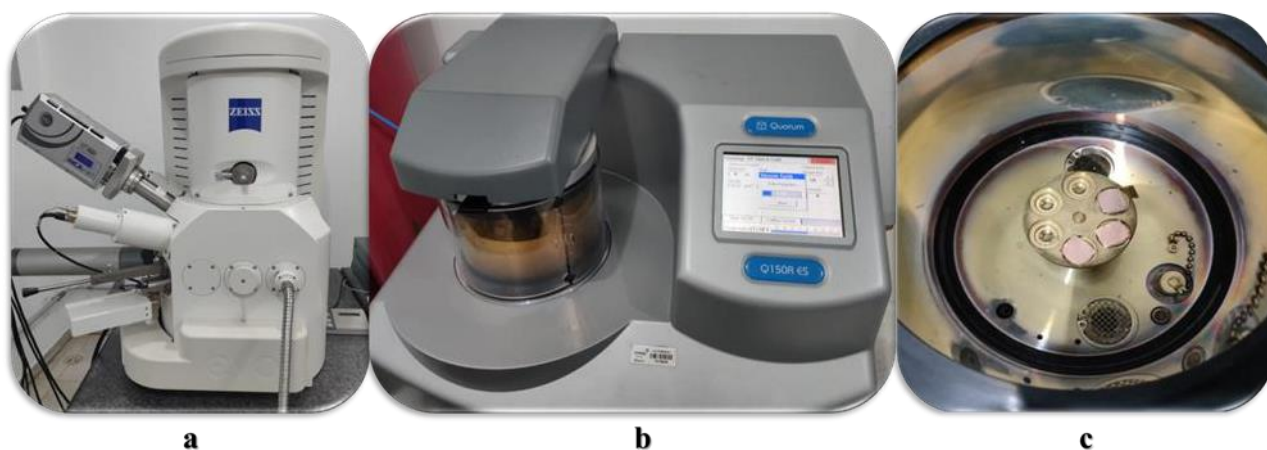


Figura 21: Equipamentos utilizados para realização da microscopia eletrônica de varredura a) Equipamento MEV, b) metalizadora e c) Amostras devidamente posicionadas para recobrimento metálico (Fonte: próprio autor).

Foi realizado o estudo com três amostras (a, b e c) em regiões diferentes das nanopartículas, com o equipamento MEV operando com um feixe de energia de excitação de 10 kV. As imagens obtidas estão registradas na figura 22.

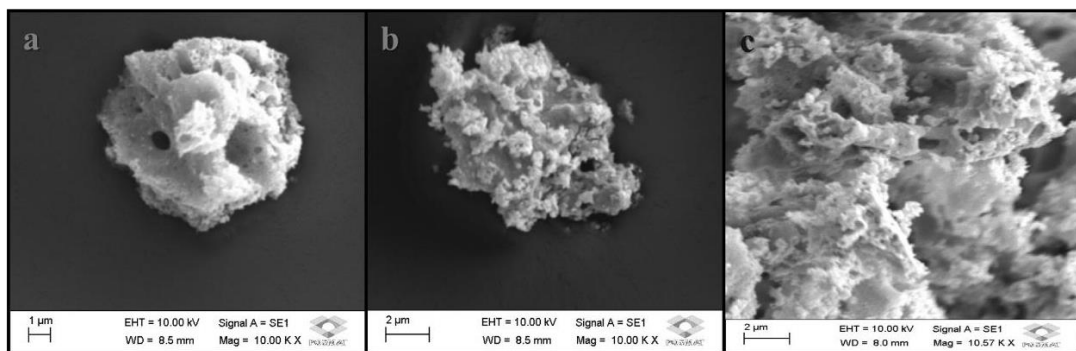


Figura 22: Estruturas das nanopartículas de ZnO obtidas a partir da caracterização por MEV de três amostras diferentes a, b e c (Fonte: próprio autor).

A imagem SEM das NPs-ZnO sintetizadas do presente estudo mostram aglomerações de nanopartículas individuais e que no material há partículas heterogêneas de diferentes tamanhos. De acordo com as imagens pode-se notar a presença de amontoados de partículas menores com tamanho médio de cerca de 9 µm como as figuras 22.A e 22.B e amontoados de partículas maiores, com cerca de 50 µm, como mostrados na figura 22.C

Devido à elevada área de superfície e energia superficial, foram encontradas partículas de ZnO que se aglomeravam, resultando em partículas de maior tamanho. Além disso, pequenas partículas com formato arredondado também são observadas, como também estruturas em forma de bastão. Resultados semelhantes foram também observados por outros estudos (LU; YEH, 2000; SRIVASTAVA; GUSAIN; SHARMA, 2013).

