



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

JANINE CONTRO

**Síntese e caracterização de materiais zeolíticos e sua aplicação
como agentes de contraste para exames de imagem de
Ressonância Magnética.**

São José do Rio Preto

2020

JANINE CONTRO

Síntese e caracterização de materiais zeolíticos e sua aplicação como agentes de contraste para exames de imagem por Ressonância Magnética.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto

2020

C764s

Contro, Janine

Síntese e caracterização de materiais zeolíticos e sua aplicação como agentes de contraste para exames de imagem por Ressonância Magnética. /

Janine Contro. -- São José do Rio Preto, 2020

140 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: José Geraldo Nery

1. Zeólita. 2. Imagem por Ressonância Magnética. 3. Agente de Contraste. 4. Gadolínio. I. Título.

JANINE CONTRO

Síntese e caracterização de materiais zeolíticos e sua aplicação como agentes de contraste para exames de imagem por Ressonância Magnética.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Valmir Fadel
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto

Profa. Dra. Ieda Aparecida Pastre Fertonani
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira Barbosa
USP – Ribeirão Preto

Dr. Mauricio Sforça
CNPEM - LNBio

São José do Rio Preto
10 de Dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família que foi meu suporte para ser quem eu sou e ter chegado até aqui.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Nery, que não poupou esforços em fazer esse trabalho e a colaboração com a Universidade do Texas possível. Agradeço também ao Prof. Dr. Ponnada A. Narayana por ter aceitado trabalhar conosco e por ter me recebido em seu laboratório, também não posso deixar de agradecer o Dr. Kurt Bockhorst que me ensinou tudo o que foi preciso para que os estudos realizados utilizando o equipamento de MRI de 7T pudessem ser realizados corretamente.

Aos companheiros de laboratório, novos e antigos Adriano, Alex, Danilo, Davi, Miller, Juliana, Litrenta, Oscar, Guarnieri, Sacco, Rui e Erik, obrigada pela companhia no dia a dia. Não poderia deixar de agradecer aos amigos de mais longa data Alex, Carol, Fernando e Ingrid

Agradeço também ao Dr. Mauricio Sforça e à Dra. Silvana Rocco do Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio) pela ajuda com os estudos relaxométricos utilizando o espectrômetro de RMN de 500 MHz.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço. Agradeço também ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – Processo 88881.189630/2018-01.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho é a síntese e caracterização de materiais zeolíticos com potencial de serem aplicados como agentes de contraste em exames de Imagem por Ressonância Magnética (MRI). Os materiais estudados foram a zeólita Faujasita (FAU), Zeólita A (LTA), zeólita Beta (BEA), Zeólita ZSM-5 (MFI) e zeólita Mordenita (MOR), estes materiais foram trocados ionicamente com metais lantanídeos, como o gadolínio Gd^{3+} . Os materiais foram caracterizados por difração de raios-x (DRX) e então foram submetidos a estudos relaxométricos, nos quais foram calculados os tempos de relaxação T_1 e T_2 utilizando técnicas como *inverse recovery* e *saturation recovery*. Estes estudos foram realizados na Universidade do Texas – *Health Science Center* em Houston sob a orientação do Prof. Dr. Ponnada A. Narayana. Os estudos *in vivo* também foram realizados na Universidade do Texas, para isso os potenciais novos agentes de contraste foram administrados a ratos Sprague Dawley, que foram então submetidos ao exame de Imagem por Ressonância Magnética de seu cérebro e abdômen. Estudos comparativos de desempenho das zeólitas e dos agentes de contraste comerciais foram realizados utilizando o **Gd-DOTA** (ácido gadotérico – Dotarem). A zeólita Faujasita apresentou valores de relaxividade muito maiores que o Dotarem chegando a apresentar valores de relaxividade 10x maiores. Nos testes preliminares as imagens utilizando a mFAU-1 apresentaram muito mais detalhes que as imagens utilizando o Dotarem. Porém no estudo comparativo o mesmo não foi observado, provavelmente por causa da sobreposição do efeito de T_2 sobre T_1 nas concentrações utilizadas. Os agentes de contraste a base de zeólitas se mantém mais tempo na corrente sanguínea possibilitando exames dependentes de contraste mais longos. Mas ainda assim, em dois dias, como é o caso do Dotarem, todo o contraste já foi expelido pelo corpo do animal. Os resultados obtidos até o momento são muito iniciais para o desenvolvimento de um novo agente de contraste, porém se mostram promissores. Possivelmente um ajuste na concentração de contraste a ser administrada ao objeto de estudo pode melhorar o contraste nas imagens obtidas por Ressonância Magnética.

Palavras-Chave: Zeólita, Imagem por Ressonância Magnética, Agente de Contraste, Gadolínio.

ABSTRACT

The objective of the present work is the synthesis and characterization of zeolitic materials with potential of being applied as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). The materials are the zeolites Faujasite (FAU), zeolites A (LTA), zeolite Beta (BEA), zeolite ZSM-5 (MFI) and zeolite Mordenite (MOR) ion exchanged with lanthanides metals, such as Gadolinium Gd^{3+} . The zeolites ion exchanged with Gadolinium were characterized by x-ray powder diffraction (XRD). Relaxometry studies (relaxation times T_1 and T_2) of the zeolitic materials were performed using the inverse recovery technique and saturation recovery and their variations. The relaxometry studies were performed in collaboration with Prof. Dr. Ponnada A. Narayana from The University of Texas – Health Science Center at Houston. *In vivo* studies were also performed at The University of Texas injecting the potential new contrast agents in *Sprague Dawley* rats and scanning their brain and abdomen. Comparative performance studies of the zeolites and commercial contrast agents were done using the **Gd-DOTA** (gadoteric acid – Dotarem). The Faujasite zeolite showed relaxivity results much higher than the Dotarem, some materials had the relaxivity 10x higher than the Dotarem. In the preliminary tests, the images using the mFAU-1 as contrast showed more details than the images using Dotarem as contrast agent. However on the comparative studies the result was not the same, it may happen because of the superposition of the effect of T_2 over T_1 at these concentrations. The contrast agents based on zeolites maintained in the blood stream for longer periods of time than Dotarem, which makes possible longer exams that rely on the contrast agent. On the other hand, in two days, such as the Dotarem, the clearance is complete, in other words, all contrast is cleared from the animal body. The results obtained up until now are just the beginning of a long study to the development of a new contrast, yet they are promising. Perhaps the adjustment of the concentration of contrast agent to be administered can improve the contrast of the images obtained by MRI.

Keywords: Zeolite, Magnetic Resonance Imaging, Contrast Agent, Gadolinium

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração indicando a localização dos principais itens de um tomógrafo de MRI.	22
Figura 2	Ilustração do Tomógrafo de MRI, evidenciando o superímã e o tanque de hélio líquido.	23
Figura 3	Efeito do gradiente em um núcleo.	24
Figura 4	Bobinas secundárias de MRI.	25
Figura 5	Orientação aleatória dos Spins sem campo magnético e Spins na mesma direção do campo magnético com duas conformações possíveis: paralela e antiparalela.	27
Figura 6	(a) Precessão do momento magnético (μ) ao redor do campo magnético (B_0). (b) Média de diversos momentos magnéticos e Magnetização Total.	27
Figura 7	Esquema da magnetização no estado inicial.	29
Figura 8	Esquema da magnetização no estado excitado.	30
Figura 9	Esquema da magnetização durante o relaxamento do sistema.	31
Figura 10	Representação (a) da recuperação de T_1 e (b) do decaimento de T_2 em função do tempo.	32
Figura 11	Sequência de pulso recuperação inversa .	33
Figura 12	Sequencia de pulso <i>Spin-Echo</i> .	36
Figura 13	Imagens ponderadas em T_1 .	37
Figura 14	Patologia em (a) Imagem ponderada em T_1 de glioma em cérebro. (b)	38

Imagem ponderada em T₂ de hemangioma em fígado.

Figura 15	Estrutura dos principais agentes de contraste utilizados comercialmente.	39
Figura 16	Exemplo de gráfico para o cálculo da relaxividade.	41
Figura 17	Rede Cristalográfica da zeólita Beta e estrutura de poros.	45
Figura 18	Tetraedros de silício e alumínio e arranjo dos tetraedros formando a rede cristalográfica das zeólitas.	46
Figura 19	Unidades Secundárias de Construção.	46
Figura 20	Unidades poliédricas de construção.	47
Figura 21	Típica síntese hidrotérmica de uma zeólita.	49
Figura 22	Cátions de sais quaternário utilizados como SDA neste trabalho. E zeólitas que podem ser obtidas com seu uso.	50
Figura 23	Mecanismo proposto do TPA atuando como SDA na síntese da ZSM-5.	50
Figura 24	Esquema representativo do modelo de dois passos proposto por Peters para a relaxividade em suspensões aquosas de zeólitas NaY trocadas ionicamente com Gd ³⁺ .	54
Figura 25	Esquema tridimensional da estrutura das zeólitas utilizadas neste trabalho (amarelo) e unidades poliédricas de construção que as compõem (azul).	57
Figura 26	Reator utilizado para a troca iônica no estado sólido.	67
Figura 27	Espectrômetro 7 T da Bruker (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Alemanha) utilizado para os estudos relaxométricos e estudos <i>in vivo</i> .	70
Figura 28	Foto do ajuste do animal para as imagens de MR-Angiografia.	71
Figura 29	Padrão de DRX da zeólita Faujasita sintetizada na escala micrométrica e	74

nanométrica.

Figura 30	Imagens de MEV da zeólita Faujasita na escala (a) micrométrica e (b) nanométrica.	74
Figura 31	Padrão de DRX da zeólita A sintetizada na escala micrométrica e nanométrica.	75
Figura 32	Imagens de MEV da zeólita A na escala (a) micrométrica e (b) nanométrica.	75
Figura 33	Padrão de DRX da zeólita Beta sintetizada na escala micrométrica e nanométrica.	76
Figura 34	Imagens de MEV da zeólita Beta na escala (a) micrométrica e (b) nanométrica.	76
Figura 35	Padrão de DRX da zeólita ZSM-5 sintetizada na escala micrométrica (cima) e nanométrica (baixo).	77
Figura 36	Imagens de MEV da zeólita ZSM-5 na escala nanométrica.	78
Figura 37	Padrão de DRX da zeólita Mordenita sintetizada na escala micrométrica e nanométrica.	79
Figura 38	Imagens de MEV da zeólita Mordenita na escala (a) micrométrica e (b) nanométrica.	79
Figura 39	Padrões de DRX da nLTA obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (500 °C, 8h).	80
Figura 40	Padrões de DRX da mBEA obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (600 °C, 8h).	81
Figura 41	Padrões de DRX da nBEA obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (600 °C, 8h).	81
Figura 42	Padrões de DRX da mMFI obtidos (a) antes e (b) depois do processo de	82

calcinação (600 °C, 8h).

Figura 43	Padrões de DRX da nMFI obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (600 °C, 8h).	82
Figura 44	Difratogramas de Raios-X da FAU após a troca iônica.	84
Figura 45	Difratogramas de Raios-X da LTA após a troca iônica.	85
Figura 46	Difratogramas de Raios-X da BEA após a troca iônica.	86
Figura 47	Difratogramas de Raios-X da MFI após a troca iônica.	87
Figura 48	Difratogramas de Raios-X da MOR após a troca iônica.	88
Figura 49	Exemplos de gráfico de $[Gd^{3+}] \times 1/T_1$ montados com medidas realizadas no espectrômetro de RMN de 500 MHz.	90
Figura 50	Tempo de relaxação T_1 (preto) e T_2 (vermelho) x concentração de Gd^{3+} com a zeólita mFAU-2 para determinação da quantidade de zeólita a ser administrada ao objeto de estudo.	95
Figura 51	Insert do gráfico da figura 50.	95
Figura 52	Angiografia de RM. Resultados Preliminares.	97
Figura 53	Imagens da Angiografia de MR antes e após a injeção de 0,2 mmol/Kg de Gd-DOTA.	99
Figura 54	Imagens da Angiografia de MR antes e após a injeção de 0,004 mmol/Kg no animal 4, 0,02 mmol/Kg no animal 5 e 0,05 mmol/Kg no animal 6 do Contraste à base de zeólita.	100
Figura 55	Imagem do abdômen do animal e intensidade do brilho na região indicada.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de T_1 e T_2 de diversos tecidos em 0,5 T, 1,5 T e 3 T.	32
Tabela 2	Escolha de TR e TE para sequencias de <i>Spin-Echo</i> .	35
Tabela 3	Escolha de TR e TE para sequencias de <i>Gradient-Echo</i> .	35
Tabela 4	Principais características dos agentes de contrastes empregados em MRI.	40
Tabela 5	Características estruturais das zeólitas a serem utilizadas neste trabalho.	56
Tabela 6	Massa de cloreto de gadolínio necessária para manter a proporção de 1Gd:3Al.	67
Tabela 7	Resumo dos processos de troca iônica realizados.	68
Tabela 8	Materiais resultantes após a troca iônica.	68
Tabela 9	Tipo de contraste e quantidade administrada.	72
Tabela 10	Análise química da zeólita FAU na escala micrométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.	84
Tabela 11	Análise química da zeólita FAU na escala nanométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.	85
Tabela 12	Análise química da zeólita BEA na escala micrométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.	86
Tabela 13	Análise química da zeólita BEA na escala nanométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.	87
Tabela 14	Análise química da zeólita MOR na escala micrométrica com	88

concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.

Tabela 15	Análise química da zeólita MOR na escala nanométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.	89
Tabela 16	Resultados de relaxividade em $(\text{mM.s})^{-1}$ para as zeólitas testadas – 11.7 T (resultados obtidos no Laboratório Nacional de Biotecnologia – LNNano).	91
Tabela 17	Resultados de relaxividade em $(\text{mM.s})^{-1}$ para as zeólitas testadas – 7T (resultados obtidos na Universidade do Texas durante doutorado sanduíche).	93
Tabela 18	Concentração de Gd-DOTA x tempo de relaxação T_1 .	96
Tabela 19	Tempo de relaxação T_1 (ms) das amostras de urina coletadas antes e depois da injeção do contraste mFAU-2.	102
Tabela 20	Tempo de relaxação T_1 (ms) das amostras de urina coletadas antes e depois da injeção do contraste Gd-DOTA.	102
Tabela 21	Tempo de relaxação T_1 (ms) das amostras de soro coletadas antes e depois da injeção dos contraste mFAU-2 e Gd-DOTA.	103

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Agente de Contraste
BEA	Zeólita Beta
DRX	Difração de Raios-X
FAU	Zeólita Faujasita
GBCA	Agente de Contraste Baseado em Gadolínio
ICP-OES	Espectroscopia de emissão óptica com plasma
IR	Recuperação Inversa
IZA	Associação Internacional de Zeólitas
LNBio	Laboratório Nacional de Biotecnologia
LTA	Zeólita A
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFI	Zeólita ZSM-5
MOR	Zeólita Mordenita
MRI	Imagem por Ressonância Magnética
NIH	Instituto nacional de saúde dos Estados Unidos
PBU	Unidade Primária de Construção
PD	Densidade de Prótons
rf	Radiofrequência

RM / MR	Ressonância Magnética Nuclear
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
SBU	Unidade Secundária de Construção
SDA	Agente Direcionador de Estrutura
SNR	Relação Sinal Ruído
SOD	Zeólita Sodalita
TE	Tempo de Eco
TEA	Tetraetilamônio
TI	Tempo de Inversão
TPA	Tetrapropilamônio
TR	Tempo de Repetição
UTHealth	Universidade do Texas – <i>Health Science Center</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

T	Tesla
$\vec{B}_0$	Vetor Campo Magnético Externo
G	Intensidade de variação do gradiente
ω_0	Frequência de Larmor
$\vec{\mu}$	Vetor Momento Magnético Nuclear
I	Número Quântico de Spin
$\vec{M}_T$	Vetor Magnetização Total
ΔE	Diferença entre níveis de energia
γ	Fator Giromagnético
$\hbar$	Constante de Plank dividida por 2π
$N_{\textit{paralelo}}$	População de núcleos paralelos
$N_{\textit{antiparalelo}}$	População de núcleos antiparalelos
K	Constante de Boltzmann
$\vec{M}_{\textit{long}}$	Vetor magnetização longitudinal
$\vec{M}_{\textit{trans}}$	Vetor magnetização transversal
T_1	Tempo de Relaxação Longitudinal
T_2	Tempo de Relaxação Transversal
t	Tempo
ΔB	Inomogeneidade

TE	Tempo entre dois ecos
D	Coeficiente de difusão
ms	Milissegundo
r_1	Relaxividade 1
r_2	Relaxividade 2
M	Cátion de Compensação
n	Número de Valência do Cátion de Compensação
x	Número de Alumínio por Fórmula Unitária
y	Número de Silício por Fórmula Unitária
z	Número de Moléculas de Água no Sistema de Cavidades
N	Átomo Central
Å	Angstrom
MHz	Megahertz
g	Gramas
kV	Quilovolts
mA	Miliampère
λ	Comprimento de Onda
mm	Milímetro
mM	Milimolar
kg	Quilograma

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	20
1.1. Perspectiva Histórica	20
1.2. O Tomógrafo de MRI	22
1.2.1. Eletroímã	22
1.2.2. Bobinas de Gradientes	23
1.2.3. Sistema de Radiofrequência	25
1.3. Princípios Físicos	26
1.3.1. Estado Inicial	29
1.3.2. Estado Excitado	30
1.3.2. Relaxamento e Tempos de Relaxação	30
1.4. Medindo T_1	33
1.5. A Imagem de Ressonância Magnética	34
1.5.1. Imagens Ponderadas em T_1	37
1.5.2. Imagens Ponderadas em T_2	38
1.5.3. Agentes de Contraste	38
1.5.3.1. Relaxividade	40
CAPÍTULO 2 – ZEÓLITAS	42
2.1. Introdução	42
2.2. Histórico	42

2.3. Estrutura Química	44
2.4. Síntese de Materiais Zeolíticos	48
2.4.1. Agentes Direcionadores de Estrutura (SDA)	49
2.5. Aplicações Gerais das Zeólitas	51
2.5.1. Aplicações Ambientais	51
2.5.2. Aplicações na Indústria Química e Petroquímica	51
2.5.3. Aplicações Biomédicas	52
2.6. Zeólitas como Agente de Contraste	53
CAPÍTULO 3 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	58
3.1. Justificativa	58
3.2. Objetivos	29
3.2.1. Objetivos Específicos	59
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1. Síntese das Zeólitas em Escala Micrométrica	61
4.1.1. Faujasita	61
4.1.2. Zeólita A	61
4.1.3. Zeólita Beta	62
4.1.4. Zeólita ZSM-5	62
4.1.5. Mordenita	63
4.2. Síntese das Zeólitas em Escala Nanométrica	63
4.2.1. Faujasita	63

4.2.2. Zeólita A	64
4.2.3. Zeólita Beta	64
4.2.4. Zeólita ZSM-5	65
4.2.5. Mordenita	65
4.3. Troca Iônica das Zeólitas com o íon Gd^{3+}	66
4.3.1. Troca Iônica em Solução	66
4.3.2. Troca Iônica no Estado Sólido	66
4.4. Caracterização Físico-Química dos Materiais Zeolíticos	69
4.5. Estudos Relaxométricos	69
4.6. Preparo do Contraste para os Estudos <i>In Vivo</i>	70
4.7. Estudos <i>In Vivo</i>	70
4.8. Eliminação do agente de contraste	72
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1. Caracterização Físico-Química das Sínteses por DRX e MEV	73
5.2. Troca Iônica	83
5.3. Relaxividade	89
5.4. Cálculo da Concentração Inicial de Contraste a Ser Administrado	93
5.5. Estudos <i>In Vivo</i>	96
5.6. Eliminação do Agente de Contraste	101
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO	105

CAPÍTULO 7 – PERSPECTIVAS FUTURAS	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXO A - Manuscrito Submetido ao Journal of Biomedical Materials – Part B	115

CAPÍTULO 1

IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

1.1. Perspectiva Histórica

Em 1952 o Premio Nobel de Física foi oferecido a Bloch e Purcell pelo desenvolvimento da Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Juntamente com os avanços desta técnica começaram as primeiras investigações biológicas a envolvendo, com Bloch inserindo seu dedo no centro do eletroímã e verificando um intenso sinal de ressonância [1]. A partir deste momento foram calculados os tempos de relaxação de diversos tecidos humanos, mas somente em 1971 Raymond Damadian mediu o tempo de relaxação de tumores em camundongos e percebeu um aumento nesses tempos em relação aos tecidos saudáveis [1,2].

O primeiro protocolo para gerar Imagens por Ressonância Magnética (Magnetic Resonance Imaging – MRI) foi proposto por Lauterbur em 1972, utilizando o campo magnético uniforme de um espectrômetro de RMN e adicionando a ele outro campo magnético com intensidade variando linearmente no espaço, dispersando assim as frequências do núcleo ^1H em função da sua posição [1,3]. O espectro de RMN obtido era uma projeção da distribuição da água contida em dois capilares perpendicular à direção do gradiente do campo magnético aplicado.

Diversas projeções foram obtidas alterando a direção do gradiente e uma imagem bidimensional foi reconstruída utilizando um algoritmo de reconstrução de projeções [3]. Esta foi a descoberta chave para fazer com que a Imagem por Ressonância Magnética fosse transformada em uma ferramenta médica [1].

Em 1977 as primeiras imagens de um dedo e pulso humano foram coletadas utilizando eletroímãs resistivos (0,35 T e 0,7 T, respectivamente), os anos 1980 trouxeram dois fatores que tornaram a MRI clínica possível (i) o desenvolvimento de diversos protocolos, criando-se, então, um repertório básico para obtenção de imagens tornando a MRI financeiramente viável [1,3]; (ii) e a criação dos eletroímãs supercondutores (utilizando filamentos de Nb-Ti em uma matriz de cobre) proporcionou campo magnético uniforme (1,5 T) em uma área grande o suficiente para compor um tomógrafo de corpo inteiro capaz de produzir imagens de alta qualidade [4].

Em 1985 a maioria dos sistemas de MRI clínicos era operados com campos magnéticos menores que 1 T, porém os primeiros tomógrafo de MRI alto campo ($\geq 1,5$ T) já estavam sendo instalados. Ao longo dos anos esse número foi aumentando até que em 1997 era certo que os tomógrafos de 1,5 T eram o novo padrão de intensidade de campos magnéticos. Nesse momento já havia avanços também no design das bobinas de radiofrequência, no uso de agentes de contraste e protocolos de imagem ainda mais rápidos, tudo isso aumentou a sensibilidade e a velocidade da técnica [4].

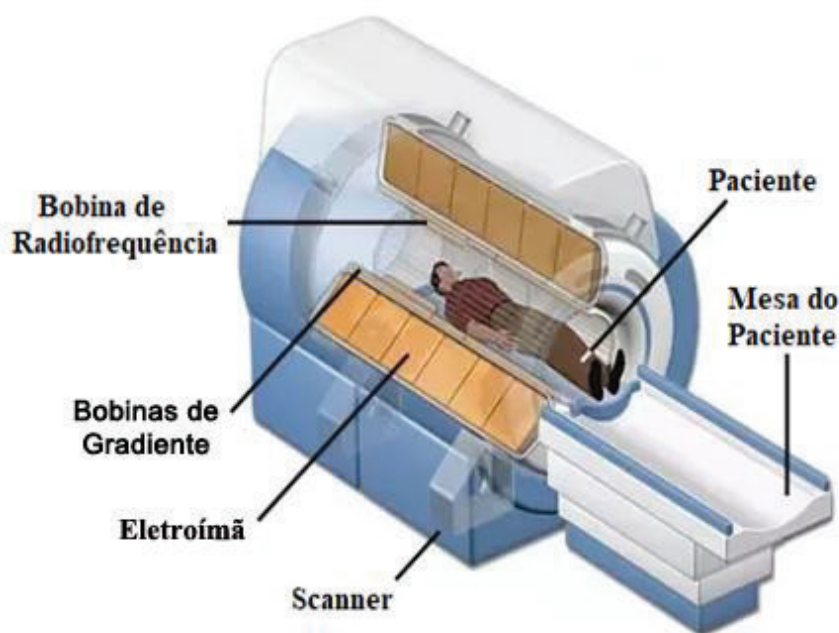
Nas últimas duas décadas novos avanços tornaram o uso da MRI mais diversificado com o desenvolvimento de novas técnicas, dentre elas (i) MR-Angiografia, para medidas de fluxo; (ii) Imagens de pulmão, utilizando $^3\text{He}/^{129}\text{Xe}$ hiperpolarizado; e (iii) Imagens funcionais, que tornam possível o mapeamento do cérebro humano para várias atividades físicas e visuais [3].