V. Energia Dispersiva de Raios X (EDX-MEV)

Utilizando o mesmo microscópio eletrônico de varredura, FE-SEM JEOL 7500F, foram analisadas três amostras (a, b e c), a fim de identificar de forma qualitativa todos os elementos presentes nas nanopartículas. A figura 23 mostra a região de análise com seus respectivos espectros e porcentagem atômica e em massa dos elementos das amostras analisadas.

Pode-se verificar que os elementos presentes nas nanopartículas foram Carbono (C), Oxigênio (O) e Zinco. Em todas as amostras a região de análise identificou uma maior porcentagem de massa referente ao elemento Zn, para amostra A de 62,29%, na amostra B de 69,39% e na amostra C de 73,23%. Os dados obtidos foram comparados com a literatura para validação dos resultados (KHAN et al., 2010; KUMAR et al., 2013).

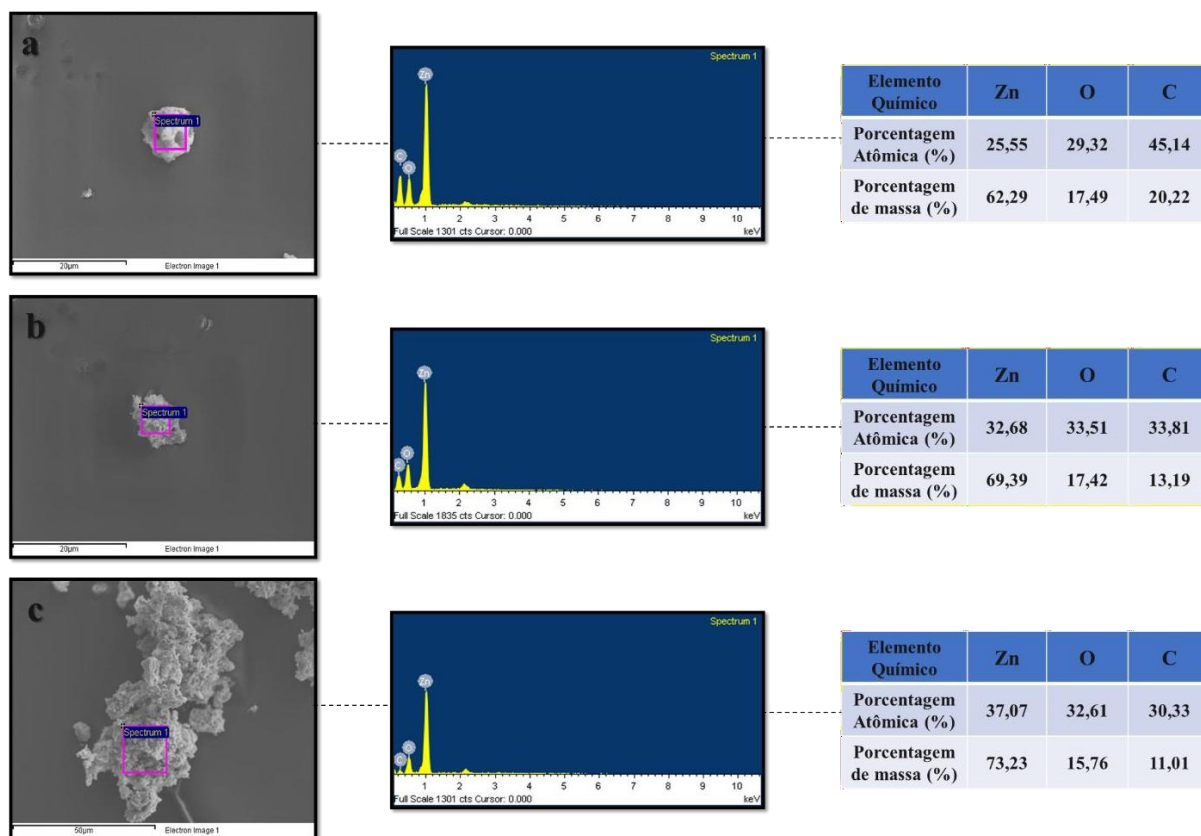


Figura 23: Análise das regiões a, b e c nas nanopartículas de óxido de zinco com seus respectivos espectros e porcentagem atômica e massa dos elementos químicos presentes (Fonte: próprio autor).

Os resultados do MEV e EDX-MEV possibilitaram visualizar as NPs-ZnO como também sua composição química, o que verifica e valida a síntese feita através do processo sol-gel descrita no item 3.1 como bem sucedida, corroborando com os resultados de caracterização anteriormente descritos.

4.2 Avaliação da presença de nanopartículas nas imagens

Após a realização do pré-processamento, descrita no item 3.4, realizou-se uma avaliação visual e quantitativa da intensidade de sinal para cada exame, bem como a obtenção dos histogramas correspondentes às sequências realizadas, utilizando o software ImageJ. A figura 24 ilustra as imagens obtidas das sequências axiais FLAIR para os exames E1, E2, E3, E4 e E5, e seus respectivos histogramas.

Vale ressaltar que apesar dos exames serem feitos nas sequências FLAIR, T1 e T2, as alterações na intensidade de sinal puderam ser vistas nas sequências T1e FLAIR, com melhor contraste e visualização na FLAIR, já na sequência T2 não foi possível observar mudança de

signal. Esse resultado para a sequência T2 já era esperado, uma vez que nessa sequência a água, o qual foi o líquido utilizado para preencher os espaços entre os tubos do objeto simulador, aparece disposta em tons mais claros, semelhante a tonalidade das lesões de EM (ambas com um sinal hiperintenso). Dessa forma, nesse trabalho a análise de todos os exames foram feitas a partir da sequência FLAIR.

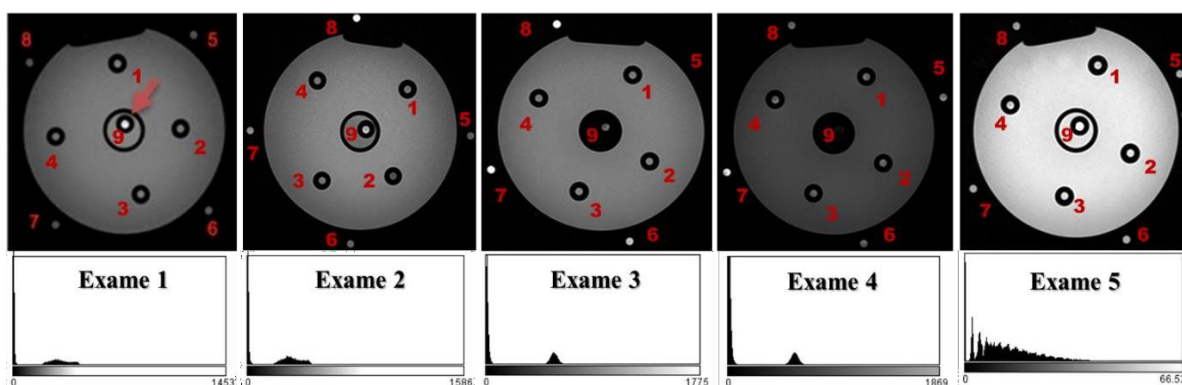


Figura 24: Imagem de RM obtidas da sequência axial FLAIR dos cinco experimentos realizados. A seta vermelha indica o gadolínio como substância padrão de controle e os orifícios do fantoma numerados de 1 a 9 (Fonte: próprio autor).

Todos os exames seguiram o protocolo de rotina, possibilitando a realização de 40 cortes para cada eixo e em cada sequência utilizada. Para promover uma análise padronizada, todos os dados recolhidos das imagens da figura 24, foram para o corte 18.

Através do software ImageJ, foi possível quantificar a intensidade do pixel em cada orifício do fantoma e comprar tais valores de acordo com a concentração utilizada de NPs-ZnO e solução padrão de Zn. Os valores de intensidade de cada pixel, normalizados pela intensidade de sinal da água, dos nove orifícios para os cinco exames estão registrados na tabela 3.