Hoje, a Imagem por Ressonância Magnética é amplamente utilizada para a obtenção de imagens de estruturas internas do corpo de forma não invasiva. Os tomógrafos de MRI clínicos tem potência de até 3 T, porém já existem tomógrafo de 7 T, 9,4 T e 10,5 T utilizados apenas para pesquisa [4].

1.2. O Tomógrafo de MRI

O tomógrafo de MRI é composto por diversos componentes, tendo como principais o eletroímã, os gradientes e sistema de radiofrequência que serão descritos a seguir.

Figura 1 – Ilustração indicando a localização dos principais itens de um tomógrafo de MRI.



FONTE: Adaptado pelo autor de página da internet [5].

1.2.1. Eletroímã

O experimento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) depende da exposição de uma amostra a um intenso campo magnético gerado por um eletroímã. Por isso, este é o principal componente do sistema de RMN. Eletroímãs grandes o suficiente para análises do corpo todo têm campos magnéticos que variam de 0,02 a 8 T. Para análises clínicas os campos geralmente variam de 0,2 a 3 T. Algumas vantagens de campos magnéticos mais intensos são melhor relação sinal/ruído (SNR) e maior resolução da imagem. Para serem capazes de criar campos magnéticos tão intensos são utilizadas bobinas supercondutoras, que devem ser mantidas em temperaturas criogênicas a fim de manterem esta propriedade, por isso existem tanques de hélio líquido (temperatura de ebulição = $-273\text{ }^{\circ}\text{C}$) ao redor da bobina, como exemplificado na figura 2 [6–8]. Normalmente os tomógrafos de MRI têm um sistema para condensar o hélio líquido que evapora e o bombear novamente para o tanque, desta forma não é necessário o tanque de nitrogênio líquido (temperatura de ebulição = $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) ao redor do

tanque de hélio como no caso de muitos espectrômetros de RMN, onde eles são utilizados para manter a temperatura baixa e retardar a evaporação do hélio líquido.

Figura 2 – Ilustração do Tomógrafo de MRI, evidenciando o eletroímã e o tanque de hélio líquido.



FONTE: Página da internet [9].

As amostras são posicionadas na área interna da bobina, este local é conhecido como *bore*. Nesta região o campo magnético deve ser uniforme a fim de não distorcer os dados obtidos, porém devido à forma do eletroímã o campo magnético não é normalmente uniforme e sua homogeneidade deve ser otimizada pelo processo conhecido como *shimming*. Na instalação do tomógrafo já é realizado um *shimming* inicial, mas a inserção da amostra no *bore* causa uma leve distorção no campo magnético e nesse momento o processo de *shimming* deve ser realizado novamente ajustando a corrente de bobinas elétricas incorporadas à bobina principal de forma a aumentar a homogeneidade do campo magnético para a realização das medidas [6].

1.2.2. Bobinas de Gradiente

Para que seja possível localizar um sinal de RMN no corpo a fim de formar uma imagem, são aplicados campos magnéticos com variações lineares na sua intensidade, por causa dessas variações, esses campos magnéticos são chamados de gradientes. Os gradientes são produzidos por um conjunto de três bobinas de gradiente (uma para cada eixo) pelas quais altas correntes elétricas são aplicadas repetidamente ao longo de uma sequência de pulso. O

uso de altos gradientes permite visualizar menores detalhes da anatomia e permite scans mais rápidos [6].

Quando um gradiente é adicionado ao campo magnético B_0 haverá uma variação na intensidade do campo no eixo em que o gradiente foi aplicado. No eixo x, por exemplo, temos o campo magnético variando da seguinte forma:

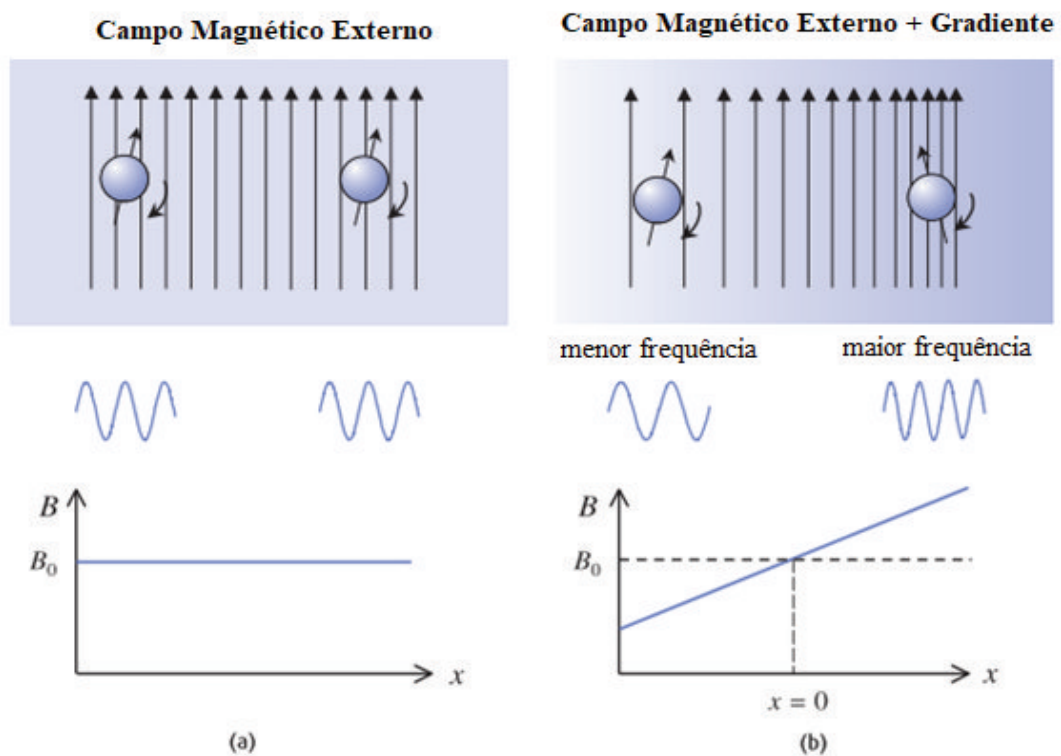
$$B(x) = B_0 + G \cdot x \quad (\text{equação 1})$$

Onde G é o coeficiente linear e determina a intensidade da variação do gradiente. Com isso a frequência de precessão de um núcleo também irá depender de sua posição:

$$\omega(x) = \gamma (B_0 + G \cdot x) \quad (\text{equação 2})$$

Deste modo o próprio sinal de RMN carregará consigo a informação que permite distinguir sua posição no espaço. A figura 3 exemplifica como essa localização é possível [6,7].

Figura 3 – Efeito do gradiente em um núcleo. (a) Campo magnético externo, todos os núcleos precessionam na mesma frequência. (b) Campo Magnético externo mais gradiente, dependendo da posição o núcleo precessiona em uma frequência ligeiramente diferente. O que possibilita a determinação da localização deste núcleo.



FONTE: McRobbie, 2016 [6].

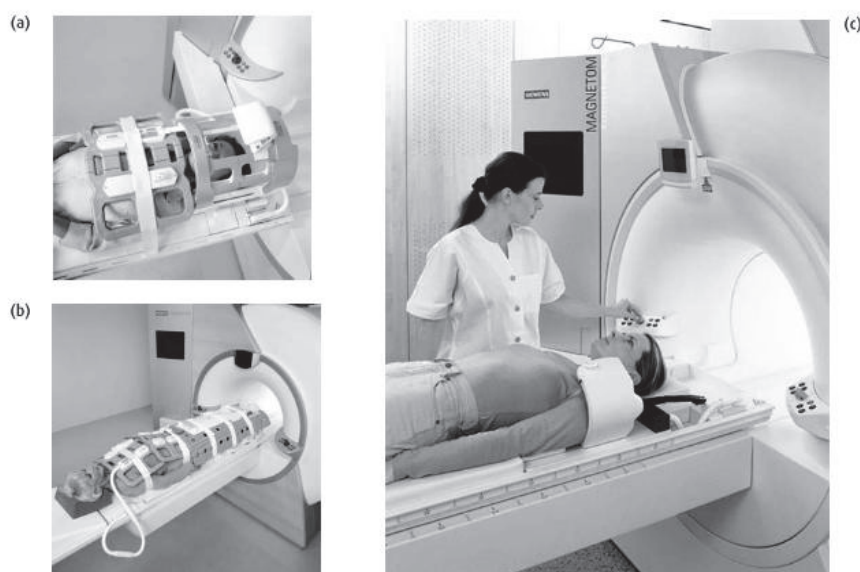
1.2.3. Sistema de Radiofrequência

Para um experimento de RMN a amostra exposta ao campo magnético gerado pelo eletroímã terá seus núcleos magneticamente ativos excitados por uma radiação eletromagnética durante um intervalo de tempo e, depois, enquanto esses núcleos relaxam e voltam ao seu estado inicial, um sinal é gerado pela amostra e deve ser detectado. A excitação da amostra se deve à aplicação de uma onda de radiofrequência (rf) com frequência similar à frequência de vibração dos núcleos ^1H quando sujeitos ao campo magnético do equipamento. Essa frequência é conhecida como frequência de Larmor (ω_0) e será definida na próxima seção.

Uma bobina é responsável por emitir um pulso de rf que irá excitar a amostra temporariamente. Ao fim deste pulso os núcleos da amostra tendem a voltar a seu estado inicial e relaxam. Durante essa relaxação uma onda de rf é emitida pela amostra e deve ser reconhecida pela bobina. Como os dois sinais não acontecem ao mesmo tempo a mesma bobina pode fazer o papel de emissor e detector das ondas de rf, mas na prática usa-se uma bobina secundária para detectar as ondas de rf.

A onda de rf reconhecida pela bobina é então submetida à amplificação, uma vez que o sinal reconhecido é muito fraco, e depois à digitalização. Algumas vezes bobinas secundárias são posicionadas sobre as regiões a serem estudadas para que a detecção da onda de rf seja mais efetiva. Alguns exemplos de bobinas secundárias estão indicados na figura 4.

Figura 4 – Bobinas secundárias de MRI. (a) Bobina de corpo e de cabeça. (b) Bobina de angiografia periférica. (c) Bobina flexível.



FONTE: McRobbie, 2016 [6].

1.3. Princípios Físicos

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um fenômeno quântico, porém é possível fazer uma analogia semi-clássica que carrega as propriedades quânticas deste fenômeno. Desse modo é possível entender mais facilmente o que está acontecendo no sistema.

A Imagem por Ressonância Magnética (MRI) usa dos mesmos princípios físicos da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, adicionando a eles os gradientes que possibilitam apontar no espaço a localização das ondas de rf emitidas pela amostra. Na Espectroscopia de RMN as amostras devem ser homogêneas, com isso toda a amostra irá emitir o mesmo sinal independente do local de onde ele é emitido, fazendo com que o uso de gradiente não seja necessário. Já a MRI quer mostrar os diferentes tecidos de uma região a ser analisada, por isso saber a localização de cada sinal emitido é muito importante.

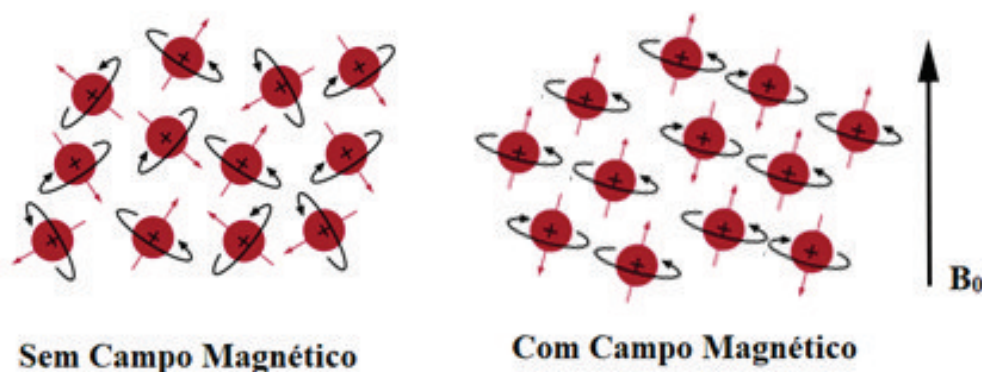
Para que uma amostra seja visível na RMN ela deve conter núcleos magneticamente ativos, dessa forma eles podem interagir com os campos magnéticos do equipamento. Um núcleo é considerado magneticamente ativo quando ele possui momento magnético nuclear (μ) não nulo, ou seja, o número quântico de spin $I \neq 0$, sendo que spins semi-inteiros são ideais, $I = 1/2, 3/2, 5/2, \dots$, isso acontece quando o número atômico de um núcleo é ímpar. O núcleo ^1H apresenta $I = 1/2$ e é o isótopo mais abundante dentre os isótopos de hidrogênio, além disso, o corpo é composto em grande parte por água e gordura, duas moléculas que contém grande quantidade de hidrogênio em sua estrutura. Com isso, dentre os núcleos mais abundantes no nosso organismo (^1H , ^{12}C e ^{16}O), somente o núcleo de hidrogênio ^1H é visível na RMN [10].

As medidas de RMN são feitas a partir de um grande conjunto de spins similares e não somente de um spin individual. Dessa forma existem duas representações possíveis para o que está acontecendo com os spins de um tecido ao longo de uma medida: a representação microscópica, que representa a ação de cada spin individualmente; e a representação macroscópica, que representa a ação do conjunto de spins como um todo, esta representação não é tão completa, porém é o suficiente para uma descrição adequada [10].

Em um tecido cada núcleo (^1H) apresenta um momento magnético ($\vec{\mu}$) de igual magnitude, porém eles estão orientados aleatoriamente em diversas direções. A soma desses $\vec{\mu}$ será a magnetização total do tecido, ou sistema, ($\vec{M}_T$) nesse caso $\vec{M}_T = 0$. Quando o tecido é

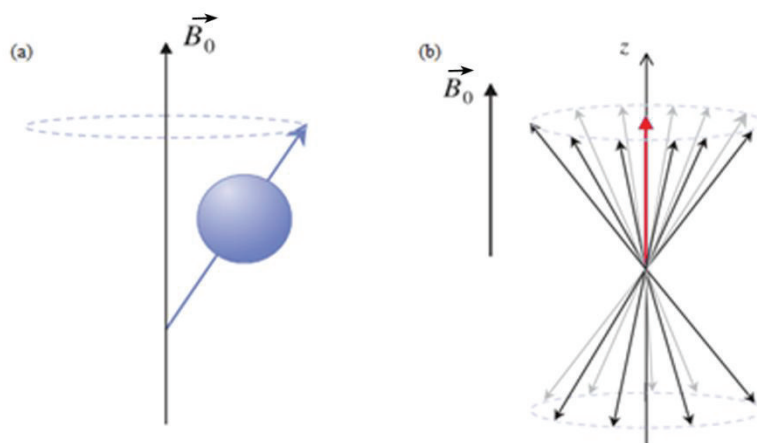
submetido a um campo magnético externo o momento magnético de cada núcleo começa a interagir com o campo magnético externo e a projeção do momento magnético passa a se orientar em somente uma direção, a mesma em que o campo magnético ($\vec{B}_0$) está sendo aplicado, como mostram as figuras 5 e 6 [10].

Figura 5 – Orientação aleatória dos Spins sem campo magnético e Spins na mesma direção do campo magnético com duas conformações possíveis: paralela e antiparalela.



FONTE: Autoria própria, 2019.

Figura 6 – (a) Precessão do momento magnético ($\vec{\mu}$) ao redor do campo magnético (B_0). (b) Média de diversos momentos magnéticos e Magnetização Total em vermelho.



FONTE: McRobbie, 2016 [6].

O momento magnético do núcleo ($\vec{\mu}$) não se alinha perfeitamente com o campo magnético externo ($\vec{B}_0$), na realidade ele precessiona ao redor do campo magnético. Na figura 6 é possível visualizar este movimento. Esse $\vec{\mu}$ pode ser dividido em duas componentes, uma vertical e outra horizontal. A componente vertical de $\vec{\mu}$ se mantém na mesma posição, porém sua componente horizontal irá girar ao redor do campo magnético. Quando todos os momentos magnéticos de um sistema são somados há uma Magnetização Total ($\vec{M}_T$) na

mesma direção do campo magnético. Isso acontece porque, como pode ser visto na figura 6b, os momentos magnéticos não estão em fase, e a somatória das componentes horizontais é igual à zero [6].

Como dito anteriormente, quando sujeitos ao intenso campo magnético do equipamento de MRI as projeções dos spins do núcleo de ^1H passam a ter a preferência de se orientar na mesma direção do campo magnético. Eles podem se encontrar tanto no mesmo sentido de $\vec{B}_0$ (estado paralelo) quanto no sentido oposto a $\vec{B}_0$ (estado antiparalelo). Cada um desses estados apresenta um nível de energia diferente, a diferença de energia entre esses dois níveis é dada por:

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0 \quad (\text{equação 3})$$

Sendo γ o fator giromagnético, intrínseco de cada núcleo magnético ($\gamma_{\text{hidrogênio}} = 42,56 \text{ mHz}$), $\hbar$ é a constante de Plank dividida por 2π e B_0 é a intensidade do campo magnético aplicado. Devido a essa diferença de energia entre os dois estados, aquele que apresenta nível de energia mais baixo é o mais povoado [6]. No equilíbrio térmico a proporção entre os estados paralelos e antiparalelos em relação ao campo aplicado é governada pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N_{\text{paralelo}}}{N_{\text{antiparalelo}}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{KT_p}\right) \quad (\text{equação 4})$$

Onde N_{paralelo} e $N_{\text{antiparalelo}}$ correspondem à população de núcleos paralelos e antiparalelos ao campo magnético externo, respectivamente. K é a constante de Boltzmann e T_p é a temperatura absoluta em Kelvin [6]. Seguindo essa distribuição e considerando um tecido na temperatura do corpo (37°C) submetido a um campo externo de 1,5 T, temos:

$$\frac{N_{\text{paralelo}}}{N_{\text{antiparalelo}}} = 1,000004 \quad (\text{equação 5})$$

O estado paralelo é ligeiramente favorecido por ser o estado de menor energia, com isso o $\vec{M}_T$ terá a mesma direção e sentido do campo magnético externo. Porém pela equação 5 nota-se que em um tomógrafo de 1,5 T para cada milhão de prótons antiparalelos existem um milhão e quatro prótons paralelos [6]. Consequentemente a $\vec{M}_T$ e o sinal obtido pelo equipamento são muito baixos, por isso tomógrafos com campos magnéticos cada vez maiores tem sido utilizados e outros artifícios também foram desenvolvidos, como bobinas secundárias e

agentes de contraste a fim de melhorar a imagem final obtida.

Com a equação 3 nota-se que a diferença de energia dentre os dois estados é proporcional à intensidade de $\vec{B}_0$, usando a equação de onda de De Broglie:

$$\Delta E = \hbar \omega_0 \quad (\text{equação 6})$$

É possível calcular a frequência da radiação eletromagnética necessária para fazer um spin mudar de um estado para outro. Essa frequência é conhecida como frequência de Larmor (ω_0):

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (\text{equação 7})$$

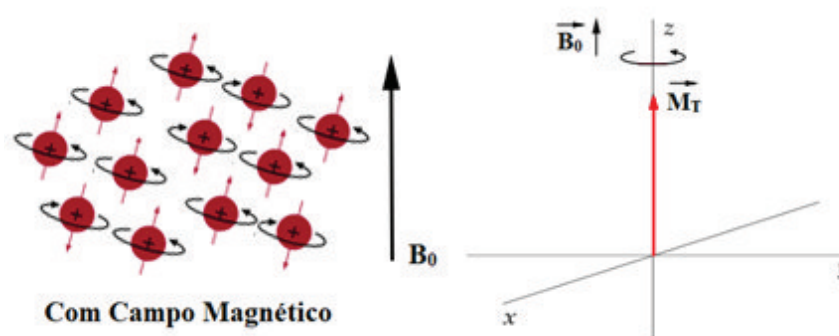
Para que um sinal com informações sobre o tecido seja obtido é necessário que haja uma perturbação no sistema e que ele volte ao seu estado original. A seguir os três momentos chave para a obtenção de sinais de RMN são descritos:

1.3.1. Estado inicial

De forma a facilitar a representação do sistema, o plano cartesiano será representado girando na mesma frequência de $\vec{\mu}$, ou seja, na frequência de Larmor deste núcleo (ω_0). No estado inicial os núcleos estão tanto nos estados paralelo e antiparalelo, com certa preferência ao estado paralelo. Sendo assim, o sistema tem uma $\vec{M}_T$ diferente de zero e na mesma direção do campo magnético $\vec{B}_0$. Os spins estão todos na mesma frequência ω_0 , porém eles estão fora de fase, com isso a magnetização transversal é nula.

$$\vec{M}_T = \vec{M}_{long} \quad (\text{equação 8})$$

Figura 7 – Esquema da magnetização no estado inicial, ou seja, antes do pulso rf.

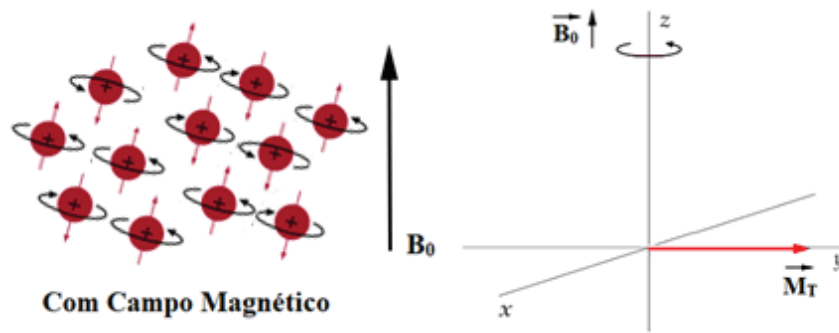


1.3.2. Estado excitado

Para que o sistema seja excitado é necessário aplicar um pulso rf com um espectro de frequências próximo à frequência de Larmor (ω_0) do núcleo. Esse pulso irá transmitir a energia necessária para que núcleos no estado paralelo passem para o estado antiparalelo. Um pulso rf de 90 ° oferece energia o suficiente para que as populações dos dois estados sejam iguais e, conseqüentemente, a magnetização longitudinal passe a ser zero. O pulso rf também fará com que os núcleos entrem em fase, fazendo com que a magnetização transversal seja diferente de zero.

$$\vec{M}_T = \vec{M}_{trans} \quad (\text{equação 9})$$

Figura 8 – Esquema da magnetização no estado excitado, ou seja, durante o pulso de rf.



FONTE: Autoria própria, 2019.

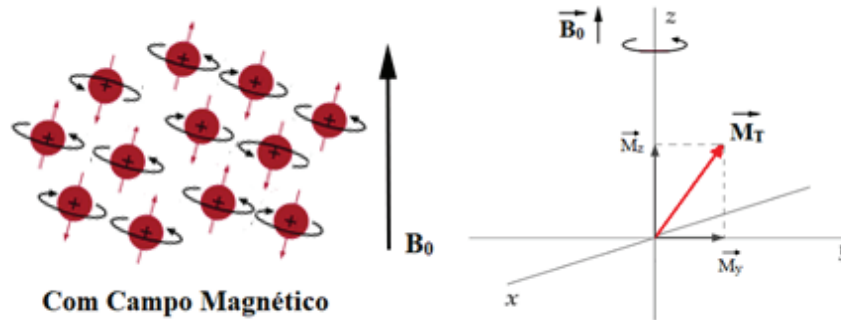
1.3.3. Relaxamento e Tempos de Relaxação

No momento em que o pulso rf é interrompido o sistema começa a relaxar a fim de voltar ao estado inicial. O modo como o sistema relaxa é diferente dependendo da vizinhança ao redor dos núcleos, seja pela quantidade de núcleos ou pelo meio onde ele se encontra. Os tempos de relaxação T_1 e T_2 descrevem a maneira que essa relaxação acontece, esses tempos também irão indicar a intensidade do brilho em determinada região de uma imagem por ressonância magnética quando forem utilizados para contrastar a imagem.

Ao fim do pulso rf os núcleos excitados voltam a popular o estado paralelo, recuperando $\vec{M}_{long}$; nesse momento os spins desses núcleos começam a se defasar e conseqüentemente $\vec{M}_{trans}$ volta a diminuir até ser nula novamente. O tempo necessário para a recuperação de $\vec{M}_{long}$ é conhecido como tempo de relaxação spin-rede ou tempo de relaxação T_1 e o tempo

necessário para a extinção da $\overline{M_{trans}}$ é conhecido como tempo de relaxação spin-spin ou tempo de relaxação T_2 .