Tabela 3 – Valor do pixel para cada orifício nos cinco exames normalizados pela intensidade de sinal da água

Orifícios	E1	E2	E3	E4	E5
1	1,08	1,09	1,09	1,59	1,63
2	1,10	0,77	1,16	1,64	1,63
3	1,20	1,07	1,16	1,51	1,67
4	1,28	1,11	1,06	1,52	1,74
5	0,79	1,35	0,00	1,77	1,09

6	0,80	0,86	1,85	1,36	1,13
7	0,76	0,96	2,77	3,55	1,18
8	0,81	3,11	3,02	1,56	1,25
9	1,83	2,17	1,01	0,18	3,54
Água	415	344	752	695	609

Analisando as imagens obtidas na Figura 24, pode-se observar que para os exames E1 todos os orifícios do objeto simulador onde estavam alocadas as partículas de Zn, não apresentaram mudanças visuais de intensidade de sinal. No E2 foi possível perceber alterações nos orifícios 5 e 8, apresentando concentração de Zn de 10,00 g/l e 15 g/l, com um diferencial que no tubo 8 apresentava um adicional de ácido nítrico (HNO_3). Para os dois primeiros exames apenas foi observado o sinal significativo da amostra de controle (gadolínio), e o orifício que continha ácido.

Com relação aos exames E3 e E4, pode-se notar que para as concentrações na faixa de 3 a 30 g/l de Zn, identifica-se visualmente uma diferença de intensidade de sinal, decorrentes da mudança de concentração das nanopartículas. Tal mudança não teve recorrência da interferência do HNO_3 , uma vez que no E3, mediu-se a intensidade do ácido separadamente. Já nas soluções padrão de Zn, apenas na faixa de 66,7 a 166,7 g/l pode-se observar mudança de sinal significativo.

Por fim, realizou-se um quinto exames, E5, utilizando novamente a solução padrão de Zn, tendo como base na literatura, soluções baseadas em estudos das concentrações de metais em amostras cerebrais utilizando técnicas analíticas (DE OLIVEIRA et al., 2020; GROCHOWSKI et al., 2019). Os valores das soluções foram devidamente convertidos e fez-se o E5 variando a quantidade na faixa de 6 – 333,4 g/l. De acordo com a análise, pode-se perceber que conforme a concentração da solução padrão de Zn aumentava, maior era a intensidade de pixels registrada, sendo que para a solução de 6 g/l a intensidade de pixels normalizados pela intensidade de sinal da água foi de 1,09 e para a solução de 333,4 g/l o valor registrado foi de 1,74. Apesar dos valores de intensidade dos pixels das soluções não terem se aproximado do valor medido do gadolínio de 3,54, pode-se perceber um aumento de sinal conforme se aumentava o valor da concentração da solução padrão.

4.3 Construção de uma curva de calibração

A fim de obter uma curva de calibração para relacionar as concentrações das diferentes soluções de ZnO do fantoma e a intensidade de sinal, foi realizado um sexto exame (E6) com diferentes tempos de inversão (TI). Neste último exame foram utilizadas concentrações de 18, 60, 300, 500, 700 e 1000 µl, respectivamente nos orifícios numerados de 1 a 8, e o nono tubo com 0,05 g de gadolínio. Os parâmetros de aquisição do protocolo do exame de RM seguiram os procedimentos listados na Tabela 4, tendo como base estudos que relacionam a quantificação de metais e seus respectivos tempos de relaxação (AMORIM, 2013; BANDEIRA et al., 2016).

Tabela 4 – Protocolo de RM e seus respectivos parâmetros de aquisição

Parâmetro	Sequência TSE Inversão Recuperação
TR (ms)	2660
TE (ms)	16
TI (ms)	37, 100, 250, 500
Espessura de corte	5.0
Espaçamento entre os cortes	5.5
Flip angle	150°
Fator Turbo (ETL)	5
Matriz (pixels)	320 x 320
FOV (mm)	220 x 220
Tamanho do pixel (mm)	0.6875 x 0.6875
Tempo de aquisição	5 min e 37 s

Após a obtenção das imagens e suas respectivas correções de homogeneidades, estimou-se o valor do tempo de relaxação longitudinal, descrito pela expressão 1 (AMORIM, 2013; TOFTS, 2009).

$$I = A - Be^{-\left(\frac{TI}{T1}\right)} \quad (1)$$

Onde A e B são constantes, I é intensidade do pixel, e TI e T1 são os tempos de inversão e de relaxação longitudinal, respectivamente.

Através do E6 foi possível obter quatro curvas de calibração relacionando a concentração da solução padrão de Zn com seus respectivos valores de taxa de relaxação em T1 (ms). Os gráficos das curvas obtidas estão mostrados na figura 25.

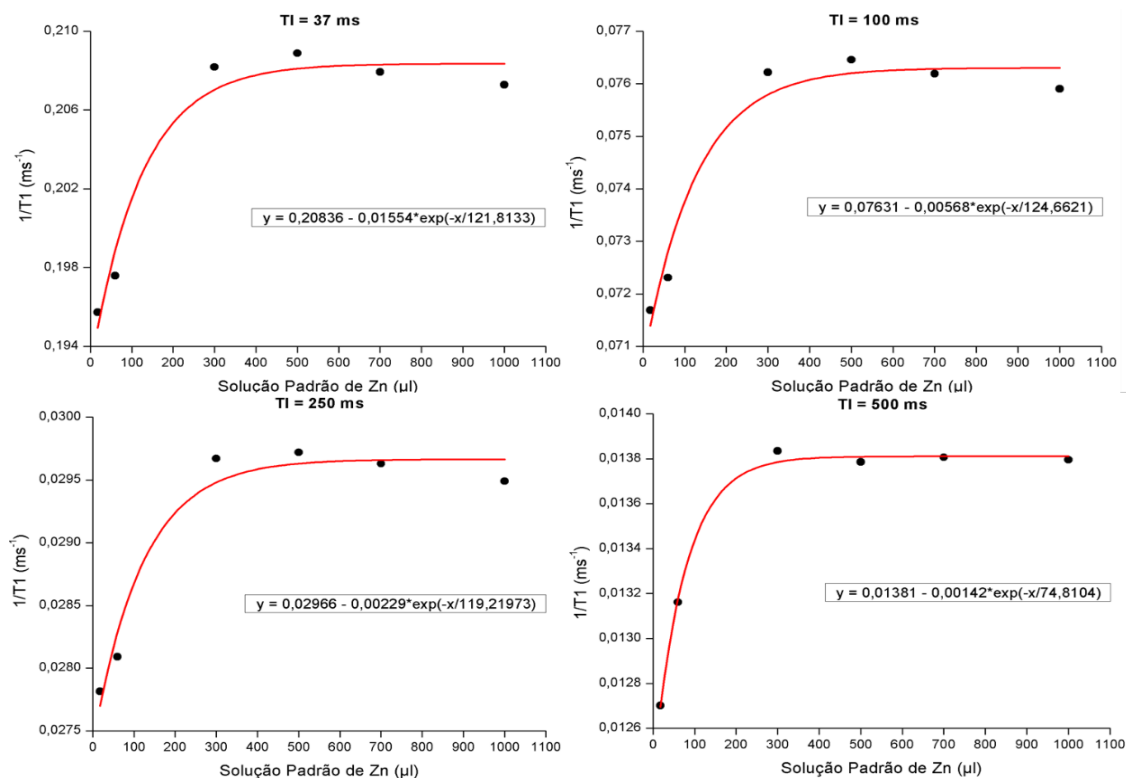


Figura 25: Curvas de calibração relacionando a taxa de relaxação $1/T1$ (ms^{-1}) com o aumento da concentração da Solução Padrão de Zn (μl) (Fonte: próprio autor).

Os quatro gráficos da Figura 24 foram obtidos para Tempos de Inversão (TI) com valores de 37, 100, 250 e 500 ms. A plotagem do gráfico foi realizada no programa OriginLab® versão 8E. A partir de um ajuste obteve-se uma função exponencial para cada TI, como visualizado na figura 25. Em cada curva, foi possível observar que a concentração da solução padrão de Zn interferiu no tempo de relaxamento. Além disso, pode-se também observar que para valores de TI maiores com a mesma concentração da solução de Zn o valor da intensidade de cada pixel dos orifícios do fantoma diminui.

Assim, o comportamento gráfico obtido neste trabalho, pode ser associado a possível relação entre o Zn e sua alteração da intensidade de sinal em função de sua concentração, sendo observado uma redução exponencial seguida por valores constantes de T1 com o aumento da concentração de Zn para todos os diferentes valores de TI.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal simular lesões cerebrais causadas por Esclerose Múltipla através de nanopartículas metálicas de zinco, sintetizadas e caracterizadas previamente, em um objeto simulador de encéfalo em imagens de ressonância magnética

nuclear. Os resultados obtidos utilizando o objeto simulador a partir das MRI permitiram uma análise visual, bem como uma análise quantitativa, que apresentou uma variação da intensidade de sinal para diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de zinco, tornando possível determinar uma faixa de detecção de partículas metálicas presentes no simulador. Com base nos resultados apresentados foi possível mostrar o potencial em utilizar as NPs-ZnO no objeto simulador como simuladoras de lesões escleróticas no encéfalo e determinar um limiar de detecção de partículas metálicas de zinco presentes no encéfalo.