Figura 9 – Esquema da magnetização durante o relaxamento do sistema.



FONTE: Autoria própria, 2019.

O tempo de relaxação longitudinal (T_1) pode então ser definido como o tempo característico do processo de dissipação da energia adicionada ao sistema pelo pulso de rf. Os núcleos excitados, que passaram a habitar outro estado de energia, voltam ao seu estado original liberando a energia em forma de ondas de rf.

$$M_{long}(t) = M_T \left[1 - \exp\left(-t/T_1\right) \right] \quad (\text{equação 10})$$

Na equação 10, T_1 é uma constante e t é o tempo. Quando $T_1 = t$, $M_{long} = 0,63M_T$, indicando que neste momento 63% da magnetização já foi restaurada. O tempo T_1 corresponde ao tempo que leva após a interrupção de um pulso de rf de 90° para que a componente longitudinal do momento magnético atinja 63% do seu valor de equilíbrio.

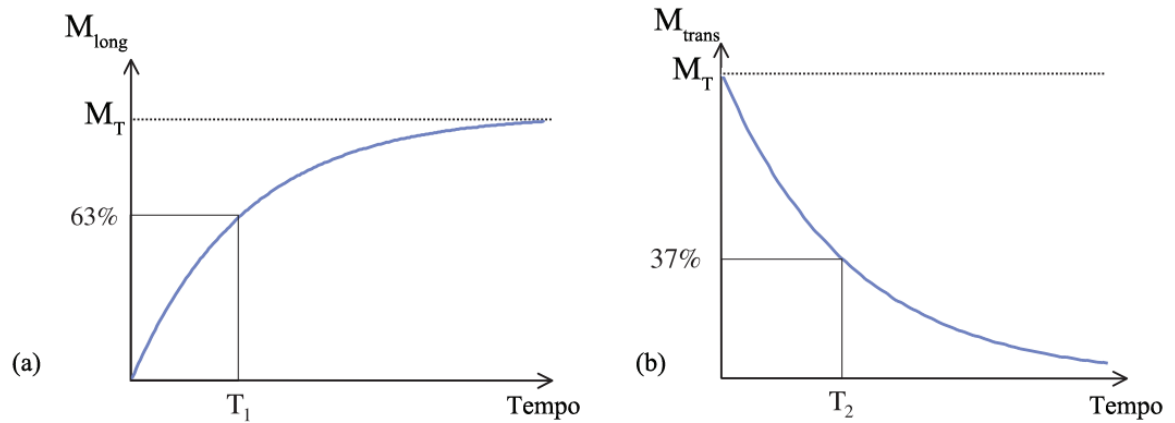
O tempo de relaxação transversal (T_2) é o tempo característico do processo de desorganização do sistema depois do pulso de rf.

$$M_{trans} = M_{trans} \cdot \cos(\omega_0 t) \cdot \exp\left(\frac{-t}{T_2}\right) \quad (\text{equação 11})$$

Na equação 11, T_2 é definido como sendo o coeficiente de decaimento exponencial da função que rege o sinal de magnetização, assim, quando $t = T_2$, $M_{trans} = 0,37\%M_T$. Sendo assim, T_2 é o tempo necessário para que os momentos magnéticos saiam de fase após uma excitação e a componente transversal da Magnetização Total decaia para 37% do seu valor durante o pulso de rf de 90° . Em tecidos biológicos os valores numéricos de T_2 geralmente são inferiores aos

de T_1 , como pode ser visto na tabela 1.

Figura 10 – Representação (a) da recuperação de T_1 e (b) do decaimento de T_2 em função do tempo.



FONTE: McRobbie, 2016 [6].

Tabela 1 – Valores de T_1 e T_2 de diversos tecidos em 0,5 T, 1,5 T e 3 T. Todos os valores foram medidos *in vivo* em tecidos humanos.

Tecido	T_1 (ms)			T_2 (ms)		
	0,5 T	1,5 T	3,0 T	0,5 T	1,5 T	3,0 T
Matéria Branca	520	560	832	107	82	110
Matéria Cinza	780	1100	1331	110	92	80
Músculo	560	1075	898	34	33	29
Gordura	192	200	382	108	-	68
Fígado	395	570	809	96	-	34
Baço	760	1025	1328	140	-	61

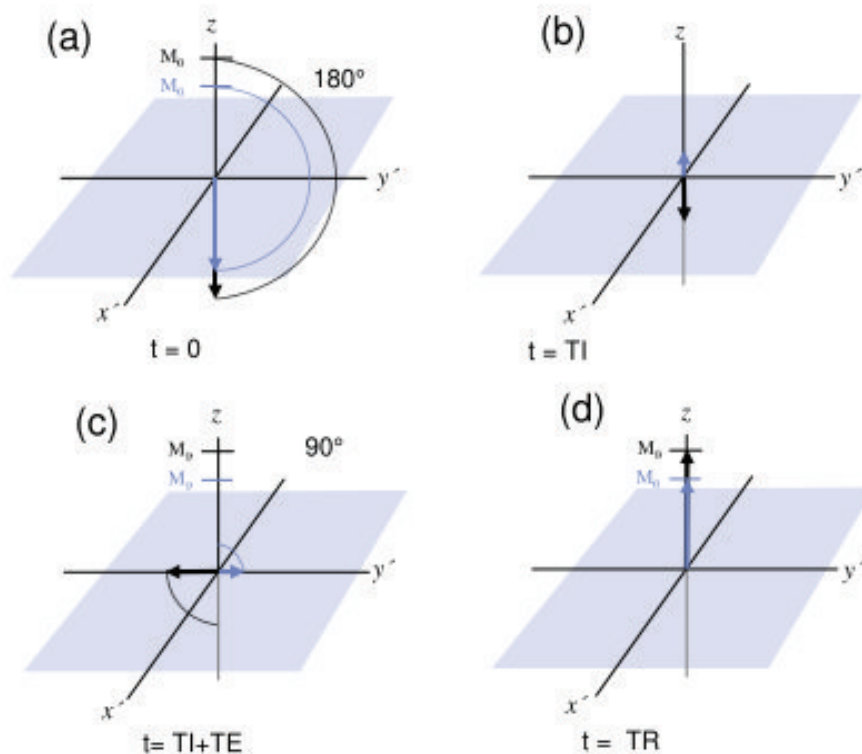
FONTE: McRobbie, 2016 [6].

1.4. Medindo T_1

Para a obtenção de T_1 , pelo menos cinco sinais S (equação 12), serão plotados em um gráfico como o da figura 11a e a partir daí é possível o cálculo de T_1 a partir da equação 10. O sinal S é obtido através de uma sequência de recuperação inversa (*inversion recovery – IR*), e para a medida de cada um dos cinco sinais S será utilizado um tempo de inversão (TI) diferente na sequência de IR [6].

As sequências IR começam com um pulso de 180° (fig. 11a), e durante o tempo TI T_1 começa a se recuperar. Quando o pulso de 90° é aplicado parte do sinal pode ainda ser negativo, por isso uma mistura de ecos positivos e negativos são formados (fig. 11c). O tempo de repetição (TR) deve ser pelo menos cinco vezes maior que o tempo T_1 necessita para relaxar após um pulso de 90° (fig. 11d), o que pode ser um problema, uma vez que queremos descobrir o valor de T_1 , e se TR for muito curto o T_1 medido não será correto [6].

Figura 11 – (a) O pulso inicial de 180° inverte a magnetização, esta começa a se recuperar. (b) Quando o pulso de 90° é aplicado, parte do sinal ainda pode ser negativo, então (c) será formada uma mistura de ecos positivos e negativos. O TR deve ser sempre pelo menos cinco vezes maior que o T_1 para permitir total relaxação do sistema (d).



FONTE: McRobbie, 2016 [6].

Se TR for longo o suficiente, o sinal S a cada TI será dado por:

$$S(TI) = M_T \left[1 - 2\exp\left(-\frac{TI}{T_1}\right) + \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \right] \quad (\text{equação 12})$$

Assumindo que o T_1 mais longo em tecidos biológicos é aproximadamente 1200 ms, TR deve ser no mínimo 5000 ms e uma vez que pelo menos cinco TIs diferentes devem ser utilizados, o processo completo levará vários minutos para ser concluído. Por isso o processo para a medida de T_1 é bem longo quando comparado a outros processos de MRI [6].

1.5. A imagem de Ressonância Magnética

Para a produção das imagens de Ressonância Magnética é necessário uma sequência de pulsos complexa que será diferente dependendo de como é a imagem desejada ao final da análise. A sequência de pulso está armazenada no computador e nela estão todas as informações necessárias para um experimento, assim como a duração e potência de cada pulso rf, além do tempo entre cada pulso.

Existem dois tipos principais de sequência de pulso: o primeiro é conhecido como *Spin-Echo* e depende de dois pulsos de radiofrequência que irão criar um eco que tornará possível medir a intensidade do sinal gerado pelo objeto de estudo. O segundo método é o *Gradient-Echo*, neste caso apenas um pulso rf é utilizado e um pulso de gradiente é responsável por criar o eco. No primeiro método as imagens obtidas apresentam melhor qualidade, porém levam mais tempo para serem obtidas, enquanto no segundo método o tempo de scan diminui da ordem de minutos para segundos uma vez que o tempo de repetição (TR) é muito menor que no *Spin-Echo* [6].

Com esses dois métodos é possível obter imagens que dependem das seguintes propriedades naturais do hidrogênio: a quantidade de prótons (*proton density* – PD) e os tempos de relaxação T_1 e T_2 . Cada uma destas imagens apresenta contraste dependendo de cada uma dessas propriedades separadamente. Em imagens do tipo PD, por exemplo, uma alta densidade de prótons gera sinais de alta intensidade que darão origem a pixels mais brilhantes. Em imagens ponderadas em T_2 , tecidos com T_2 mais longos são os que apresentam sinais mais intensos e consequentemente aparecem na imagem com mais brilho. Por outro lado, nas imagens ponderadas em T_1 quando o tecido apresenta T_1 longo, o sinal é mais fraco e consequentemente ele aparece mais escuro na imagem.

Em uma sequência de *Spin-Echo* os spins irão se defasar naturalmente após o pulso rf de 90° por certo período de tempo ($TE/2$). Então um pulso de 180° aplicado no plano transversal fará com que os spins invertam o sentido da sua precessão voltando a entrar em fase após este mesmo período de tempo ($TE/2$). O tempo entre o pulso de 90° e o eco é chamado de tempo de eco (*echo-time* - TE). Na figura 12 há um esquema exemplificando uma sequência de *Spin-Echo*, para uma imagem esta sequência é repetida diversas vezes a fim de melhorar a razão sinal/ruído e o tempo entre a repetição desta sequência é conhecido como tempo de repetição (TR).

As tabelas 2 e 3 mostram como os tempos TR e TE influenciam no tipo de imagem a ser obtida com as sequências mencionadas acima.

Tabela 2 – Escolha de TR e TE para sequências de *Spin-Echo*.

TR	TE	
	Curto (menor que 40 ms)	Longo (maior que 75 ms)
Curto (menor que 750 ms)	Ponderada em T_1	-
Longo (maior que 1500 ms)	Ponderada em PD	Ponderada em T_2

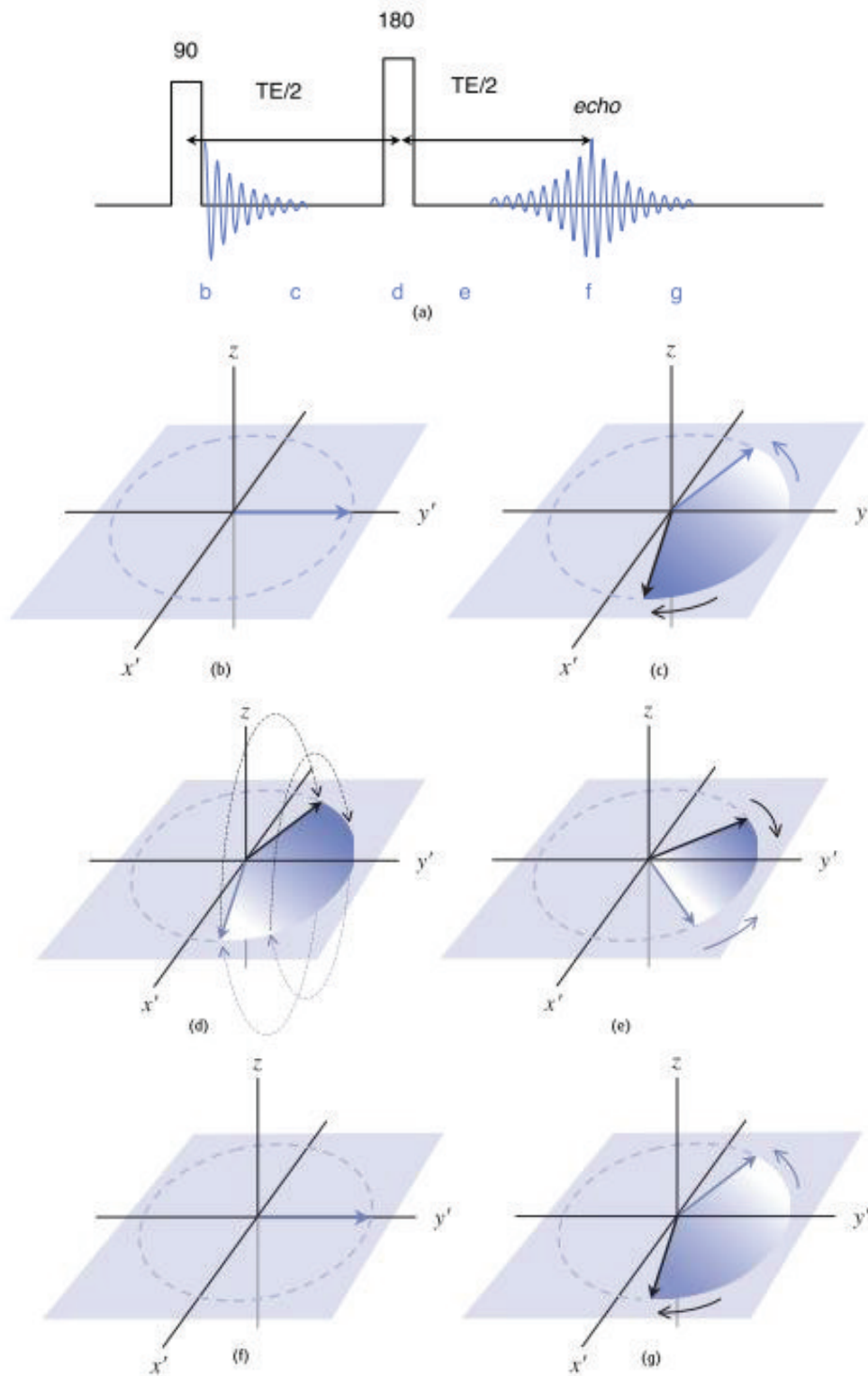
FONTE: McRobbie, 2016 [6].

Tabela 3 – Escolha de TR e TE para sequências de *Gradient-Echo*.

Ângulo do pulso de rf	TE	
	Curto (menor que 15 ms)	Longo (maior que 30 ms)
Curto (menor que 40°)	Ponderada em PD	Ponderada em T_2
Longo (maior que 50°)	Ponderada em T_1	-

FONTE: McRobbie, 2016 [6].

Figura 12 – (a) Sequência de pulso *Spin-Echo*. (b) defasagem natural (c) até que um pulso de 180° é aplicado. (d) imediatamente após o pulso as fases são revertidas, porém elas continuam a defasar na mesma direção (e) formando um eco (f) e então defasando novamente (g). Imagem obtida na literatura.



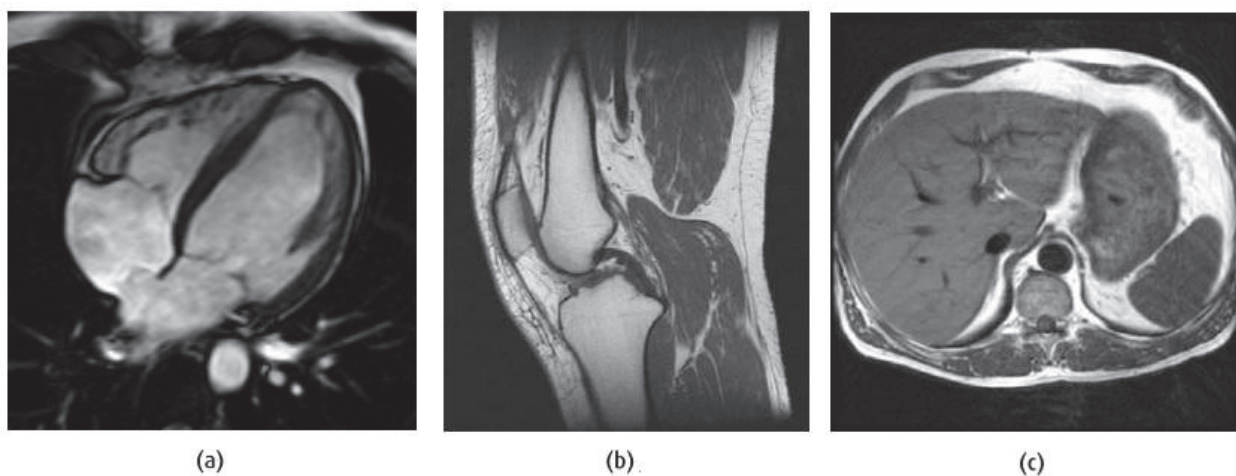
FONTE: McRobbie, 2016 [6].

1.5.1. Imagens ponderadas em T_1

Imagens ponderadas em T_1 apresentam ótimo contraste tecidual: fluidos são mais escuros, tecidos com grande quantidade de água aparecem cinzentos e tecidos constituídos principalmente por gordura são muito claros. Essas imagens são as mais anatômicas, e mostram nitidamente os tecidos e suas barreiras, alguns exemplos estão representados na figura 13. Imagens ponderadas em T_1 podem trazer benefício adicional quando realizadas após a administração de agentes de contraste a base de gadolínio (Gd). Devido à acumulação seletiva do contraste, apenas algumas regiões terão os valores de T_1 alterados e isso torna possível identificar certas lesões, como rupturas na barreira sangue-cérebro [6,7]. Como já foi mencionado, tecidos com longos T_1 aparecem mais escuros nas imagens ponderadas em T_1 , com isso é possível assumir que certas patologias como edemas ou um grande conjunto de capilares, por conterem alta concentração de fluidos, irão aparecer mais escuras na imagem do que o tecido normal.

Para que o contraste de imagens ponderadas em T_1 seja satisfatório o tempo de repetição (TR) entre as excitações do sistema deve ser ajustado. TRs muito longos farão com que o contraste entre fluidos e tecidos gordurosos não seja muito grande, por isso o TR nesses casos deve ser diminuído. Quanto menores os tempos de repetição em uma sequência de imagens mais ponderada em T_1 será a imagem.

Figura 13 – Imagens ponderadas em T_1 (a) Oblíqua da câmara-4 do coração (b) sagital do joelho (c) axial do fígado.

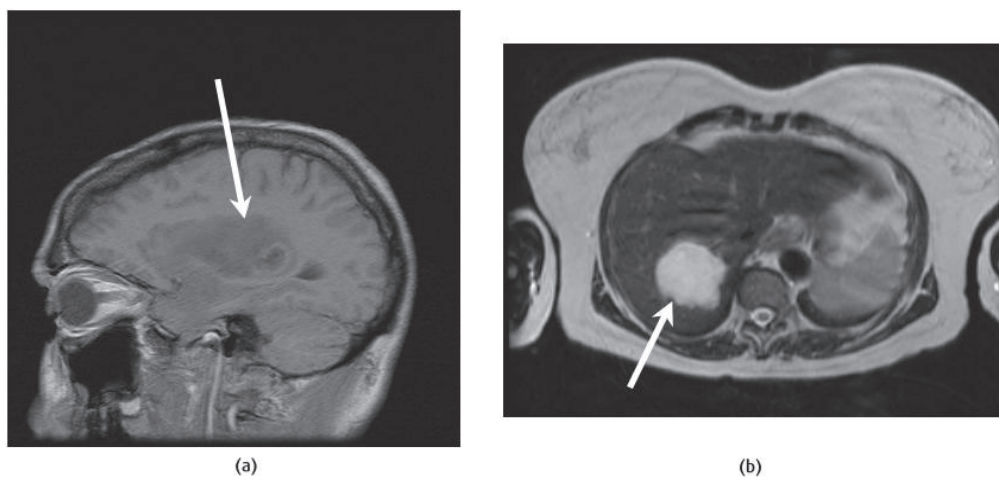


FONTE: McRobbie, 2016 [6].

1.5.2. Imagens ponderadas em T_2

Imagens ponderadas em T_2 geralmente levam mais tempo para serem adquiridas já que o TR e o TE devem ser mais longos. Neste tipo de imagem os fluidos aparecem mais claros, enquanto tecidos compostos por água ou gordura são mais cinzentos. As imagens ponderadas em T_2 são normalmente utilizadas para identificação de patologias, já que fluidos anormais irão aparecer muito mais claros que o tecido saudável ao seu redor. A figura 14 mostra como imagens ponderadas em T_2 mostram claramente patologias [6].

Figura 14 – Patologia em (a) Imagem ponderada em T_1 de glioma em cérebro. (b) Imagem ponderada em T_2 de hemangioma em fígado.



FONTE: McRobbie, 2016 [6].

1.5.3. Agentes de contraste

Como em qualquer método de imagem em medicina, foi desenvolvido para a RMN um meio de contraste que pudesse realçar as lesões e não os tecidos normais, que facilitasse sua localização, características e diagnóstico diferencial. Os meios de contraste geralmente utilizados em RMN, portanto, afetam seletivamente os tempos de relaxação T_1 dos diferentes tecidos, embora os tempos de recuperação T_2 possam também ser alterados pela introdução desses meios.

Os agentes de contraste mais utilizados são baseados em gadolínio (*Gadolinium based contrast agents* – GBCA), um elemento metálico com forte suscetibilidade paramagnética. Ou seja, tem a capacidade de diminuir T_1 em tecidos onde ele se acumula e consequentemente as imagens ponderadas em T_1 dessas regiões serão mais claras. O gadolínio normalmente é injetado no corpo pela corrente sanguínea e rapidamente se redistribui nos fluidos de espaços

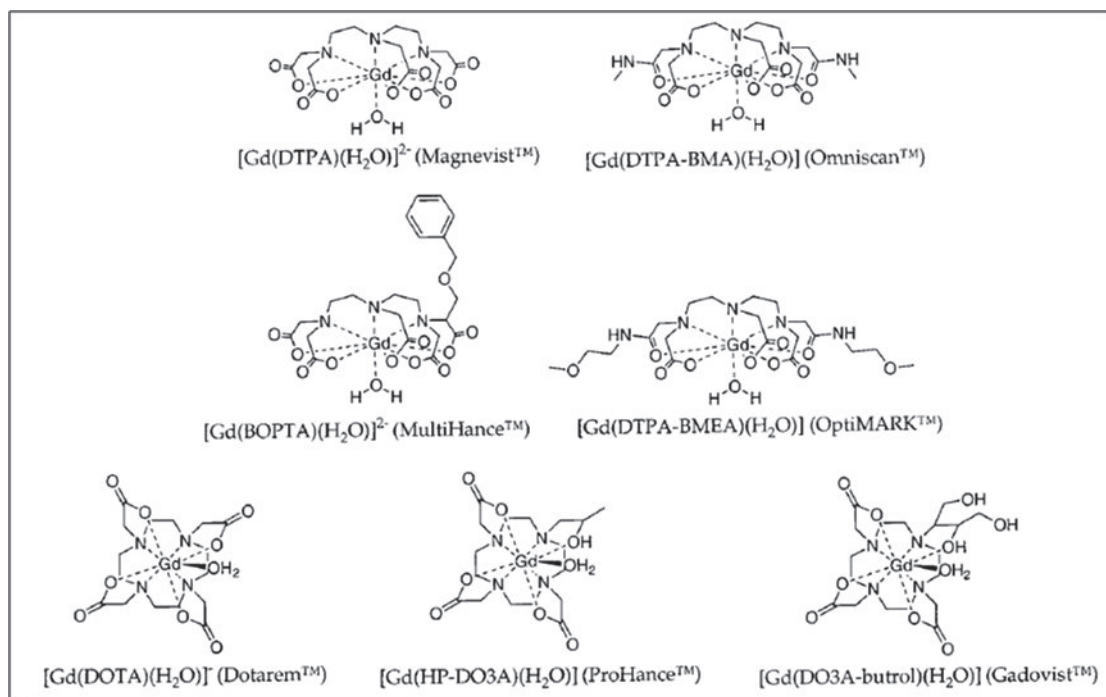
extracelulares, e então é gradualmente excretado pelos rins.