6. REFERÊNCIAS

- ABEM, 2020. **Associação Brasileira de Esclerose Múltipla** [WWW Document]. URL <http://abem.org.br/> (accessed 2.13.20).
- AL ABDULLAH, K. et al. Synthesis of ZnO Nanopowders By Using Sol-Gel and Studying Their Structural and Electrical Properties at Different Temperature. **Energy Procedia**, International Conference on Technologies and Materials for Renewable Energy, Environment and Sustainability, TMREES17, 21-24 April 2017, Beirut Lebanon. v. 119, p. 565–570, 1 jul. 2017.
- ALIM, K. A. et al. Micro-Raman investigation of optical phonons in ZnO nanocrystals. **Journal of Applied Physics**, v. 97, n. 12, p. 124313, 15 jun. 2005.
- AMORIM, D. A. F. DE. Desenvolvimento de um fantoma cerebral para ressonância magnética. 2013.
- ANDRADE, C. H. G. DE. Princípios físicos envolvidos na técnica de exames médicos de ressonância magnética. 2008.
- BAKSHI, R. et al. MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. **The Lancet. Neurology**, v. 7, n. 7, p. 615–625, jul. 2008.
- BANDEIRA, B. et al. Comparação entre diferentes métodos de obtenção da razão sinal-ruído em imagens por ressonância magnética. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 10, n. 2, p. 25–28, 31 dez. 2016.
- BANGERTER, N. K.; MORRELL, G.; GRECH-SOLLARS, M. Chapter 2.3 - Magnetic resonance imaging. In: LADAME, S.; CHANG, J. Y. H. (Eds.). **Bioengineering Innovative Solutions for Cancer**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 163–194.
- BARUAH, S.; DUTTA, J. Hydrothermal Growth of ZnO Nanostructures. **Science and Technology of Advanced Materials - SCI TECHNOL ADV MATER**, v. 10, 1 mar. 2009.
- BELBASIS, L. et al. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 3, p. 263–273, mar. 2015.
- BERNARDINO, I. C.; CARVALHO, V. R. J. DE. DIAGNÓSTICO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA EM FOCO NO EXAME DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. 14 maio 2016.
- BERNSTEIN, M. A.; KING, K. F.; ZHOU, X. J. **Handbook of MRI Pulse Sequences**. [s.l.] Elsevier, 2004.
- BREDHOLT, M.; FREDERIKSEN, J. L. Zinc in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. **ASN Neuro**, v. 8, n. 3, p. 1–9, 2016.
- CAPANEMA, N. S. V. Síntese e caracterização de biocerâmicas à base de fosfato de cálcio modificada com nióbio. 9 maio 2014.
- CASTRO, Á. D. S. **STATUS DE ZINCO EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**, 2016.
- CHOI, B. Y.; JUNG, J. W.; SUH, S. W. The Emerging Role of Zinc in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2070, out. 2017.
- COSTA, F. R. T. DA. Microscopia Eletrônica de Varredura: potencialidades e aplicações. 16 ago. 2016.
- COWAN, B. **Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation**. [s.l.] Cambridge University Press, 2005.
- DE OLIVEIRA, M. et al. A preliminary study of the concentration of metallic elements in the blood of patients with multiple sclerosis as measured by ICP-MS. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13112, 4 ago. 2020.
- DIAMANTI, M. V. **Novel Photoactive Materials**. [s.l.] MDPI, 1999.