O gadolínio em sua forma iônica é muito tóxico, uma vez que seu raio iônico é muito parecido com o do cálcio, e pode bloquear canais de cálcio e inibir transmissões nervosas, contração muscular, coagulação sanguínea e funções mitocondriais, além de substituir o cálcio no osso [11]. Por isso os GBCAs são sempre o íon gadolínio e um ligante, normalmente uma molécula orgânica, e formam os quelatos de gadolínio. Estes quelatos podem ser lineares ou cíclicos, sendo que os quelatos cíclicos são muito mais estáveis por englobar o íon gadolínio, dificultando sua dissociação. É imprescindível que essa ligação seja estável e não haja dissociação e consequente liberação do íon gadolínio no corpo [12,13].

Os GBCAs já são usados desde a década de 80 e estima-se que mais de 200 milhões de doses já foram administradas no mundo todo, as reações adversas com o uso do gadolínio é muito rara, acontecendo somente em 1 a 2% das exposições, e na maioria das vezes correspondem a queixas inespecíficas como náusea e cefaleia [13,14].

A tabela 4 mostra os principais GBCAs para exames de MRI em uso atualmente e a figura 15 indica a estrutura química de cada agente de contraste citado na tabela 4 [15–17]. Dentre eles, o Gd-DOTA é muito utilizado para visualização de lesões intracranianas até hoje por causa de sua alta estabilidade [17].

Figura 15 – Estrutura dos principais agentes de contraste utilizados comercialmente.



FONTE: Gonçalves, 2017 [17].

Tabela 4 – Principais características dos agentes de contrastes empregados em MRI.

Nomes genéricos	Nomes Comerciais	Estrutura Molecular
Gd-DTPA gadopentetate dimeglumine (0,5 mol/l)	Magnevist Magnograf Viewgam	Linear, iônica
Gd-DOTA gadoterate meglumine (0,5 mol/l)	Dotarem Artirem	Cíclica, iônica
Gd-HP-DO3A gadoteridol (0,5 mol/l)	ProHance	Cíclica, não-iônica
Gd-DTPA-BMA gadodiamide (0,5 mol/l)	Omniscan	Linear, não-iônica
Gd-BOPTA Gadobenate dimeglumine (0,5 mol/l)	MultiHance	Linear, iônica
Gd-BT-DO3A gadobutrol (1,0 mol/l)	Gadovist	Cíclica, não-iônica
Gd-DTPA-BMEA gadoversetamide (0,5 mol/l)	OptiMARK	Linear, não-iônica

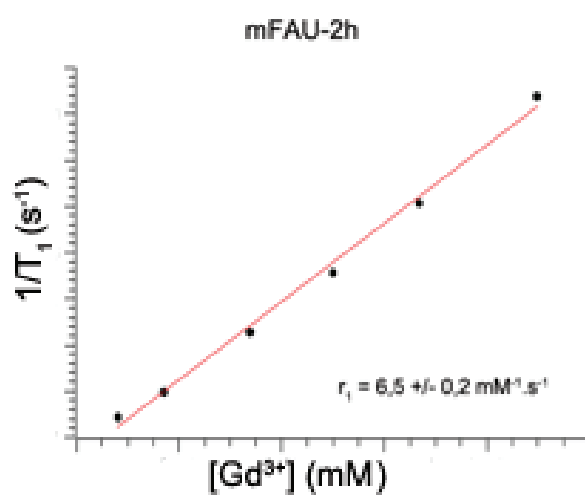
FONTE: Gonçalves, 2017 [17].

1.5.3.1. Relaxividade

A eficácia de um agente de contraste pode ser medida por meio da relaxividade (r_1 e r_2), ou seja, medindo o quanto a variação na concentração de contraste afeta o tempo de relaxação T_1 ou T_2 de uma amostra. Para o cálculo da relaxividade de um material é necessária a sua diluição em diversas concentrações, o tempo de relaxação de cada uma delas é medido e esses dados são colocados em um gráfico de $[\text{Gd}^{3+}] \times T_1$ ou T_2 (figura 16), a relaxividade r_1 ou r_2 será o coeficiente angular da reta obtida neste gráfico [18].

Agentes de contraste com baixa razão r_2/r_1 irão dar origem a regiões iluminadas em imagens ponderadas em T_1 e são chamados de agentes de contraste positivos. Agentes de contraste negativos fazem com que o T_2 dos prótons da água diminua mais drasticamente que o T_1 ($r_2 \gg r_1$) e com isso regiões escuras são formadas nas imagens ponderadas em T_2 , nanopartículas de óxido de ferro são os principais representantes dessa classe de agentes de contraste [18].

Figura 16 – Exemplo de gráfico de $[\text{Gd}^{3+}]$ vs $1/T_1$. O coeficiente angular da reta nos dá o valor da relaxividade desse material.



FONTE: Autoria própria, 2020.

CAPÍTULO 2

ZEÓLITAS

2.1. Introdução

O objetivo deste trabalho foi o estudo de materiais zeolíticos aplicados à medicina, mais especificamente o uso desses materiais como agentes de contraste para exames de Imagem por Ressonância Magnética. O uso de materiais zeolíticos como agentes de contraste apresenta diversas vantagens, como a alta estabilidade química e capacidade de formação de complexos com íons metálicos muito estáveis.

Este capítulo tem a intenção de apresentar ao leitor o que são zeólitas; suas características físico-químicas; a aplicação desses materiais em diversas áreas, desde a agricultura até a medicina; e mostrar os primeiros trabalhos relacionados ao uso de zeólitas como agentes de contraste.

2.2. Histórico

Em 1756 foi encontrado pelo mineralogista sueco Axel Cronsted o primeiro mineral zeolítico, a Stilbita, esse material deu origem a uma nova classe de minerais constituída por aluminosilicatos hidratados. Esses minerais receberam o nome de zeólitas (do grego, “pedra

que ferve”), pois, quando aquecido, o material ebulia liberando a água presente em seu interior [19,20].

Pelos próximos 200 anos as zeólitas foram consideradas materiais raros uma vez que somente cristais isolados com tamanhos da ordem de milímetros até alguns centímetros eram encontrados, e ainda não havia uma rota sintética confiável para a produção desses materiais. Ainda assim foram encontrados mais de 20 tipos diferentes de zeólitas naturais e alguns estudos importantes foram realizados nessa época, quando diversos autores descreveram algumas propriedades dos materiais zeolíticos, como a adsorção, troca iônica e desidratação [19,20]. Em 1925, Weigel e Steinhoff perceberam que a zeólita Chabazita atuava como uma peneira a nível molecular, permitindo a passagem de pequenas moléculas como água, metanol e etanol, e excluindo moléculas como acetona, éter e benzeno, em 1932 McBain definiu o termo “peneiras moleculares” para se referir a esses materiais [19,20].

Em 1948 Richard Barrer sintetizou duas variantes de peneiras moleculares utilizando altas temperaturas e pressão autogerada. No ano seguinte Robert Milton iniciou seu programa de síntese de zeólitas nos laboratórios da corporação Linde, e desenvolveu novos métodos de síntese com condições mais amenas e produziu 3 novas zeólitas sem correspondente natural. Em 1950, foi produzida a zeólita X, isoestrutural ao material zeolítico Faujasita; e a versão sintética da zeólita Chabazita. Em três anos, Milton e colaboradores sintetizaram 20 zeólitas distintas, dentre elas 14 eram completamente novas, sem minerais zeolíticos com estrutura cristalográfica correspondente [21].

Nas duas décadas seguintes teve-se início a investigação do processo de síntese das zeólitas. Além disso, foi descoberto que a inserção de cátions de amônia quaternária no gel de síntese produzia zeólitas com alto teor de sílica; e posteriormente, que moléculas orgânicas poderiam atuar como moldes para a obtenção de novas zeólitas com alto teor de sílica [21].

Nos anos 1980 uma nova família de peneiras moleculares foi descoberta, os aluminofosfatos, dando origem a uma nova área de pesquisa envolvendo a síntese de novas peneiras moleculares com estrutura mista (inserção de outros átomos além de Al e Si). Esta década também foi marcada pelo aumento no uso de técnicas de espectroscopia no estudo das estruturas das zeólitas, quando além da difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho, novas técnicas como espectroscopia Raman e Ressonância Magnética Nuclear

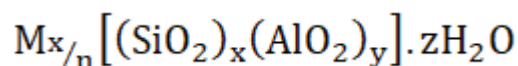
(^{29}Si RMN-MAS) passaram a ser utilizadas e permitiam maior detalhamento na estrutura do materiais [21].

Nos anos 1990 foram encontrados depósitos naturais de minerais zeolíticos com alto teor de sílica nos Estados Unidos e na Antártica. Novos métodos de síntese também foram desenvolvidos, como a síntese com fase de vapor, na qual alguns dos reagentes são introduzidos à síntese na forma de vapor. E com o avanço nos estudos do processo de síntese foi encontrada a relação molde-estrutura, ou seja, as moléculas orgânicas adicionadas à síntese das zeólitas influenciam na formação e obtenção de novas estruturas cristalográficas, por isso as moléculas orgânicas utilizadas na síntese de zeólitas passaram a ser chamadas de agentes direcionadores de estrutura, ou SDAs (do inglês *Structure Directing Agents*) [21].

As duas últimas décadas trouxeram novas técnicas experimentais, como o aquecimento por micro-ondas e métodos de alta pressão. Modelos computacionais têm sido utilizados para o estudo detalhado da síntese das zeólitas, permitindo, por exemplo, (i) determinar a localização e energia dos SDAs ao longo da síntese; e (ii) investigar detalhadamente pequenos fragmentos da estrutura cristalográfica. Com isso as sínteses hoje permitem uma precisão estrutural que torna possível sintetizar um material já sabendo sua função [21,22]. Hoje, segundo a Associação Internacional de Zeólitas (*International Zeolite Association* – IZA) são conhecidas mais de 250 estruturas cristalográficas de zeólitas [23].

2.3. Estrutura Química

Zeólitas são compostos inorgânicos formados por tetraedros de silício (SiO_4) e alumínio (AlO_4) e por isso são conhecidas como aluminosilicatos. Estes tetraedros se organizam formando uma complexa estrutura fechada e cristalina que apresenta poros e cavidades, assim como pode ser observado na figura 17. A substituição parcial de átomos de Si^{+4} por Al^{+3} em sua rede faz com que cargas negativas sejam distribuídas ao longo dela. Cátions alcalinos ou alcalinos terrosos são distribuídos por sua estrutura a fim de neutralizar as cargas negativas, e por isso são conhecidos como cátions de compensação [24–26]. As zeólitas podem ser representadas pela seguinte fórmula molecular:



Onde,

M é o cátion de compensação, que pode ser alcalino ou alcalino terroso.

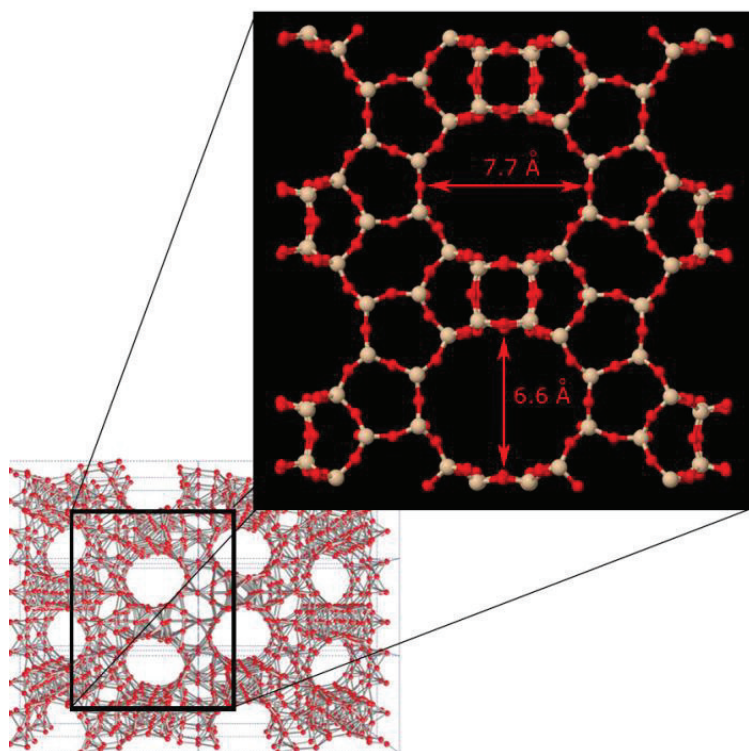
n: número de valência do cátion de compensação.

x: número de alumínio por fórmula unitária.

y: número de silício por fórmula unitária.

z: número de moléculas de água no sistema de cavidades.

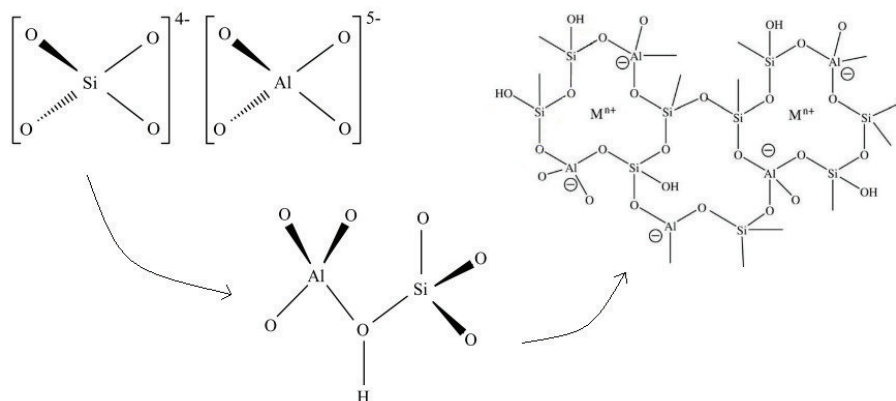
Figura 17 – Rede Cristalográfica da zeólita Beta e estrutura de poros.



FONTE: Compilação do autor [23].

As zeólitas possuem estruturas muito variadas e complexas, porém todas elas são baseadas em tetraedros de silício ou alumínio (NO_4 , $\text{N} = \text{Si}, \text{Al}$). Por serem a base dessas estruturas, os tetraedros são chamados de Unidades Primárias de Construção (*Primary Building Unit* - PBU). O átomo N está localizado no centro do tetraedro e os átomos de oxigênio se encontram em sua extremidade. Os átomos de oxigênio possuem dois elétrons excedentes, o que torna possível um átomo de oxigênio se ligar a dois átomos N, e consequentemente a associação de tetraedros entre si, formando, então, uma rede tridimensional [20,26–28].

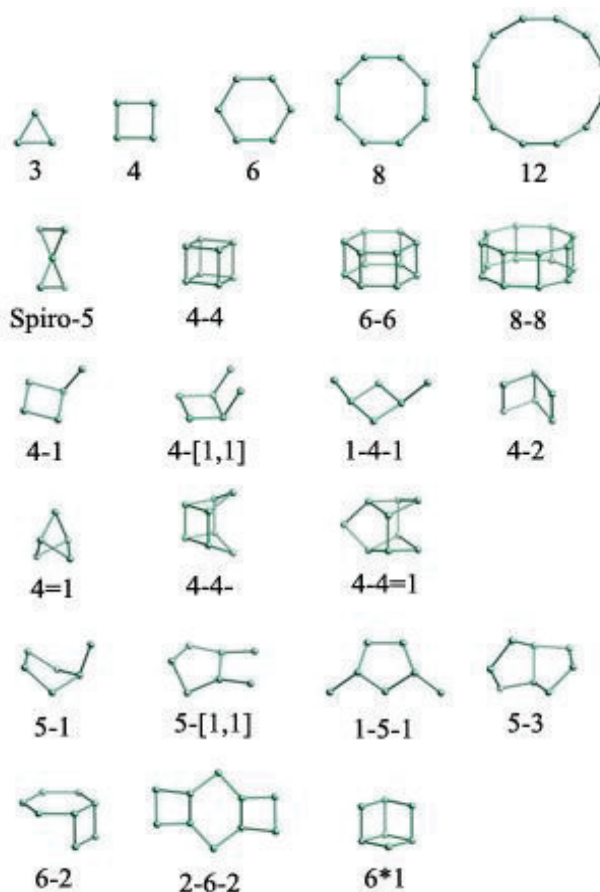
Figura 18 – Tetraedros de silício e alumínio e arranjo dos tetraedros formando a rede cristalográfica das zeólitas.



FONTE: Moshoeshoe, 2017 [28].

Os tetraedros se organizam de diversas maneiras dando origem a pequenas redes zeolíticas contendo de 4 a 16 átomos N, essas redes são chamadas de Unidades Secundárias de Construção (*Secondary Building Unity* - SBU) e foram propostas por Meir em 1968. Na figura 19, cada vértice corresponde a um átomo N e as arestas representam as ligações com o oxigênio, conectando as duas unidades PBUs [27,28].

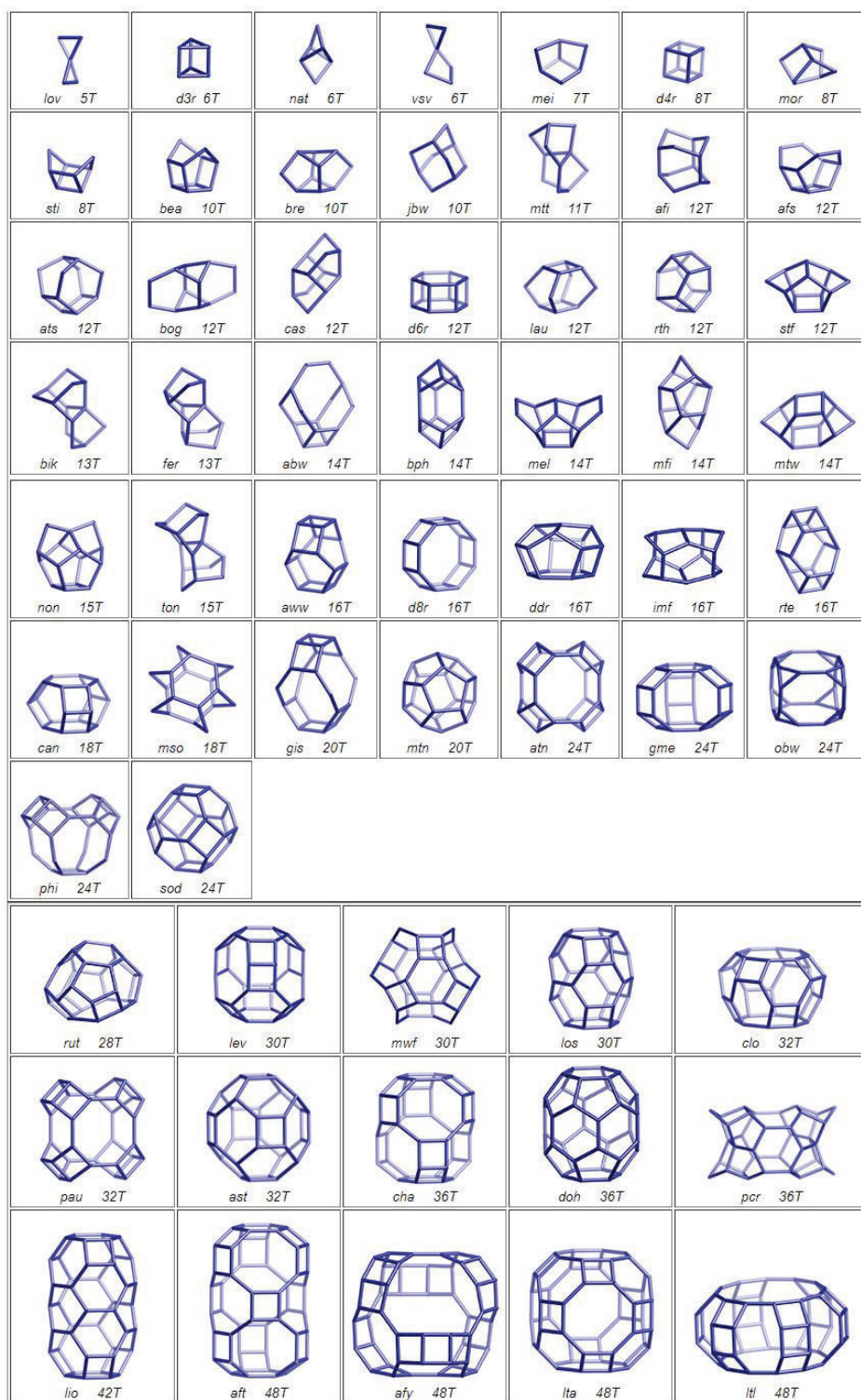
Figura 19 – Unidades Secundárias de Construção.



FONTE: International Zeolite Association, 2020 [23].

Outra forma de representar a estrutura das zeólitas é utilizando as Unidades Poliédricas de Construção, elas são compostas pelas SBUs e tornam mais fácil a visualização da rede. As Unidades Poliédricas de Construção também auxiliam na classificação das zeólitas e em sua nomeação [27].

Figura 20 – Unidades poliédricas de construção.



FONTE: International Zeolite Association, 2020 [23].

2.4. Síntese de materiais zeolíticos

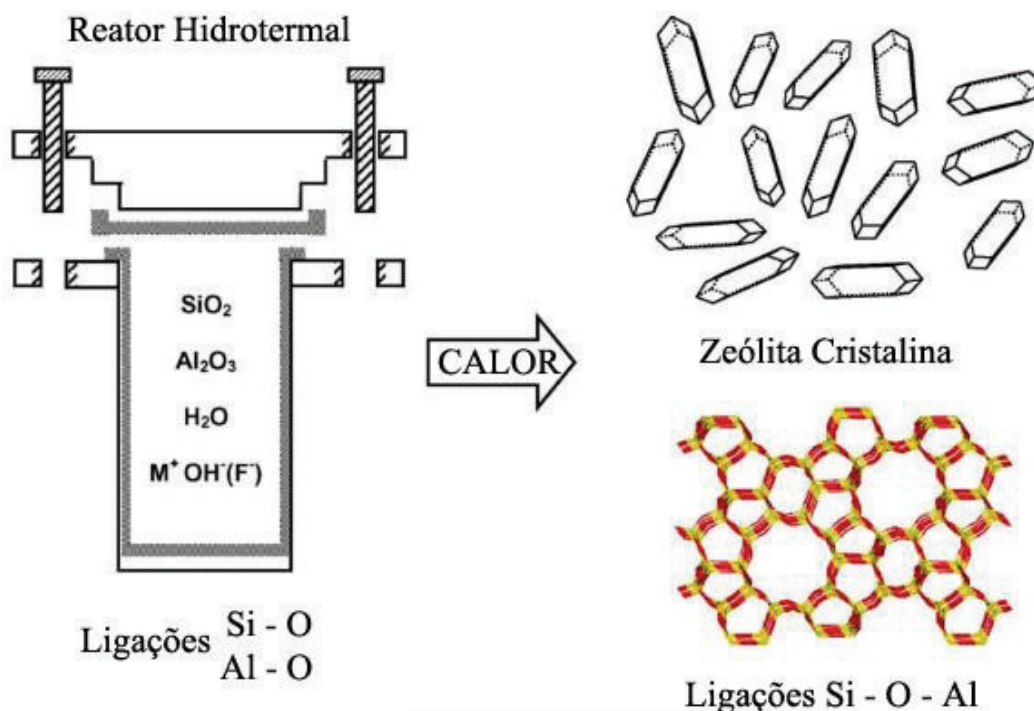
A primeira menção à zeólita sintética aconteceu em 1862, quando St Claire Deville alegou ter preparado em laboratório a zeólita Levinite, entretanto somente no século seguinte as sínteses como conhecemos hoje em dia foram desenvolvidas pelos trabalhos de Richard Barrer e Robert Milton [25].

Barrer começou seu trabalho investigando a conversão de fases de minerais conhecidos sob a ação de fortes soluções salinas em temperaturas relativamente altas (170 – 270 °C). Dentre os produtos obtidos estavam as espécies P e Q, que apresentavam características únicas diferentes de qualquer mineral zeolítico conhecido até então. Entre 1949 e 1954 foram descobertas diversas zeólitas comercialmente significantes por Milton e colaboradores, como as zeólitas do tipo A, X e Y. Estes materiais eram utilizados em processos de separação e purificação em indústrias, como secar gases refrigerantes e gases naturais [19,25].

Sínteses utilizando a via hidrotérmica (sol-gel) são as mais utilizadas até hoje e são vantajosas quando comparadas a outros métodos de síntese de zeólitas, como a síntese com fase de vapor, por utilizar temperaturas de processamento muito inferiores. Outra vantagem desse método é que os materiais resultantes apresentam maior pureza e homogeneidade. A síntese hidrotermal acontece em solução aquosa e é sujeita à pressão autogerada pelos vapores da própria mistura quando aquecidos a temperaturas de aproximadamente 300 °C em meio básico [21,25].

A síntese hidrotermal acontece em algumas etapas. Primeiramente reagentes contendo uma fonte de silício (SiO_2), uma fonte de alumínio (Al_2O_3), um solvente (H_2O) e um agente mineralizante (normalmente um hidróxido de metal alcalino, como NaOH e KOH) são misturados, formando uma dispersão de partículas coloidais, também conhecida pelo nome sol. Esta dispersão é aquecida em um sistema fechado, após um primeiro momento quando o sol é aquecido ele passa a sofrer reações de polimerização inorgânica, transformando então o material amorfo em uma rede de óxidos (gel) que dará origem a cristais de zeólitas. Os cristais podem então ser recuperados da mistura final por meio da filtração ou centrifugação, sendo então submetidos ao processo de lavagem e secagem para a obtenção da zeólita pura [5,27,29].

Figura 21 – Típica síntese hidrotérmica de uma zeólita.



FONTE: Burkett, 1995 [30].

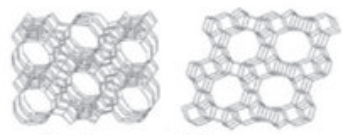
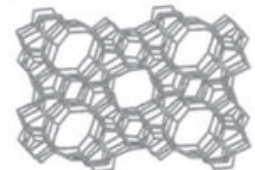
A síntese das zeólitas é bastante sensível ao tipo de reagente e à ordem de sua adição, também depende da velocidade de agitação do sistema, do tempo de envelhecimento do gel, da temperatura e do tempo de aquecimento. Pequenas mudanças nesses fatores podem alterar drasticamente no resultado da síntese.

2.4.1. Agentes Direcionadores de Estrutura (SDA)

Em 1961 dois grupos revelaram que a introdução de cátions de amônia quaternária na síntese de zeólitas produzia versões de zeólitas já conhecidas com alto teor de sílica. No início este trabalho não resultou em nenhuma nova estrutura, porém em 1967 Wadlinger, Kerr e Rosinski reportaram a descoberta de uma nova zeólita com alto teor de sílica utilizando cátions de tetraetilamonio (TEA), a zeólita Beta, e em 1972 a síntese da até então inédita ZSM-5 utilizando cátions de tetrapropilamonio (TPA) no gel de síntese da nova zeólita [25].

Devido ao seu potencial em produzir novas estruturas cristalográficas, as moléculas orgânicas utilizadas na síntese de zeólitas são chamadas de Agentes Direcionadores de Estrutura (*Structure Directing Agents* – SDAs) e com o passar dos anos e o aumento no interesse desses materiais o número e a complexidade de SDAs utilizados em síntese de zeólitas aumentou consideravelmente [31].

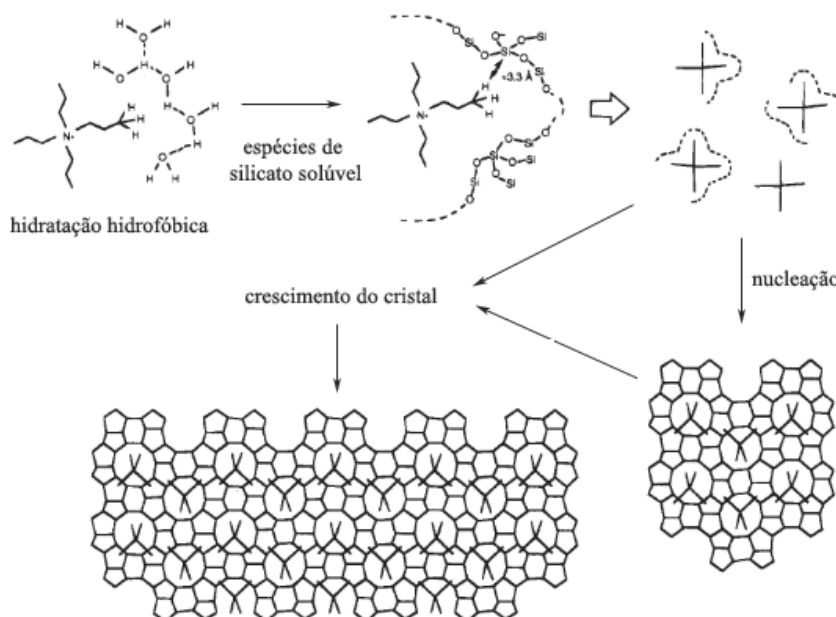
Figura 22 – Cátions de sais quaternário utilizados como SDA neste trabalho. E zeólitas que podem ser obtidas com seu uso.

SDA	Zeólita	Estrutura Cristalográfica Zeólita
 TMA	ZK4, N-A e alfa (LTA - 1961) ZSM-4 e zeólita ômega (MAZ - 1968) TMA-sodalita (SOD - 1961)	
 TEA	Beta - 1967 ZSM-12 (MTW) 1964	
 TPA	ZSM-5 (MFI) 1968	

FONTE: Adaptado pelo autor de Burton, 2007 [31].

A adição desses cátions orgânicos, mais volumosos que os cátions metálicos, faz com que a zeólita necessite de menos átomos de alumínio na sua estrutura a fim de neutralizar a carga dos cátions do gel, aumentando a relação Si/Al das novas zeólitas. Além disso, há a formação de compostos inorgânico-orgânicos que irão se agregar e possibilitar o início da nucleação e posterior crescimento dos cristais zeolíticos, como mostra a figura 23 [30,31]. Ao fim da síntese o SDA está preso no interior dos poros das zeólitas e deve ser retirado pelo processo de calcinação.

Figura 23 – Mecanismo proposto do TPA atuando como SDA na síntese da ZSM-5.



FONTE: Burkett, 1995 [30].

2.5. Aplicações Gerais das Zeólitas

2.5.1. Aplicações Ambientais

Zeólitas foram utilizadas comercialmente pela primeira vez em 1905 na Alemanha em um processo conhecido como “amaciamento” da água, ou seja, a retirada dos sais de cálcio e magnésio dissolvidos nela. Esses sais em grande concentração atrapalham a ação de limpeza dos detergentes. Zeólitas do tipo Na-LTA e Na-Gismondina foram adicionadas aos detergentes e por meio do processo de troca iônica os íons cálcio e magnésio são removidos da água, com isso a ação de limpeza dos detergentes passou a ser muito mais efetiva sem causar a eutrofização da água como acontecia com os detergentes que utilizavam o fosfato para “amaciar” a água [20,27].

Por volta de 1970 Ames e Mercer *et. al.* desenvolveram os primeiros processos de troca iônica em larga escala utilizando Clinoptinolita para remoção de NH_4^+ do esgoto da cidade [32,33]. Estudos mostravam maior seletividade de zeólitas naturais com núcleos radioativos, como ^{90}Sr , ^{137}Cs . Quando comparados a organoresinas, as zeólitas eram mais baratas e apresentavam maior resistência a degradação nuclear. Essa seletividade permite tratamento do solo em locais de testes nucleares utilizando zeólitas naturais. Em 1986, após o desastre de Chernobyl, foram desenvolvidos muitos estudos envolvendo materiais zeolíticos. Shenbar e Johanson, por exemplo, mostraram que o ^{137}Cs não era absorvido pelas plantas se o solo contaminado fosse tratado com zeólitas [33].

O uso de zeólitas como Clinoptinolita e Mordenita como complemento na alimentação de porcos e aves domésticas foi estudado no Japão e fez com que eles crescessem mais rapidamente, o que consequentemente diminuiu o gasto com a alimentação desses animais. Também houve uma diminuição no odor dos excrementos, já que a amônia é adsorvida pelas zeólitas, e diminuição na quantidade e na gravidade de doenças gastrointestinais desses animais [33–35].

2.5.2. Aplicações na Indústria Química e Petroquímica

A primeira aplicação em larga escala de zeólitas utilizando seu conceito de peneira molecular aconteceu em 1959 visando o aumento da concentração de octanos na gasolina com a retirada, por meio da absorção, de alcanos com cadeias de cinco ou seis carbonos [20].

A zeólita Y foi testada como catalisador ácido em uma variedade de reações utilizadas em refinarias de petróleo, alguns exemplos são reações de craqueamento e isomerização. Este estudo deu início a um processo de transformação global das refinarias de petróleo. Os catalisadores zeolíticos apresentavam superior seletividade e maior atividade catalítica em relação aos catalisadores utilizados até o momento, aumentando a produção e a qualidade dos derivados de petróleo, além de diminuir o capital necessário para o funcionamento dessas refinarias, seus custos, o uso de energia e os impactos ambientais [20].

Na área industrial as zeólitas sintéticas são as mais requisitadas, uma vez que é possível fazer alterações durante suas sínteses tornando-as mais específicas para determinados processos, principalmente os catalíticos. As zeólitas também são muito utilizadas em processos de separação de soluções que contêm vários compostos com um mesmo ponto de ebulição [27].

2.5.3. Aplicações Biomédicas

Devido às suas propriedades físico-químicas, zeólitas naturais ou sintéticas podem ser utilizadas na área biomédica. Os canais e poros de suas estruturas permitem a adsorção de diferentes íons e moléculas e posterior liberação seletiva.

Um dos exemplos da aplicação de zeólitas nessa área é o uso da zeólita natural Clinoptinolita em tratamentos gastrointestinais. Estudos clínicos revelam que essa zeólita, quando administrada oralmente apresenta grande estabilidade e não é tóxica para seres humanos. A seletividade de algumas zeólitas por núcleos pesados originários de rejeitos nucleares fez com que elas fossem utilizadas em seres humanos que ingeriram alimentos contaminados pela radiação nuclear, as zeólitas quando ingeridas facilitavam a excreção de ^{137}Cs e ^{90}Sr do trato gastrointestinal [33].

Sua capacidade de troca iônica auxilia na remoção de íons NH_4^+ na diálise de doentes renais, permitindo a retirada da solução salina e o uso repetitivo de sistemas portáteis de diálise [33]. As zeólitas são muito mais baratas que os fosfatos de zinco utilizados anteriormente como trocadores iônicos. Novamente utilizando a propriedade de troca iônica das zeólitas, elas podem ser utilizadas como tampão para reduzir a acidez estomacal em tratamento de úlceras [33].

Além dos exemplos anteriores as zeólitas também podem ser utilizadas como: agentes antibacterianos, como tratamento tópico de acne; medicamentos anti-diarréicos, como o

Enterex; adjuvantes antitumores; biossensores; auxiliar na formação de ossos; *drug delivery*; tratamento de diabetes *mellitus* diminuindo a concentração de glicose no sangue; substitutas de enzimas, por imitarem sua função; e agentes hemostáticos, auxiliando no processo da cascata de coagulação [36–38].

2.6. Zeólitas como Agentes de Contraste

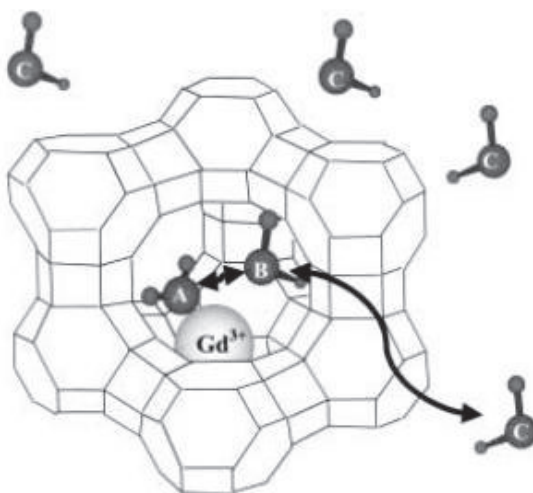
As zeólitas foram sugeridas pela primeira vez como agentes de contraste (AC) em 1992, quando Balkus [39] propôs o uso de diversos íons de transição no interior de zeólitas como AC para o trato gastrointestinal. Alguns exemplos de zeólitas que poderiam incorporar íons Gd^{3+} ou Mn^{2+} são NaX, NaY, CaA, ZSM-5 e Mordenita. Comparado aos agentes de contraste paramagnéticos baseados em óxidos de ferro, as zeólitas carregadas com Gd^{3+} eram preferidas uma vez que imagens ponderadas em T_1 apareciam mais claras nos locais de acumulação do contraste, fazendo com que fosse mais fácil distinguir tecidos saudáveis de patologias. A administração de ACs baseados em óxidos de ferro, por outro lado, resultava em regiões mais escuras, dificultando a visualização de patologias. A zeólita Faujasita do tipo NaY foi usada para produzir o Gadolite, um agente de contraste positivo de administração oral para MRI do trato gastrointestinal [40]. O Gadolite foi testado clinicamente e se mostrou seguro para os pacientes, então por volta de 1996, ele foi aprovado para uso clínico nos Estados Unidos e Europa [41,42].

Ao longo dos anos 90, a síntese de zeólitas na escala nanométrica (diâmetros menores que 200 nm) foi desenvolvida, resultando em novas características físico-químicas para esses materiais. A maior área externa aumenta a difusão de moléculas de água através da estrutura [43], aumentando consequentemente a relaxividade do núcleo ^1H , o que é desejável para os agentes de contraste. O primeiro estudo envolvendo ACs baseados em nanozeólitas foi publicado no início da década de 2000 por Peters e colaboradores [44], quando íons Gd^{3+} inseridos nas nanozeólitas NaY foram usados em suspensão aquosa. Esse material apresentou valores de relaxividade muito maiores quando comparado ao Gadolite, e devido ao diâmetro reduzido ele foi proposto também como AC para o sistema intravascular [44,45].

Esses estudos mostram que o íon Gd^{3+} está localizado principalmente na gaiola sodalita da zeólita NaY, mas também pode ser encontrado no prisma hexagonal e na superfície da zeólita. Eles também propõem um modelo em dois passos, o qual considera que há uma solução de Gd^{3+} concentrada no interior das zeólitas, que é trocada com a água exterior à zeólita por meio

da difusão. Esse modelo levou à conclusão que uma difusão mais rápida da água melhoraria o aumento da taxa de relaxação. O grupo de Peters também mostrou que as zeólitas contendo Gd^{3+} ao serem submetidas a temperaturas maiores que 200 °C teriam os íons Gd^{3+} movidos irreversivelmente da supercage para a gaiola sodalita ou para as entradas hexagonais, reduzindo a interação dos íons paramagnéticos com a água do meio, o que reduziria os valores de relaxividade [45,46].

Figura 24 – Esquema representativo do modelo de dois passos proposto por Peters para a relaxividade em suspensões aquosas de zeólitas NaY trocadas ionicamente com Gd^{3+} . A representa moléculas de água coordenadas ao íon; B, moléculas de água presentes no interior da rede cristalográfica, mas não coordenada ao íon; e C, moléculas de água do meio.



FONTE: Platas-Iglesias, 2002 [44].

Estudos *in vitro* com a nanozeólita Sodalita (SOD) [47] mostraram que os íons Gd^{3+} são encontrados no interior das gaiolas β e os valores da relaxividade longitudinal (r_1) eram maiores quando os íons Gd^{3+} preenchiam as gaiolas mais próximas da superfície da zeólita. Estudos *in vivo* [47] utilizando camundongos Kunming mostraram maior contraste no fígado desses animais e que esse contraste apresentava baixa toxicidade e alta estabilidade.

Um estudo *in vitro* envolvendo a nanozeólita LTL carregada com íons Gd^{3+} [48] mostrou que os valores de relaxividade (r_1 e r_2) dependem do pH, fazendo deste um ótimo agente de contraste para a visualização de tumores. Outro estudo *in vitro* feito com as zeólitas LTL [49] inseriu íons Gd^{3+} nas grandes cavidades e íons Eu^{3+} nas pequenas gaiolas. Deste modo, o íon Gd^{3+} proporcionava propriedades magnéticas para o material; e o íon Eu^{3+} , propriedades fotofísicas, fazendo deste um candidato como sonda bimodal ótica/MRI.

A zeólita do tipo AV-9, consiste em micropartículas com propriedade paramagnética, uma vez que íons Ln^{3+} estão incorporados em sua estrutura cristalográfica. Estudos *in vitro* com esse material [50,51] mostraram que ele apresenta problemas relacionados à sua estabilidade em solução por causa de seu tamanho, e que os íons Ln^{3+} tiveram pouco efeito sobre a relaxividade longitudinal, porém resultou em altos valores de relaxividade transversal.

Com esses estudos, é possível afirmar que as zeólitas utilizadas como agentes de contraste para Imagens por Ressonância Magnética apresentam muitas vantagens, dentre elas: sua alta estabilidade química e capacidade de formação de complexos muito estáveis com íons metálicos, como é o caso do Gd^{3+} , além de sua estrutura ser composta por átomos de Si, Al, e O, o que a torna naturalmente biocompatível. Sabe-se também que a velocidade de difusão da água pela zeólita é um fator que influencia diretamente na relaxividade do material. Com isso, espera-se que a estrutura de poros e canais das zeólitas influencie na velocidade de difusão da água e consequentemente na relaxividade desse material. Com os dados obtidos até o momento é difícil concluir se a afirmação anterior está correta, primeiramente porque cada estudo utilizou um campo magnético diferente para os cálculos da relaxividade das zeólitas estudadas ficando difícil comparar esses dados entre si; além disso, existem mais de 250 zeólitas com estruturas cristalográficas diferentes [23] e somente 5 dessas estruturas foram estudadas.

O presente trabalho tem a intenção de testar se devido ao modo como as moléculas de água se difundem no interior desses materiais as diferentes estruturas de poros e cavidades de cada zeólita realmente interferem em sua relaxividade. Além disso, de modo a contribuir com a lista de zeólitas testadas como agente de contraste, algumas zeólitas que ainda não foram testadas nessa área foram escolhidas para ter seus resultados comparados à zeólita Faujasita, já estudada pelo grupo de Peters [40,44–46]. As zeólitas exploradas nesse trabalho serão a zeólita Faujasita do tipo NaX (FAU), a zeólita A (LTA), a zeólita Beta (BEA), a zeólita ZSM-5 (MFI) e a zeólita Mordenita (MOR); elas foram escolhidas por apresentar cavidades com diâmetro da ordem de 7 Å, tamanho suficiente para que o íon gadolínio (6,36 Å) possa ser incorporado em seu interior.

Com os dados relacionados a diâmetro de canais, diâmetro de cavidade entre outros apresentados na tabela 5, é possível antecipar que em alguns materiais zeolíticos o Gd^{3+} hidratado (6,36 Å) pode ter dificuldade em atravessar os canais de forma a se alojar em suas cavidades. Por esse motivo além da tradicional troca iônica em solução a troca iônica no

estado sólido também será realizada. Neste último método, a troca iônica acontece a altas temperaturas ($\sim 580\text{ }^{\circ}\text{C}$) e sem a presença de água; o íon Gd^{3+} é desidratado ($1,88\text{ }\text{\AA}$), o que deve facilitar sua incorporação às cavidades das zeólitas.

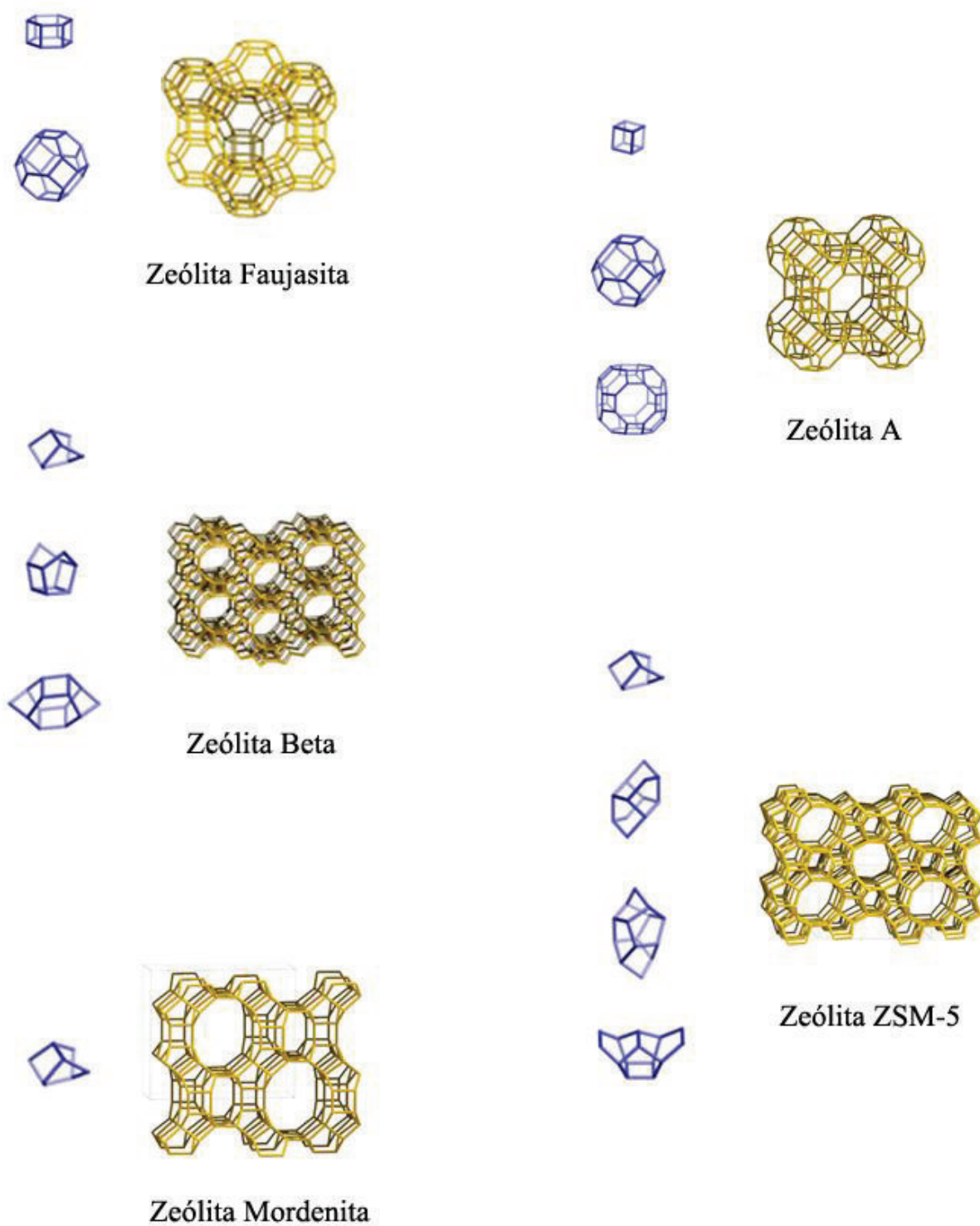
Outro fator a ser considerado é o tamanho das zeólitas, uma vez que na escala nanométrica apresentam potencial de aplicação em regiões que a zeólitas na escala micrométrica não podem atingir devido ao seu tamanho, como agentes de contraste para exames do sistema intravascular, por exemplo [15]. Por isso neste estudo os materiais terão sua relaxividade medida tanto em sua forma micrométrica quanto na nanométrica.

Tabela 5 – Características estruturais das zeólitas a serem utilizadas neste trabalho.

Estrutura	Diâmetro de Cavidade ($\text{\AA}$)	Diâmetro de Canais ($\text{\AA}$)	Tamanho de poro ($\text{\AA}$)	Sistema de canais	Anéis (átomos N)
FAU	11,24	7,35	$\langle 111 \rangle$ (7,4 x 7,4)	3 D	12
LTA	11,05	4,21	$\langle 100 \rangle$ (4,1 x 4,1)	3 D	8
BEA	6,68	5,95	$\langle 100 \rangle$ (6,6 x 6,7) $\langle 001 \rangle$ (5,6 x 5,6)	3 D	12 12
MFI	6,36	4,70 x 4,4 x 4,4	$\langle 100 \rangle$ (5,1 x 5,5) $\langle 010 \rangle$ (5,3 x 5,6)	3 D	10 10
MOR	6,70	1,6 x 2,95 x 6,45	$\langle 001 \rangle$ (6,5 x 7,0) $\langle 001 \rangle$ (2,6 x 5,7)	1 D	12 8

FONTE: International Zeolite Association, 2020 [23].

Figura 25 – Esquema tridimensional da estrutura das zeólitas utilizadas neste trabalho (amarelo) e unidades poliédricas de construção que as compõem (azul).



FONTE: Montagem feita pelo autor [23].