- DÓRIA, B. A. C.; PERLATO, M. T. Bobinas de RF: utilização eficaz de bobinas receptoras em estudos de ressonância magnética para otimização da RSR. 2016.
- ELITT, C. M.; FAHRNI, C. J.; ROSENBERG, P. A. Zinc homeostasis and zinc signaling in white matter development and injury. **Neuroscience Letters**, v. 707, p. 134247, 10 ago. 2019.
- ERRANTE, P. R. et al. Análise do líquido cefalorraquidiano. Revisão de literatura. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, v. 4, n. 3, p. 1–24, 4 out. 2016.
- FARIAS, F. R. Geração de imagens para a quantificação das lesões de esclerose múltipla com exames de ressonância magnética do cérebro humano utilizado no protocolo de rotina da prática clínica. 23 abr. 2014.
- FERREIRA, M. S.; NACIF, M. S. **Manual De Técnicas Em Ressonância Magnética**. 1º ed. [s.l.] Rubio, 2011.
- FILIPPI, M. et al. Multiple sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–27, 8 nov. 2018.
- GROCHOWSKI, C. et al. Analysis of Trace Elements in Human Brain: Its Aim, Methods, and Concentration Levels. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 115, 5 mar. 2019.
- HAGE, M. C. F. N. S.; IWASAKI, M. Magnetic resonance imaging: basics. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1275–1283, jul. 2009.
- HENDEE, W. R.; MORGAN, C. J. Magnetic Resonance Imaging Part I—Physical Principles. **Western Journal of Medicine**, v. 141, n. 4, p. 491–500, out. 1984.
- HILL, B. S. Drug repurposing in the treatment of Melanoma Brain Metastasis. 10 nov. 2015.
- HORE, P. J. **Nuclear Magnetic Resonance**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.
- JOHNSON, H.; HARRIS, G.; WILLIAMS, K. BRAINSFIT: Mutual information registrations of whole-brain 3D Images, using the insight toolkit. 5 out. 2007.
- KEENAN, K. E. et al. Quantitative magnetic resonance imaging phantoms: A review and the need for a system phantom. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 79, n. 1, p. 48–61, jan. 2018.
- KHAN, M. et al. Influences of Co doping on the structural and optical properties of ZnO nanostructured. **Applied Physics A**, v. 100, p. 45–51, 30 nov. 2010.
- KHAN, M. F. et al. Sol-gel synthesis of thorn-like ZnO nanoparticles endorsing mechanical stirring effect and their antimicrobial activities: Potential role as nano-antibiotics. **Scientific Reports**, v. 6, 28 jun. 2016.
- KLEIN, P. C. Detecção de lesões de esclerose múltipla em imagens de ressonância magnética do tipo Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR). 2016.
- KOHLI, R.; MITTAL, K. L. (EDS.). Chapter 3 - Methods for Assessing Surface Cleanliness. In: **Developments in Surface Contamination and Cleaning, Volume 12**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 23–105.
- KUMAR, S. S. et al. Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. **International Nano Letters**, 2013.
- LA, P. et al. Effects of ZnO/TiO₂ nanoparticle and TiO₂ nanotube additions to dense polycrystalline hydroxyapatite bioceramic from bovine bones. **Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials**, v. 36, n. 2, p. e38–e46, 2 dez. 2019.
- LAUBACH, H. J. et al. A phantom for diffusion-weighted imaging of acute stroke. **Journal of magnetic resonance imaging: JMRI**, v. 8, n. 6, p. 1349–1354, dez. 1998.
- LERAY, E. et al. Epidemiology of multiple sclerosis. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 1, p. 3–13, jan. 2016.

LIMA, R. R. et al. Lesão da substância branca e doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, n. 4, p. 41–45, dez. 2006.

LU, C.-H.; YEH, C.-H. Influence of Hydrothermal Conditions on the Morphology and Particle Size of Zinc Oxide Powder. **Ceramics International**, v. 26, p. 351–357, 1 maio 2000.

MACOMBER, R. S. **A Complete Introduction to MODERN NMR Spectroscopy**. 1. ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 1998.

MADHURANTHAKAM, A. et al. Optimized double inversion recovery for reduction of T1 weighting in fluid-attenuated inversion recovery. **Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine**, v. 67, p. 81–8, 1 jan. 2012.

MATTILA, S. et al. Phantom-based evaluation of geometric distortions in functional magnetic resonance and diffusion tensor imaging. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 57, n. 4, p. 754–763, abr. 2007.

MAZZOLA, A. A. Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 117–129, 2009.

MELO, M. C. D. A. **USO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NO DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS: UMA REVISÃO**. [s.l.: s.n.].

NAPIER, M. D. et al. Heavy metals, organic solvents, and multiple sclerosis: An exploratory look at gene-environment interactions. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v. 71, n. 1, p. 26–34, jan. 2016.

NASCIMENTO, C.; BLOCH, C. Ressonância Magnética Nuclear: Gradus Primus. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 21, p. 52–61, 1 jul. 2001.

NÓBREGA, A. I. **Técnicas Em RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NÚCLEAR**. CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO: Atheneu, 2006.

ODÉEN, H.; PARKER, D. L. Magnetic resonance thermometry and its biological applications – Physical principles and practical considerations. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 110, p. 34–61, 1 fev. 2019.

OLIVEIRA, S. C. DE. Revisão bibliográfica acerca dos princípios de ressonância magnética nuclear. 1 jul. 2008.

ORABY, M. I. et al. The emerging role of serum zinc in motor disability and radiological findings in patients with multiple sclerosis. **Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery**, v. 55, n. 1, dez. 2019.

PIERRE, V. C.; HARRIS, S. M.; PAILLOUX, S. L. Comparing Strategies in the Design of Responsive Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: A Case Study with Copper and Zinc. **Accounts of Chemical Research**, v. 51, n. 2, p. 342–351, 20 fev. 2018.

PINTO, R. I. P. Segmentação Automática de Lesões de Esclerose Múltipla em Imagens de Ressonância Magnética. 27 jun. 2017.

PONNUVELU, D. et al. Plasmon-Mediated, Highly Enhanced Photocatalytic Degradation of Industrial Textile Dyes using Hybrid ZnO@Ag Core-shell Nanorods. **RSC Advances**, v. 4, p. 58930–58940, 23 out. 2014.

RIBEIRO, H. S. **RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E SEU FUNCIONAMENTO MECÂNICO PARA GERAR IMAGENS**. 30 nov. 2018.

- SANTOS, V. M. Diagnóstico de esclerose múltipla por ressonância magnética. **Revista Remecs - Revista Multidisciplinar de Estudos Científicos em Saúde**, v. 3, n. 5, p. 3–13, abr. 2019.
- SHAMHARI, N. M. et al. Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles with Small Particle Size Distribution. **Acta Chimica Slovenica**, v. 65, n. 3, p. 578–585, 17 set. 2018.
- SHAN, N. J.; A WORTHOFF, W.; FELDER, J. **Hybrid MR-PET Imaging Systems, Methods and Applications**. 1. ed. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2018. v. 19
- SILVA, R. F. DA. A Difração de Raios X: uma Técnica de Investigação da Estrutura Cristalina de Materiais. **Revista Processos Químicos**, v. 14, n. 27, p. 73–82, 22 set. 2020.
- SILVA, E. C. F. DA [UNESP. Estudo da técnica de ressonância magnética para algumas aplicações voltadas à neurologia e à neurociência. **Aleph**, p. 37 f., 2011.
- SIMON, J. H. et al. Standardized MR imaging protocol for multiple sclerosis: Consortium of MS Centers consensus guidelines. **American Journal of Neuroradiology**, v. 27, n. 2, p. 455–461, 2006.
- SRIVASTAVA, V.; GUSAIN, D.; SHARMA, Y. C. Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO). **Ceramics International**, v. 8, n. 39, p. 9803–9808, 2013.
- STRONG, M. D. et al. Role of zinc transporter ZIP12 in susceptibility-weighted brain magnetic resonance imaging (MRI) phenotypes and mitochondrial function. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 34, n. 9, p. 10702–12725, set. 2020.
- TALAM, S.; KARUMURI, S. R.; GUNNAM, N. Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles. **ISRN Nanotechnology**, v. 2012, p. e372505, 22 maio 2012.
- TAMBURO, E. et al. Trace elements in scalp hair samples from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, abr. 2015.
- THOMPSON, A. J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **The Lancet. Neurology**, v. 17, n. 2, p. 162–173, fev. 2018.
- TOFTS, P. Methods for quantitative relaxation parameter mapping: Measuring T1 and T2. **ISMRM**, 1 jan. 2009.
- TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano - 10ed: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.
- TUSTISON, N. J. et al. N4ITK: improved N3 bias correction. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 29, n. 6, p. 1310–1320, jun. 2010.
- VISCONTI, A. et al. Concentration of elements in serum of patients affected by multiple sclerosis with first demyelinating episode: a six-month longitudinal follow-up study. **Annali Dell'istituto Superiore di Sanita**, v. 41, n. 2, p. 217–222, 1 jan. 2005.
- WEI, W. et al. Fluid-attenuated inversion recovery MRI synthesis from multisequence MRI using three-dimensional fully convolutional networks for multiple sclerosis. **Journal of Medical Imaging**, v. 6, p. 1, 19 fev. 2019.
- WESTBROOK, C.; ROTH, C. K. **MRI in Practice**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.
- WESTBROOK, C.; TALBOT, J. **MRI in Practice**. 5th. ed. [s.l.] Wiley Publishing, 2018.