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1. Justificativa

Em 1986 foi instalado no Hospital Israelita Albert Einstein o primeiro equipamento de Ressonância Magnética (0,5 T – Philips) do Brasil. Logo esta técnica se tornou a primeira escolha de diagnóstico de patologias no cérebro, músculo esquelético, espinha e juntas. Segundo o Ministério da Saúde em 2007 existiam 557 equipamentos de Ressonância Magnética espalhados pelo Brasil, sendo que a Região Sudeste detém o maior número de equipamentos seguida da região Sul, justas elas são responsáveis por 76% de todos os equipamentos no Brasil [52].

O custo de cada exame de MRI varia bastante dependendo da área a ser examinada e se o uso de contraste será necessário, na rede privada os valores estão entre 800 e 1500 reais [53]. Para a rede pública de saúde a média de custo dos exames era de R\$ 268,75 em Setembro de 2019 [54]. Em Outubro de 2014 o custo do contraste era de aproximadamente R\$ 200,00, quase o mesmo valor do exame de MRI para o SUS [55,56]. Sendo este um dos fatores limitantes do número de exames de MRI oferecidos pela rede pública, além disso, há ainda falta de equipamentos e consequentemente tempo hábil para atender toda a sua demanda. No Mato Grosso, por exemplo, somente 20 exames são realizados por mês, e cerca de 2000 pessoas estão na fila [57]. Em Novo Hamburgo a estimativa é de dois anos de espera para a realização do exame [58].

A técnica de MRI é considerada dispendiosa em comparação com outras técnicas de imagem atualmente disponíveis, uma vez que o equipamento tem um valor elevado e sua manutenção é muito cara. Uma maneira de diminuir os custos dos exames de MRI, visando uma melhora na situação atual, seria diminuir o valor dos agentes de contraste utilizados nos exames. Por isso este trabalho visa estudar as propriedades de diferentes estruturas zeolíticas incorporando íons de gadolínio para uso como agente de contraste para Exames de Imagem por Ressonância Magnética; e por via direta ou indireta contribuir para a rede pública de saúde abaixando o custo da utilização de agentes de contraste.

3.2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal sintetizar zeólitas na escala micrométrica e nanométrica com grandes canais e cavidades como a Faujasita (FAU), Zeólita A (LTA), Zeólita Beta (BEA), ZSM-5 (MFI) e Mordenita (MOR) e incorporar íons lantanídeos em seus poros, mais especificamente o íon gadolínio (Gd^{3+}). Caracterizar os novos materiais e realizar estudos relaxométricos (tempos de relaxação T_1 e T_2) dos novos materiais *in vitro*. E por fim, a aplicação clínica desses materiais.

3.2.1. Objetivos Específicos do projeto

- a) Sínteses das zeólitas Faujasita (FAU), zeólita A (LTA), zeólita Beta (BEA), ZSM-5 (MFI) e Mordenita (MOR) em escala micrométrica;
- b) Sínteses de nanozeólitas Faujasita (FAU), zeólita A (LTA), zeólita Beta (BEA), ZSM-5 (MFI) e Mordenita (MOR) em escala nanométrica;
- c) Caracterização físico-química dos materiais zeolíticos micrométricos e nanométricos por difração de raios-x (DRX);
- d) Incorporar o íon gadolínio (Gd^{3+}) no interior dos materiais zeolíticos por meio da troca iônica em solução e troca iônica no estado sólido;
- e) Estudos de ressonância magnética preliminares para a medida da taxa de relaxação (r_1) dos materiais utilizando o espectrometro de RMN de 500 MHz (11,7 T), Agilent DD2 do Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio – CNPEM)

- f) Estudos de ressonância magnética para a medida da taxa de relaxação (r_1) dos materiais utilizando o espectrômetro 7 T da Bruker (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Alemanha) da *University of Texas – Health Science Center (UTHealth)* e comparar os valores obtidos com o r_1 do agente de contraste comercial Gd-DOTA;
- g) MR-Angiografia do cérebro de ratos *Sprague-Dawley* pré e pós administração da zeólita mFAU-2 como agente de contraste utilizando o espectrômetro 7 T da Bruker (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Alemanha) da *UTHealth*.
- h) MR-Angiografia do cérebro de ratos *Sprague-Dawley* pré e pós-administração do agente de contraste comercial Gd-DOTA utilizando o espectrômetro 7 T da Bruker (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Alemanha) da *UTHealth*.
- i) Medidas do tempo de relaxação T_1 de amostras de urina e sangue colhidas pré e pós-administração dos agentes de contraste mFAU-2 e Gd-DOTA nos ratos *Sprague-Dawley* para estudar a eliminação do contraste do corpo dos animais.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese das Zeólitas em Escala Micrométrica

4.1.1. Faujasita

A zeólita Faujasita na escala micrométrica (mFAU) foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Zhan *et al.* [59]. A síntese foi realizada solubilizando hidróxido de sódio (NaOH, 5,34 g, 0,13 mol) em água destilada (H₂O, 50 g, 2,8 mol), em seguida o aluminato de sódio (NaAlO₂, 2,42 g, 0,03 mol) foi adicionado com a solução sob agitação. Após a obtenção de uma solução límpida foi adicionada a sílica fumed (SiO₂, 3,43 g, 0,06 mol). O gel resultante foi colocado em um reator hidrotermal e levado à estufa a 90 °C por 4 dias. Durante esse período ocorreu a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas.

4.1.2. Zeólita A

A zeólita A na escala micrométrica (mLTA) foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Zhan *et al.* [59]. A síntese foi realizada solubilizando hidróxido de

sódio (NaOH, 2,73 g, 0,07 mol) em água destilada (H₂O, 25 g, 1,39 mol), e em seguida adicionando o aluminato de sódio (NaAlO₂, 1,21 g, 0,01 mol) sob agitação. Após a obtenção de uma solução límpida a solução de sílica coloidal (Ludox 30 wt. % SiO₂ suspenso em água, 1,72 g, 0,03 mol) foi adicionada e a mistura agitada até a completa solubilização. A solução permaneceu, então, em agitação magnética por 12 horas em temperatura ambiente. Após esse processo houve a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas.

4.1.3. Zeólita Beta

A zeólita Beta na escala micrométrica (mBEA) foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Cambor *et al.* [60]. Para a síntese foram preparadas 2 soluções. Para a solução 1 adicionou-se hidróxido de tetraetilamonio (TEAOH (20%), 44,8 g, 0,3 mol), cloreto de sódio (NaCl, 0,132 g, 0,003 mol) e cloreto de potássio (KCl, 0,36 g, 0,005 mol) em um béquer e a mistura foi mantida sob agitação, após total solubilização a sílica fumed (SiO₂, 7,38 g, 0,12 mol) foi adicionada e a mistura mantida sob agitação até completa solubilização. A solução 2 continha água destilada (H₂O, 5 g, 0,27 mol), hidróxido de sódio (NaOH, 0,0825 g, 0,002 mol) e aluminato de sódio (NaAlO₂, 0,4475 g, 0,005 mol). A solução 1 foi adicionada à solução 2 e a mistura, agitada até a formação de um gel espesso (aproximadamente 10 minutos). Por fim o gel foi colocado em um reator hidrotermal e mantido a 135 °C por 20 horas. Após esse processo houve a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas. Por fim o material foi submetido ao processo de calcinação para a retirada da molécula orgânica direcionadora de estrutura, para isso o material foi mantido por 8 horas a 600 °C.

4.1.4. Zeólita ZSM-5

A zeólita ZSM-5 na escala micrométrica (mMFI) foi sintetizada de acordo com o processo previamente descrito por Dwyer *et al.* [61]. Para a síntese foram adicionados hidróxido de sódio (NaOH, 0,62 g, 0,016 mol) e brometo de tetrapropilamonio ((CH₃CH₂CH₂)₄N(Br), 9,67 g, 0,036 mol) em água destilada (H₂O, 62 g, 3,89 mol) e agitados até completa solubilização. Depois a solução de sílica coloidal (Ludox 30 wt. % SiO₂ suspenso em água, 11,84 g, 0,2 mol) foi adicionada à solução e a mistura foi mantida sob agitação até a formação de um gel.

O gel foi transferido ao reator hidrotermal e então levado à estufa a 150 °C por 24 horas. Após esse processo houve a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas. Por fim o material foi submetido ao processo de calcinação para a retirada da molécula orgânica direcionadora de estrutura, para isso o material foi mantido por 8 horas a 600 °C.

4.1.5. Mordenita

A zeólita Mordenita na escala micrométrica (mMOR) foi sintetizada de acordo com o processo previamente descrito por Zhang *et. al.* [62]. Para a síntese hidróxido de sódio (NaOH, 0,30 g, 0,01 mol) foi solubilizado em água (H₂O, 11,16 g, 0,6 mol) durante agitação, seguida pela adição do aluminato de sódio (NaAlO₂, 0,15g, 0,2 mol). A mistura foi mantida sob agitação até completa solubilização. Depois disso a solução de sílica coloidal (Ludox 30 wt. % SiO₂ suspenso em água, 1,44 g, 0,02 mol) foi adicionada e a mistura mantida sob agitação por uma hora em temperatura ambiente. O gel foi transferido ao reator hidrotermal e mantida a 190 °C por 3 dias. Após esse processo houve a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas.

4.2. Síntese das Zeólitas em Escala Nanométrica

4.2.1. Faujasita

A zeólita Faujasita na escala nanométrica (nFAU) foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Zhan *et al.* [59]. A síntese foi realizada solubilizando hidróxido de sódio (NaOH, 5,34 g, 0,13 mol) em água destilada (H₂O, 50 g, 2,8 mol), em seguida o aluminato de sódio (NaAlO₂, 2,42 g, 0,03 mol) foi adicionado com a solução sob agitação. Após a obtenção de uma solução límpida foi adicionada a sílica fumed (SiO₂, 3,43 g, 0,06 mol). O gel resultante foi mantido sob agitação magnética por 48 h a 60 °C. Durante esse período ocorreu a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas.

4.2.2. Zeólita A

A zeólita A na escala nanométrica (nLTA) foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Biemmi et al [63]. A síntese foi realizada solubilizando o hidróxido de sódio (NaOH, 0,1 g, 0,0025 mol) em água (H₂O, 27,2 g, 1,5 mol) e em seguida adicionando isopropóxido de alumínio (Al(OCH(CH₃)₂)₃, 2,29 g, 0,01 mol) e hidróxido de tetrametilamônio pentahidratado (TMAOH . 5H₂O, 15,04 g, 0,10 mol), esta mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas e em seguida a solução de sílica coloidal (Ludox 30 wt. % SiO₂ suspenso em água, 7,04 g, 0,10 mol) foi adicionada gota a gota. O gel foi mantido sob agitação magnética por 72h a temperatura ambiente. Posteriormente o gel foi transferido ao reator hidrotermal e mantido a 60°C por 24 h. Durante esse período ocorreu a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas. Por fim o material foi submetido ao processo de calcinação para a retirada da molécula orgânica direcionadora de estrutura, para isso o material foi mantido por 8 horas a 500 °C.

4.2.3. Zeólita Beta

A zeólita Beta na escala nanométrica (nBEA) foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Larlus et al [64]. Em um béquer foi adicionado o hidróxido de tetraetilamônio (TEAOH (20%), 67,86 g, 0,15 mol) e o propóxido de alumínio (Al(OCH(CH₃)₂)₃, 0,94 g, 0,004 mol), a solução foi mantida sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se a sílica fumed (SiO₂, 11,18 g, 0,19 mol) e a mistura foi agitada por 12 horas em temperatura ambiente. Logo após o gel foi transferido ao reator hidrotermal e mantido a 140 °C por 5 dias. Durante esse período ocorreu a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas. Por fim o material foi submetido ao processo de calcinação para a retirada da molécula orgânica direcionadora de estrutura, para isso o material foi mantido por 8 horas a 600 °C.

4.2.4. Zeólita ZSM-5

A zeólita ZSM-5 na escala nanométrica (nMFI) foi sintetizada de acordo com o processo previamente descrito por Biemmi et. al. [63]. Para a síntese foram adicionados água (H_2O , 11,7 g, 6,5 mol), isopropóxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_3$, 0,34 g, 0,002 mol) e hidróxido de tetrapropilamonio (TPAOH 1 M sol. em H_2O , 30,6 g, 0,15 mol), a mistura foi mantida sob agitação por uma hora em temperatura ambiente e então o tetraetoxissilano (TEOS, 17,11 g, 0,08 mol) foi adicionado. O gel foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 72 horas e então transferida ao reator hidrotermal e mantida por 24 h a 90 °C. Durante esse período ocorreu a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas. Por fim o material foi submetido ao processo de calcinação para a retirada da molécula orgânica direcionadora de estrutura, para isso o material foi mantido por 8 horas a 600 °C.

4.2.5. Mordenita

A zeólita Modernita na escala nanométrica (nMOR) foi sintetizada de acordo com o processo previamente descrito por Hincapie et. al. [65]. Para a síntese hidróxido de sódio (NaOH , 0,15g, 0,003 mol) foi solubilizado em água destilada (H_2O , 5,6g, 0,3 mol), seguido pela adição de aluminato de sódio (NaAlO_2 , 0,077 g, 0,001 mol), a solução foi agitada até completa solubilização. Depois a solução de sílica coloidal (Ludox 30 wt. % SiO_2 suspenso em água, 0,72g, 0,01 mol) foi adicionada e a mistura foi mantida sob agitação por uma hora em temperatura ambiente. Sementes de Mordenita (mMOR – síntese descrita anteriormente, 0,056 g) foram adicionadas ao gel, que foi mantido sob agitação por 30 minutos. Após esse processo o gel foi levado ao reator micro-ondas (CEM Discovery) por 10 horas a 170 °C. Durante esse período ocorreu a formação do material zeolítico. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim secagem do material sólido a 40 °C por 16 horas.

4.3. Troca Iônica das Zeólitas com o íon Gd^{3+}

Diferentes métodos de troca iônica foram testados a fim de definir qual condição de troca iônica produziria materiais com melhores taxas de relaxividade. Por isso foram feitas a troca iônica tradicional em solução com diferentes temperaturas e pressão e a troca iônica no estado sólido com diferentes tempos de aquecimento.

4.3.1. Troca Iônica em Solução

Os experimentos de troca iônica em solução foram adaptados do trabalho de C. Platas-Iglesias et. al. [44]. Primeiramente a zeólita foi mantida sob agitação em uma solução de cloreto de sódio a 1 mol/L a temperatura ambiente por aproximadamente 12 h. A suspensão foi centrifugada diversas vezes até a total remoção dos íons Cl^- . Para certificar se a solução estava livre de íons cloreto, algumas gotas de nitrato de prata foram adicionadas à água da lavagem, se ainda houvesse algum resquício de cloreto haveria a formação de cloreto de prata, que precipita, neste caso a amostra era lavada novamente.

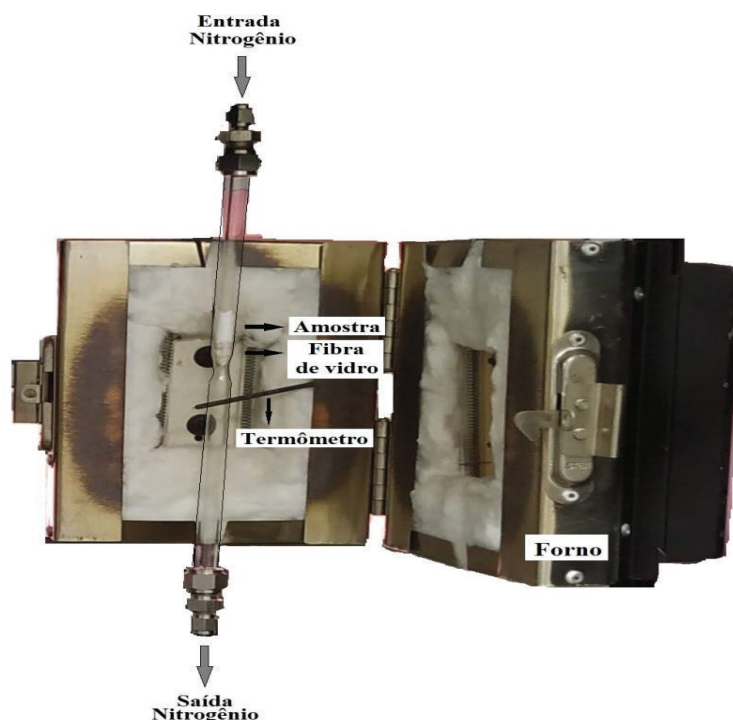
A zeólita pré-tratada (1,5 g) foi suspensa em água deionizada (10 mL) e o pH da suspensão foi ajustado em aproximadamente 5,5 com uma solução de ácido clorídrico (0,1 mol/L). Somente após o ajuste do pH o cloreto de gadolínio (na proporção de 1Gd:3Al) podia ser adicionado, dessa maneira o sal não precipitaria. A partir daqui três caminhos poderiam ser seguidos:

1. A mistura foi mantida sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente.
2. A mistura foi mantida sob agitação por 12 horas em um banho de silicone a 80 °C
3. A mistura foi transferida a um reator hidrotermal e mantida por 12 horas a 80 °C.

4.3.2. Troca Iônica no Estado Sólido

Os experimentos de troca iônica no estado sólido foram adaptados do trabalho de Karge et. al. [66]. Em um almofariz foi adicionada a zeólita e o cloreto de gadolínio nas devidas proporções, eles foram moídos com o pistilo até que a mistura ficasse bem homogênea, depois disso este sólido foi transferido ao reator de bancada representado na figura 21. No forno a mistura teve a temperatura elevada a 580 °C sob um fluxo de gás nitrogênio (N_2) para evitar a oxidação do material. O material poderia ser mantido a essa temperatura por 2 h, 4 h ou 6 h.

Figura 26 – Reator utilizado para a troca iônica no estado sólido.



FONTE: Autoria própria, 2019.

Como cada material zeolítico apresenta uma quantidade diferente de alumínio em sua rede, consequentemente a quantidade de cloreto de gadolínio utilizada para a troca iônica foi diferente para cada material, mas sempre mantendo a proporção de 1 átomo de gadolínio para 3 átomos de alumínio. A quantidade em gramas está indicada na tabela 6. Na tabela 7 há um resumo dos processos de troca iônica realizados para cada amostra. Por fim, a nomenclatura dos 44 materiais resultantes após o processo de troca iônica está indicada na tabela 8.

Tabela 6 – Massa de cloreto de gadolínio necessária para manter a proporção de 1Gd:3Al.

Zeólita	Massa zeólita	Massa cloreto de gadolínio
FAU	1,0 g	0,416 g
LTA	1,0 g	0,680 g
BEA	1,0 g	0,288 g
MFI	1,0 g	0,880 g
MOR	1,0 g	0,226 g

FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 7 – Resumo dos processos de troca iônica realizados.

Código	Método	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
1	Solução	25	12
2	Solução	80	12
3	Solução – reator hidrotermal	80	12
2h	Estado Sólido	580	2
4h	Estado Sólido	580	4
6h	Estado Sólido	580	6

FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 8 – Materiais resultantes após a troca iônica.

Zeólita\Método	1	2	3	2 h	4 h	6 h
mFAU	mFAU-1	mFAU-2	mFAU-3	mFAU-2h	mFAU-4h	mFAU-6h
mLTA	*	*	*	mLTA-2h	mLTA-4h	mLTA-6h
mBEA	mBEA-1	*	mBEA-3	mBEA-2h	mBEA-4h	mBEA-6h
mMFI	mMFI-1	*	mMFI-3	mMFI-2h	mMFI-4h	mMFI-6h
mMOR	mMOR-1	*	mMOR-3	mMOR-2h	mMOR-4h	mMOR-6h
nFAU	nFAU-1	nFAU-2	nFAU-3	nFAU-2h	nFAU-4h	nFAU-6h
nLTA	*	*	*	nLTA-2h	nLTA-4h	*
nBEA	nBEA-1	*	nBEA-3	nBEA-2h	nBEA-4h	nBEA-6h
nMFI	nMFI-1	*	nMFI-3	nMFI-2h	nMFI-4h	nMFI-6h
nMOR	*	*	*	nMOR-2h	*	nMOR-6h
*Métodos de troca iônica que não foram realizados para as respectivas zeólitas.						

FONTE: Autoria própria, 2020.

4.4. Caracterização Físico-Química dos Materiais Zeolíticos

Todas as zeólitas sintetizadas e depois trocas ionicamente com o Gd^{3+} foram caracterizadas pela difração de raios-x (DRX), utilizando o difratômetro Rigaku Multiflex operado a 40 kV e 15 mA, utilizando filtro de Ni e radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Os dados de MEV foram obtidos em dois grandes centros de caracterização de materiais no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) – UFSCar usando Philips XL-30 FEG e no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)-CNPEM usando um FEI Inspect F50 – High Resolution SEM. A análise química dos elementos Si, Al, Na e Gd nas zeólitas foi realizada por meio da espectroscopia de emissão óptica com plasma (ICP-OES), no laboratório de análise química da Universidade de São Paulo (USP). Medidas do tempo de relaxação (T_1) de diferentes concentrações de cada material utilizando o espectrometro de RMN de 500 MHz (11,7 T), Agilent DD2 do Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio) para cálculo da relaxividade das zeólitas trocadas iônica com Gd^{3+} .

4.5. Estudos Relaxométricos

Os estudos relaxométricos foram adaptados da literatura [40,47]. A zeólita trocada ionicamente com o ion Gd^{3+} foi dispersa em solução de agarose (0,5 %) e sonicada por 5 minutos para que as partículas fossem bem dispersas. Com essa suspensão cinco amostras de 1 mL foram preparadas com uma serie de concentrações de zeólita variando de 0,1 a 0,5 %.

Os tempos de relaxação longitudinal e transversal (T_1 e T_2) foram medidos para cada uma das concentrações a 36 °C no espectrômetro 7 T da Bruker (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Alemanha) utilizando a sequência de recuperação inversa (*inversion recovery*), variando o tempo de inversão (TI) e mantendo o tempo de repetição fixo (TR) em 10 s (TR = 1000 ms; TE = 1100 ms; TI = 10000, 5000, 2500, 1000, 400 e 200 ms, *slice thickness* = 5 mm, matriz = 1 x 3 x 3). A relaxividade longitudinal (r_1) ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pela concentração do íon Gd^{3+}) é definida como a inclinação da reta plotada em um gráfico de $1/T_1$ versus a concentração de íons Gd^{3+} . A relaxividade r_1 do Gd-DOTA é de $5,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ quando medida em um espectrômetro 7 T.

Figura 27 – Espectrômetro 7 T da Bruker (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Alemanha) utilizado para os estudos relaxométricos e estudos *in vivo*.



FONTE: Autoria própria, 2019.

4.6. Preparo do Contraste para os Estudos *In Vivo*

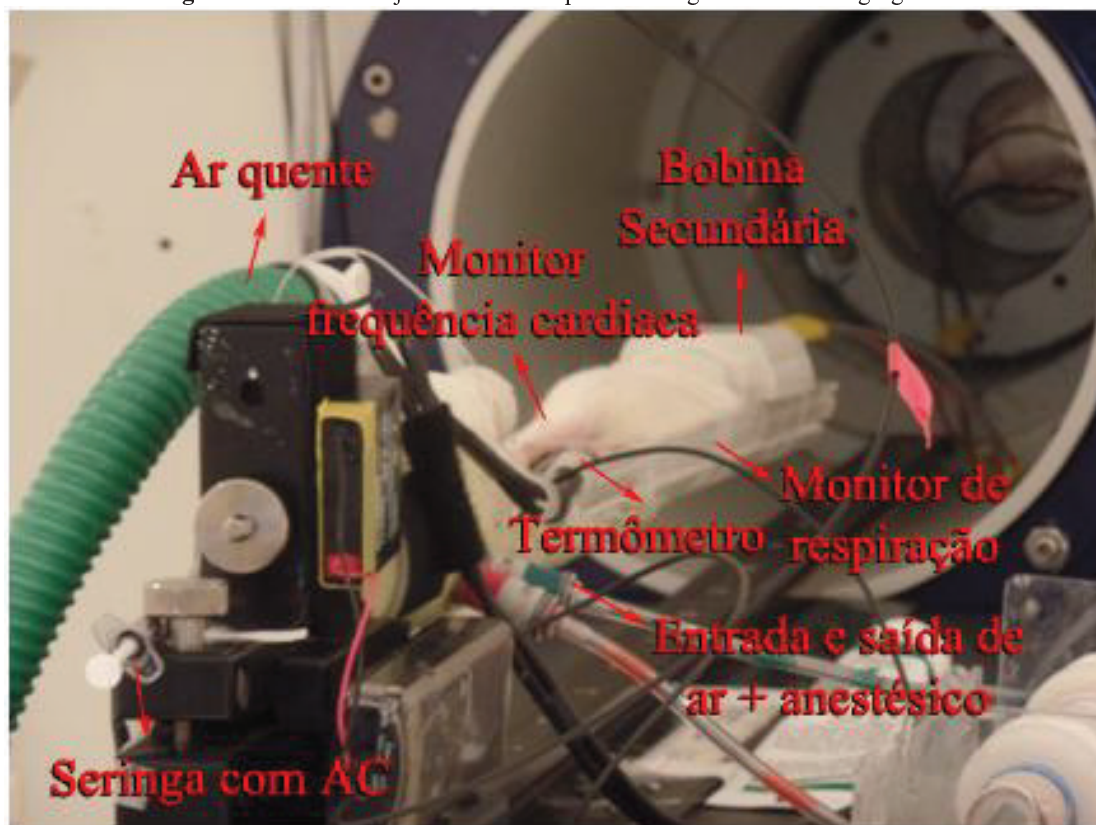
Para ser administrado aos animais, o agente de contraste foi preparado ao dispersar 0,1 mmol da zeólita trocada ionicamente com Gd^{3+} em 10 mL de soro fisiológico, com posterior ajuste do pH = 7 adicionando gotas de solução de hidróxido de sódio (1 mol/L).

4.7. Estudos *In Vivo*

O desempenho dos agentes de contraste foi avaliado utilizando seis ratos Sprague-Dawley fêmeas pesando entre 200 e 250 g. Como esses são animais saudáveis, sem nenhuma patologia, foi decidido testar o desempenho dos agentes de contraste na vasculatura, uma vez que os agentes de contraste são conhecidos por melhorar a visualização de vasos sanguíneos. Os animais foram divididos em dois grupos de três. Um dos grupos recebeu uma injeção intraperitoneal do material sintetizado nesse trabalho, enquanto o outro grupo recebeu uma injeção intraperitoneal do agente de contraste comercial Gd-DOTA (Dotarem, Guerbet LLT), atuando como controle. Os animais foram primeiramente anestesiados com isoflurano 4% e

foram mantidos anestesiados com uma mistura de 2% de isofluorano, ar e oxigênio, administrado utilizando um ventilador para roedores (Model 683, Harvard Apparatus, South Natic, MA) durante todo o processo de scan e MRI. A temperatura dos animais foi mantida em 35 °C por circulação de ar quente pelo suporte do animal durante dos scans de MRI. Todas as diretrizes do NIH para tratamento o tratamento humano desses animais foram estritamente seguidas.

Figura 28 – Foto do ajuste do animal para as imagens de MR-Angiografia.



FONTE: Autoria própria, 2019.

Os estudo de MRI *in vivo* foram realizados utilizando o espectrômetro 7T (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Alemanha), com uma bobina de cabeça transmissora/receptora para a obtenção das imagens. Os procedimentos foram realizados de acordo com o descrito por Narayana et al. [67,68]. Um angiograma de RM pré-contraste foi adquirido utilizando o protocolo 3D TOF, com os seguintes parâmetros: tempo de repetição 10,9 ms e tempo de eco 3,4 ms; 180 secções com 0.147 mm de espessura e 0.147 mm de separação entre secções consecutivas; área de visualização 16 x 11.6 mm; matriz 180 x 3 x 3. O tempo de aquisição total foi de 24 min. Após a obtenção do angiograma de RM pré-contraste, o agente de contraste foi injetado no peritônio utilizando um cateter ligado a uma seringa por um tubo de silicone longo o suficiente para permitir a administração do contraste sem mover a base do

animal dentro do espectrômetro durante o procedimento. Imediatamente após a administração do contraste, novos angiogramas de RM foram adquiridos diversas vezes com geometria e parâmetros de scan idênticos ao angiograma pré-contraste. O tempo total dos scans para a obtenção das imagens de angiograma de RM foi de 96 min. A tabela 9 descreve a quantidade de contraste que cada animal recebeu.

Tabela 9 – Tipo de contraste e quantidade administrada a cada animal.

Animal	Contraste	Quantidade
1	Gd-DOTA	0,2 mmol.kg ⁻¹
2	Gd-DOTA	0,2 mmol.kg ⁻¹
3	Gd-DOTA	0,2 mmol.kg ⁻¹
4	Gd-zeólita	0,004 mmol.kg ⁻¹
5	Gd-zeólita	0,02 mmol.kg ⁻¹
6	Gd-zeólita	0,05 mmol.kg ⁻¹

FONTE: Autoria própria, 2020.

4.8. Eliminação do agente de contraste

A excreção do agente de contraste pelos animais foi avaliada utilizando os seis ratos Sprague-Dawley fêmeas pesando entre 200 e 250 g. Os animais foram divididos em dois grupos de três indivíduos. Um grupo recebeu uma injeção intraperitoneal do material sintetizado nesse trabalho, enquanto o outro recebeu uma injeção intraperitoneal de Gd-DOTA (Dotarem, Guerbet LLT) e foi utilizado como controle. Urina e sangue foram coletados de cada animal antes da injeção do contraste e 1h, 2 dias e 7 dias após a administração do contraste. O tempo de relaxação longitudinal de cada amostra foi obtido como uma medida da concentração de agente de contraste, utilizando o mesmo método descrito anteriormente na sessão 5.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

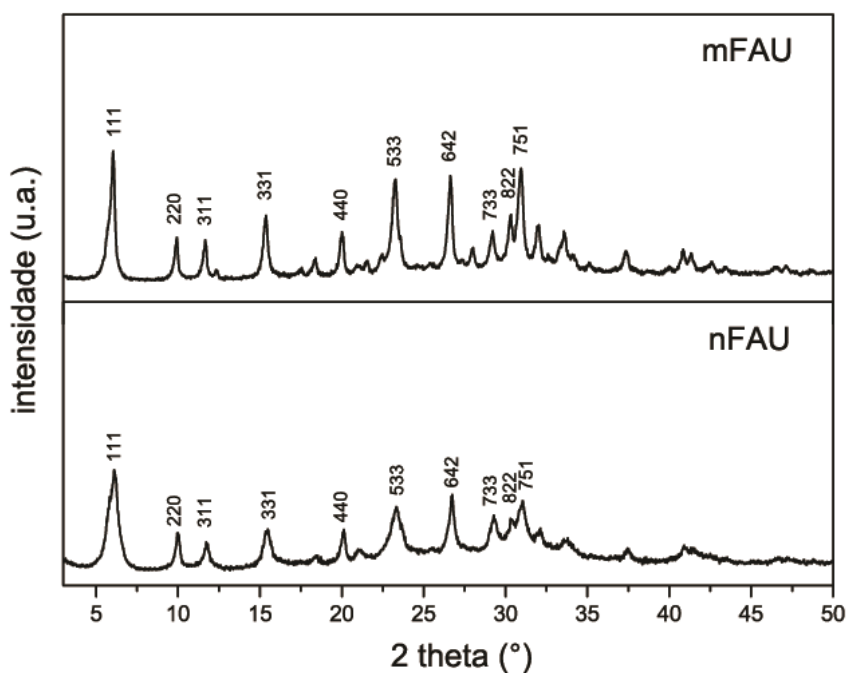
5.1. Caracterização Físico-Química das Sínteses por DRX e MEV

A difração de raios-X (DRX) é uma técnica útil para a identificação de um material policristalino, uma vez que cada material apresenta um padrão único de difração [69]. Como as zeólitas normalmente se encontram em fases policristalinas a difração de raios-X é a primeira técnica utilizada para a caracterização deste material. As figuras 29, 31, 33, 35 e 37 mostram os difratogramas de raios-X de cada material sintetizado nesse trabalho. As figuras 30, 32, 34, 36 e 37 mostram as imagens dos materiais obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Os padrões de DRX da zeólita Faujasita nas escalas micrométrica e nanométrica estão apresentados na figura 29. As reflexões estão de acordo com os padrões reportados na literatura [59]. Nota-se que os dois padrões de DRX apresentam os mesmos picos de difração, porém no caso da nFAU há uma diminuição da intensidade e aumento da largura a meia altura dos picos de difração nas regiões de $2\theta = 6,1; 11,6; 15,4; 23,3; 26,6; 30,3; 30,9; 32,1$ e $33,5^\circ$, correspondentes aos índices de Miller (111), (311), (331), (533), (642), (733), (822) e (751).

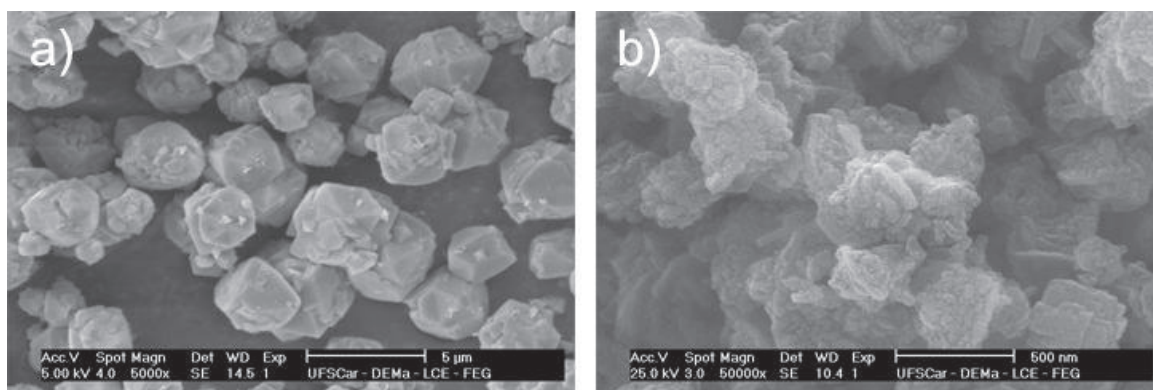
Essas diferenças entre os difratogramas apontam que a zeólita nFAU tem um tamanho reduzido em comparação com a mFAU, as micrografias apresentadas na figura 30 comprovam as diferentes dimensões, enquanto a zeólita mFAU apresenta partículas com tamanho variando entre 1 e 3 μm , a zeólita nFAU apresenta partículas com até 500 nm.

Figura 29 – Padrão de DRX da zeólita Faujasita sintetizada na escala micrométrica e nanométrica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Figura 30 – Imagens de MEV da zeólita Faujasita na escala (a) micrométrica (escala 5 μm) e (b) nanométrica (escala 500 nm).

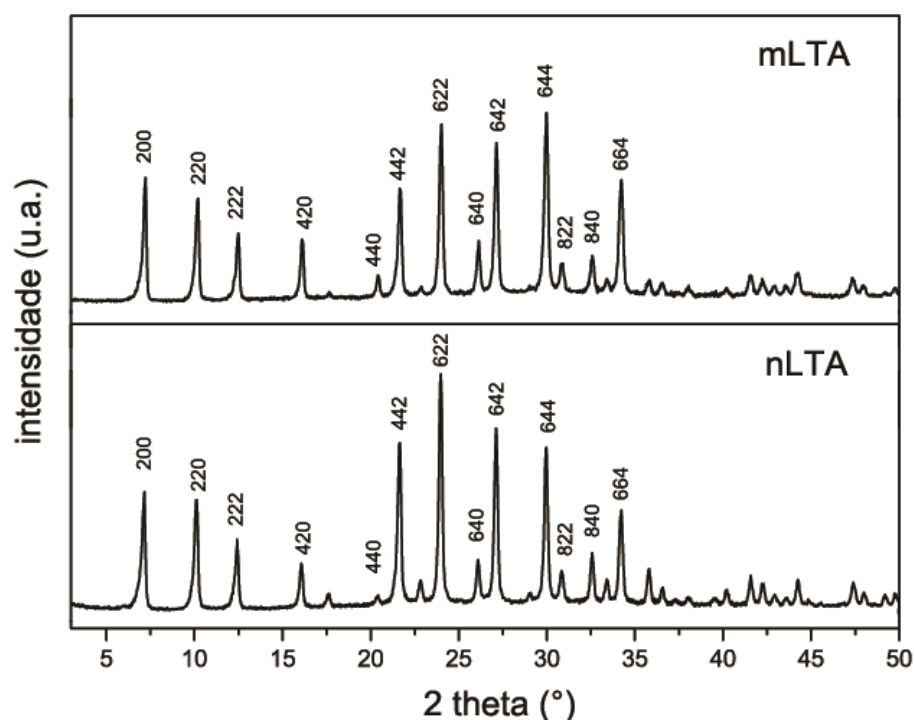


FONTE: Autoria própria, 2020.

Os padrões de DRX da zeólita A nas escalas micrométrica e nanométrica estão apresentados na figura 31. As reflexões estão de acordo com os padrões reportados na literatura [59,63]. Nota-se que os dois padrões de DRX apresentam os mesmos picos de difração, porém no caso

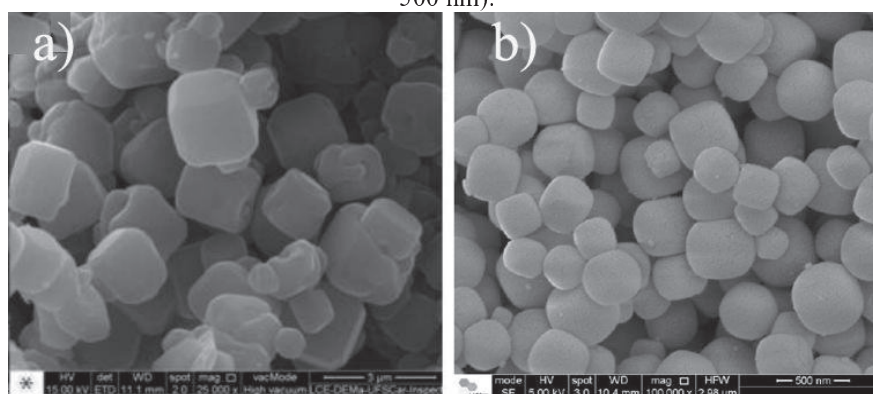
da nLTA há uma pequena diminuição da intensidade dos picos de difração nas regiões de $2\theta = 7,1; 10,1; 21,6; 23,9; 27,1; 29,9$ e $34,2^\circ$, correspondentes aos índices de Miller (200), (220), (442), (622), (642), (644) e (664). Essas diferenças entre os difratogramas são muito sutis para apontar a diferença de tamanho das partículas da mLTA e nLTA, porém as micrografias apresentadas na figura 32 comprovam as diferentes dimensões, enquanto a zeólita mLTA apresenta partículas com tamanho variando entre 1 e 3 μm , a zeólita nFAU apresenta partículas entre 200 e 500 nm.

Figura 31 – Padrão de DRX da zeólita A sintetizada na escala micrométrica e nanométrica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

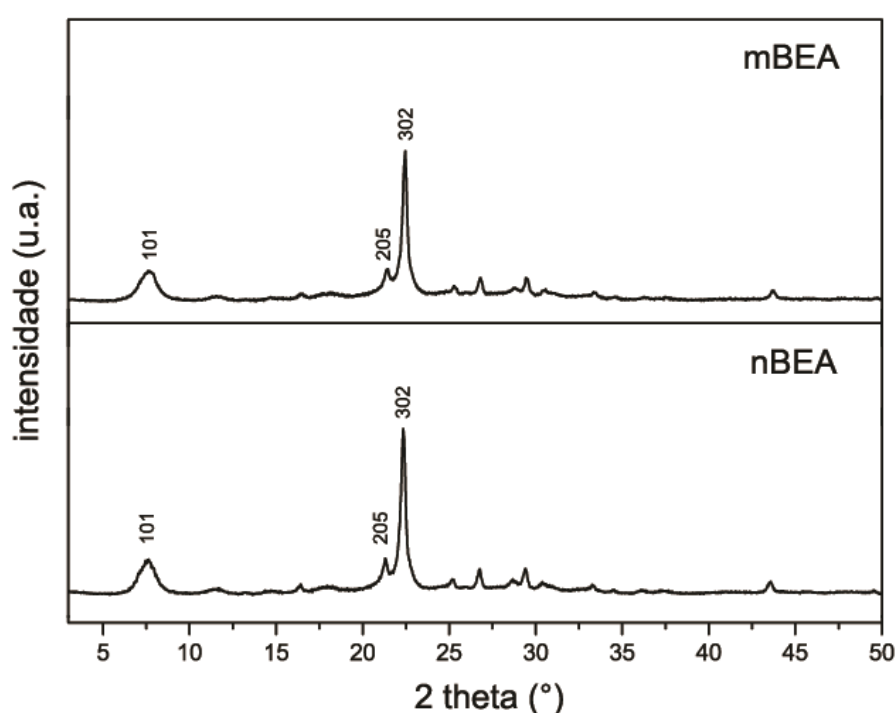
Figura 32 – Imagens de MEV da zeólita A na escala (a) micrométrica (escala 3 μm) e (b) nanométrica (escala 500 nm).



FONTE: Autoria própria, 2020.

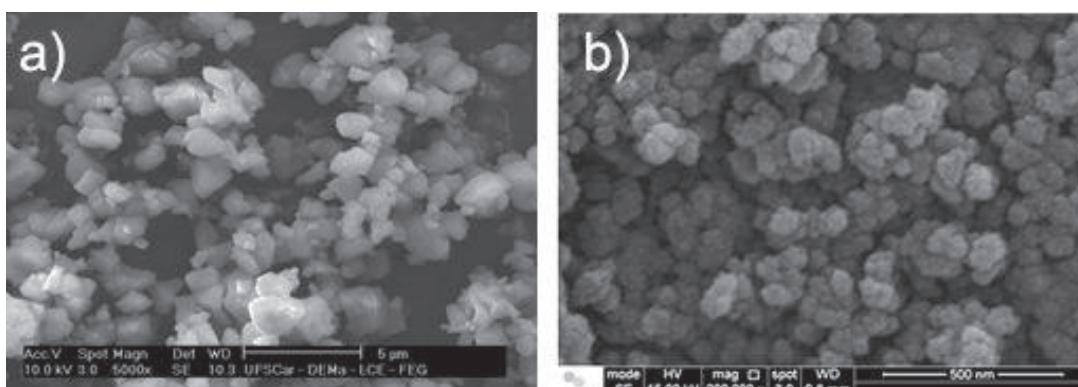
Os padrões de DRX da zeólita Beta nas escalas micrométrica e nanométrica estão apresentados na figura 33. As reflexões estão de acordo com os padrões reportados na literatura [60,64]. Nota-se que os dois padrões de DRX apresentam os mesmos picos de difração, além disso, seus picos de difração apresentam a mesma intensidade. Porém as micrografias apresentadas na figura 34 mostram as diferentes dimensões de cada zeólita, enquanto a zeólita mBEA apresenta partículas com tamanho variando entre 500 nm e 3 μm , a zeólita nBEA apresenta partículas de 70 a 100 nm.

Figura 33 – Padrão de DRX da zeólita Beta sintetizada na escala micrométrica e nanométrica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

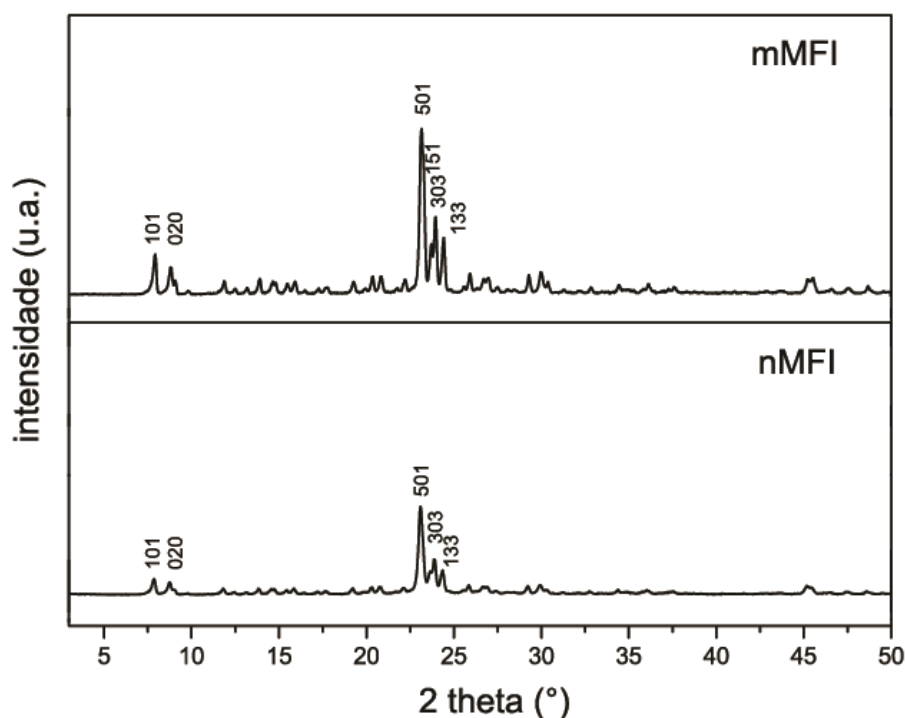
Figura 34 – Imagens de MEV da zeólita Beta na escala (a) micrométrica (escala 5 μm) e (b) nanométrica (escala 500 nm).



FONTE: Autoria própria, 2020.

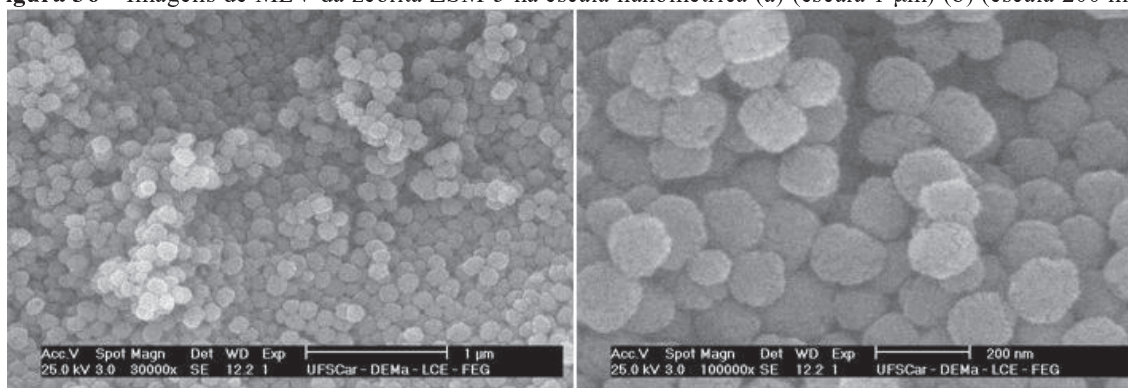
Os padrões de DRX da zeólita ZSM-5 nas escalas micrométrica e nanométrica estão apresentados na figura 35. As reflexões estão de acordo com os padrões reportados na literatura [61,63]. Nota-se que os dois padrões de DRX apresentam os mesmos picos de difração, porém no caso da nMFI há uma diminuição da intensidade dos picos de difração nas regiões de $2\theta = 7,8; 8,8; 26,2; 23,7; 24,0$ e $24,4^\circ$, correspondentes aos índices de Miller (101), (020), (501), (151), (303) e (133). Na nMFI, o pico de difração correspondente ao índice de Miller (151) se sobrepõe ao pico correspondente (303). Essas diferenças entre os difratogramas apontam que a zeólita nMFI tem um tamanho reduzido em comparação com a mMFI, as micrografias apresentadas na figura 36 mostram que a zeólita nMFI apresenta partículas com com aproximadamente 150 nm.

Figura 35 – Padrão de DRX da zeólita ZSM-5 sintetizada na escala micrométrica (cima) e nanométrica (baixo).



FONTE: Autoria própria, 2020.

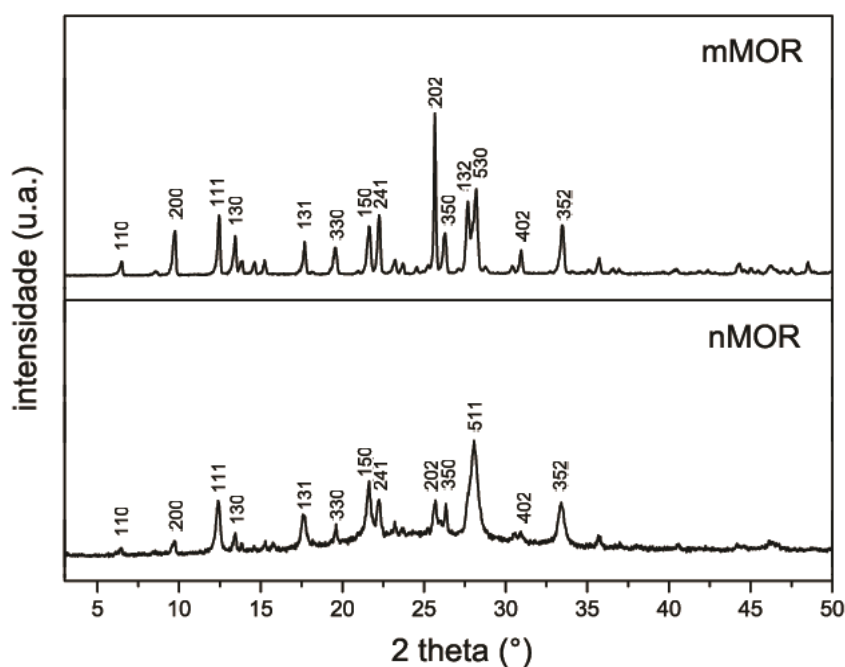
Figura 36 – Imagens de MEV da zeólita ZSM-5 na escala nanométrica (a) (escala 1 μm) (b) (escala 200 nm).



FONTE: Autoria própria, 2020.

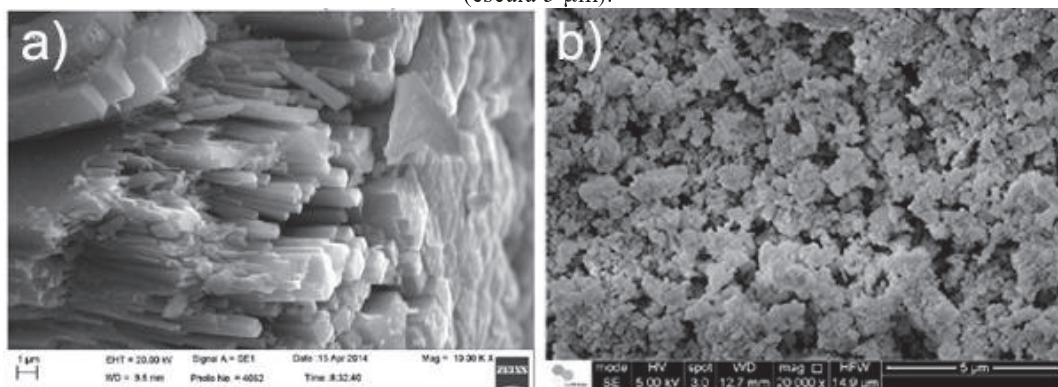
Os padrões de DRX da zeólita Mordenita nas escalas micrométrica e nanométrica estão apresentados na figura 37. As reflexões estão de acordo com os padrões reportados na literatura [62,65]. Nota-se que há uma pequena diferença nos dois padrões de DRX, os picos de difração nas regiões de $2\theta = 27,6$ e $28,2^\circ$, correspondentes aos índices de Miller (132) e (530) da mMOR desaparecem na nMOR e são substituídos por um pico mais intenso em $2\theta = 28^\circ$, correspondendo ao índice de Miller (511). O pico de difração localizado em $2\theta = 25,7^\circ$, correspondente ao índice de Miller (202), apresenta um grande aumento de intensidade na nMOR quando comparado à mMOR enquanto há uma diminuição na intensidade dos picos nas regiões de $2\theta = 6,5; 9,7; 13,5$ e $22,4^\circ$, correspondentes aos índices de Miller (111), (200), (130) e (241). Nota-se também um aumento na largura à meia altura do pico de difração em $2\theta = 33,5^\circ$, correspondente ao índice de Miller (352). As micrografias apresentadas na figura 38 mostram as diferentes dimensões desses materiais, enquanto a zeólita mMOR apresenta partículas com tamanho variando entre 4 e 5 μm , a zeólita nMOR apresenta partículas entre 300 e 500 nm.

Figura 37 – Padrão de DRX da zeólita Mordenita sintetizada na escala micrométrica e nanométrica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Figura 38 – Imagens de MEV da zeólita Mordenita na escala (a) micrométrica (escala 1 μm) e (b) nanométrica (escala 5 μm).



FONTE: Autoria própria, 2020.

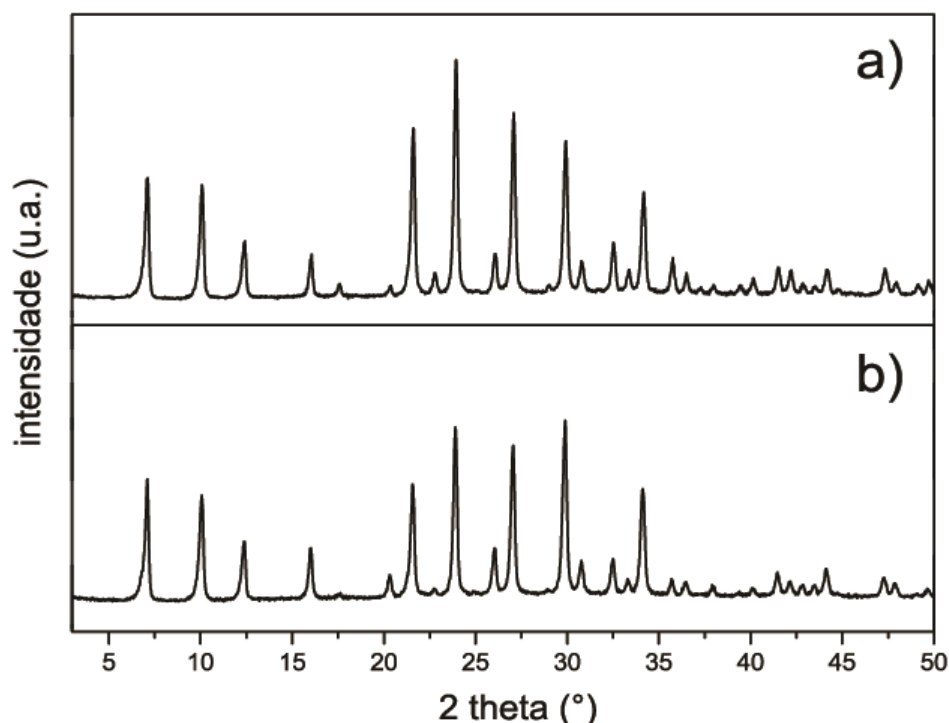
Para a síntese de determinados materiais foi necessário o uso de agentes direcionadores de estrutura (SDAs) e após a síntese foi necessária a retirada dessas moléculas orgânicas a fim de liberar os poros das zeólitas. Para isso foi realizada a calcinação desses materiais, que consiste em aquecê-los a temperaturas a partir de 500 °C por algumas horas, durante esse processo ocorre a combustão das moléculas orgânicas em água e gás carbônico.

Após a calcinação destes materiais uma nova análise de DRX foi realizada a fim de certificar

que a estrutura cristalográfica dessas zeólitas foi mantida. Nas figuras 39 a 43 estão indicados os difratogramas de raios-x desses materiais antes e depois do processo de calcinação.

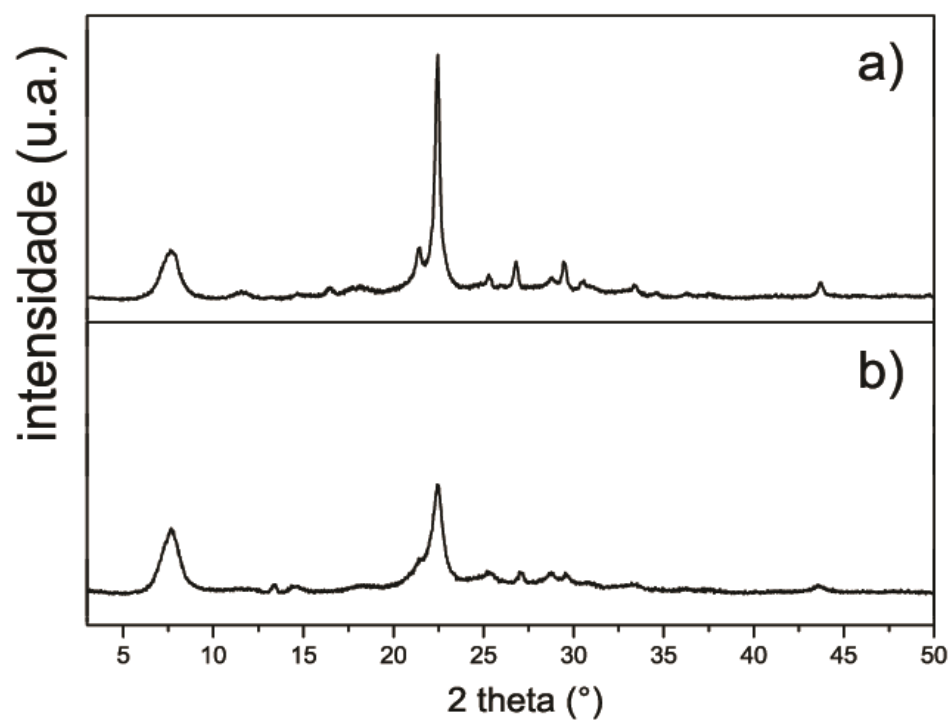
Comparando os difratogramas da zeólita nLTA antes e depois do processo de calcinação, apresentados na figura 39, observa-se pequenas diferenças na intensidade de alguns picos de difração, como os localizados em $2\theta = 17,5$; $23,9$; $29,9$ e $32,5^\circ$. Nos difratogramas das zeólitas mBEA e nBEA obtidos antes e depois do processo da calcinação, apresentados nas figuras 40 e 41, observa-se um aumento na largura a meia altura dos picos em $2\theta = 21$ e 22° , o que causa uma sobreposição desses picos após a calcinação. Já nos difratogramas das zeólitas mMFI e nMFI obtidos antes e depois do processo de calcinação, apresentados nas figuras 42 e 43, observa-se um aumento na intensidade dos picos de difração em $2\theta = 7,8$ e $8,8^\circ$ e um leve alargamento dos picos de difração localizados na região de $22^\circ \leq 2\theta \leq 25^\circ$. Apesar dessas pequenas diferenças os padrões de difração se mantiveram após a calcinação, o que indica que a estrutura cristalográfica desses materiais foi mantida mesmo após eles serem submetidos por longos períodos a altas temperaturas.

Figura 39 – Padrões de DRX da nLTA obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (500°C , 8h).



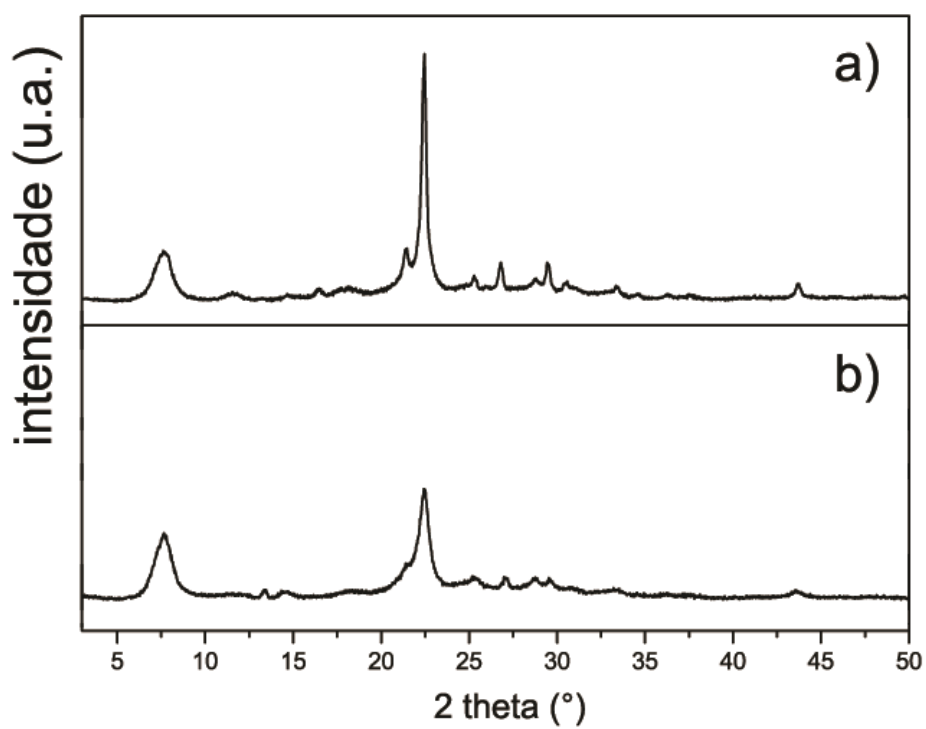
FONTE: Autoria própria, 2020.

Figura 40 – Padrões de DRX da mBEA obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (600 °C, 8h).



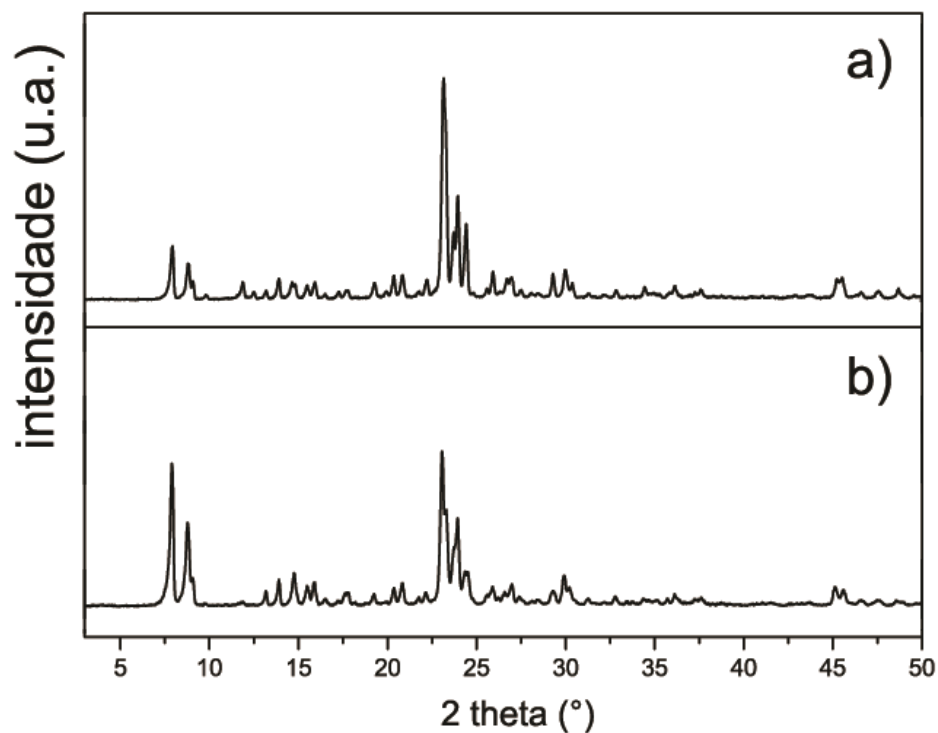
FONTE: Autoria própria, 2020.

Figura 41 – Padrões de DRX da nBEA obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (600 °C, 8h).



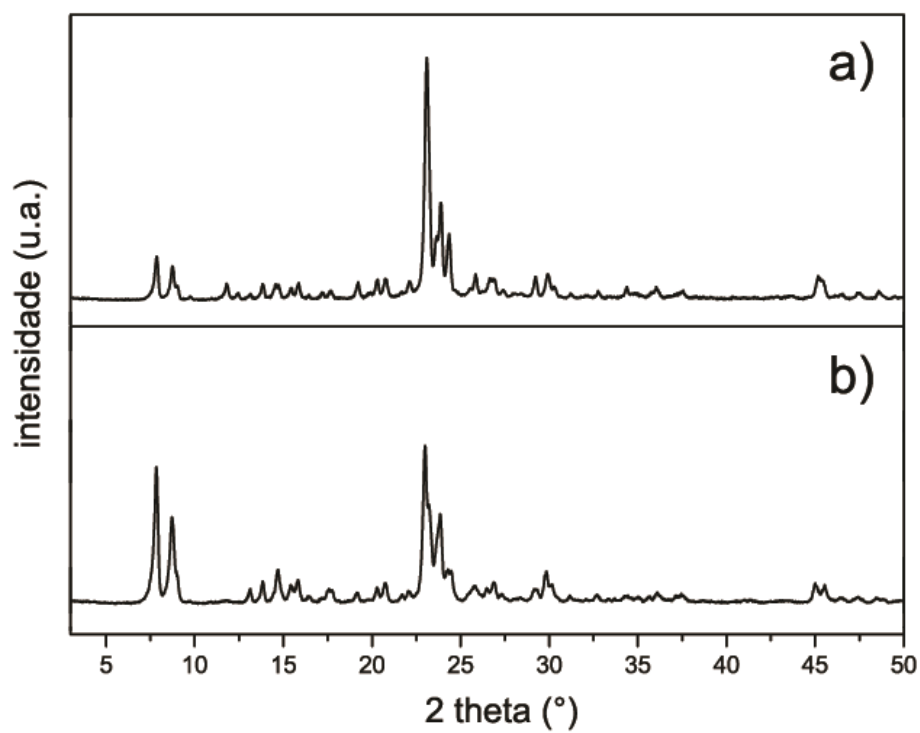
FONTE: Autoria própria, 2020.

Figura 42 – Padrões de DRX da mMFI obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (600 °C, 8h).



FONTE: Autoria própria, 2020.

Figura 43 – Padrões de DRX da nMFI obtidos (a) antes e (b) depois do processo de calcinação (600 °C, 8h).

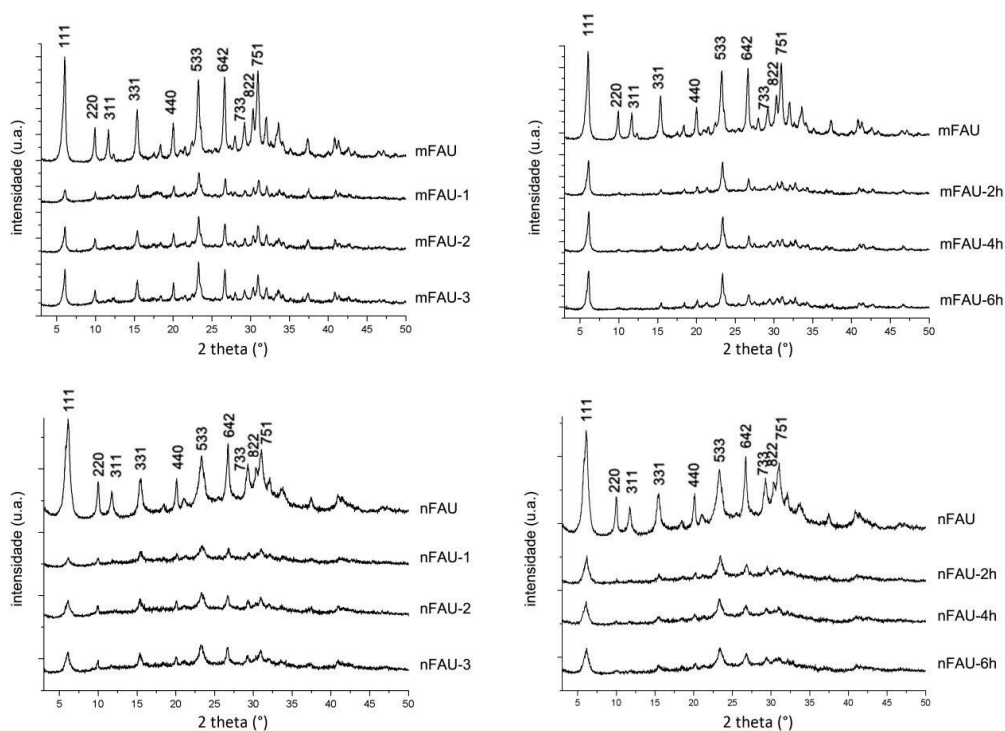


FONTE: Autoria própria, 2020.

5.2. Troca Iônica

As figuras 44 a 48 mostram os padrões de DRX das zeólitas antes e depois da cada método de troca iônica; os padrões de reflexão de todos os materiais são mantidos após o processo de troca iônica, o que indica que a estrutura cristalográfica de cada zeólita foi mantida.

Os difratogramas da zeólita Faujasita (Figura 44) na escala micrométrica e nanométrica submetidos à troca iônica em solução apresentam notável diminuição na intensidade de seus picos de difração, alguns picos de difração se destacam, como o correspondente ao índice de Miller (311) uma vez que sua intensidade diminuiu drasticamente, quase não sendo mais perceptível, e o pico de difração correspondente ao índice de Miller (111), que era o pico mais intenso, e após o processo de troca iônica sua intensidade é comparável aos picos de difração correspondente aos índices de Miller (331) e (440). Quando a FAU é submetida à troca iônica no estado sólido além das diferenças já mencionadas para o processo de troca iônica em solução, ainda nota-se uma diminuição drástica na intensidade dos picos de difração correspondentes aos índices de Miller (220), (311), (331) e (440) enquanto os picos correspondentes aos índices (111) e (533) continuam com aproximadamente a mesma intensidade, sendo então os picos de difração mais intensos do padrão de DRX. Mesmo com todas essas mudanças o padrão dos picos de difração se mantém, indicando que houve uma distorção da estrutura, mas que ela não foi alterada. Essa distorção se deve à troca do cátion de compensação Na^+ pelo Gd^{3+} na rede cristalográfica da zeólita. Os dados das tabelas 10 e 11 confirmam a incorporação do íon Gd^{3+} na estrutura da zeólita.

Figura 44 – Difrátogramas de Raios-X da FAU após a troca iônica.

FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 10 – Análise química da zeólita FAU na escala micrométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.

Material	Al	Gd	Na	Si
mFAU	$13,2 \pm 0,1$	*	$10,46 \pm 0,2$	$14,04 \pm 0,06$
mFAU-1	$12,4 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$4,45 \pm 0,06$	$13,4 \pm 0,1$
mFAU-2	$12,8 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,4$	$2,61 \pm 0,02$	$13,74 \pm 0,09$
mFAU-3	$12,9 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,8$	$3,35 \pm 0,05$	$13,6 \pm 0,1$
*concentração não detectável				

FONTE: Autoria própria, 2020.

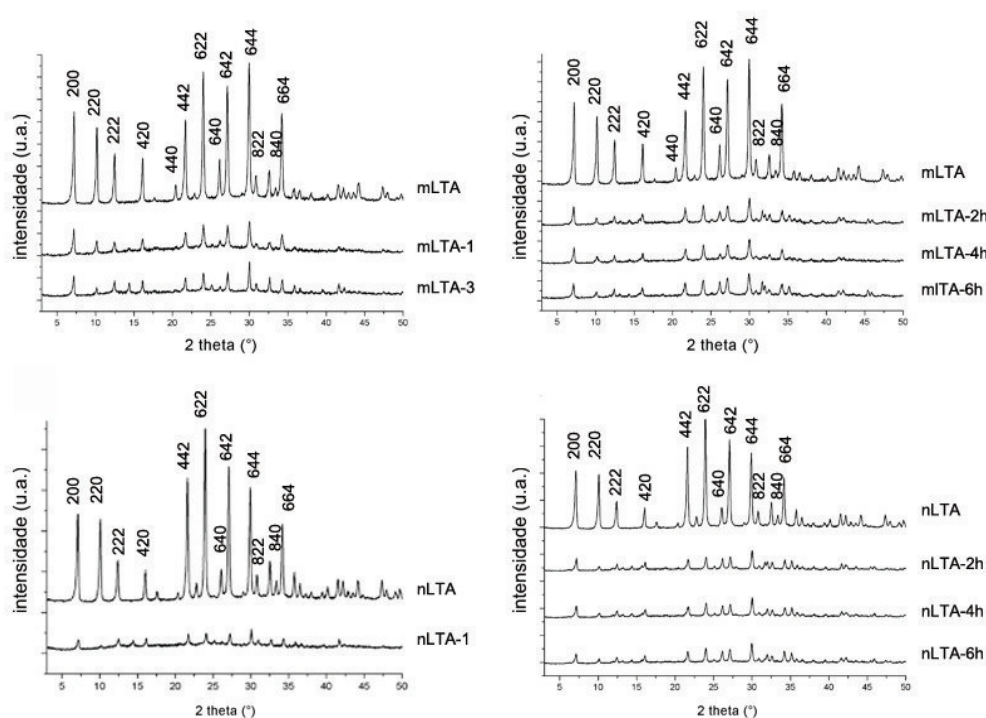
Tabela 11 – Análise química da zeólita FAU na escala nanométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.

Material	Al	Gd	Na	Si
nFAU	$12,2 \pm 0,2$	*	$10,71 \pm 0,03$	$14,47 \pm 0,04$
nFAU-1	$11,84 \pm 0,03$	$2,6 \pm 0,4$	$3,11 \pm 0,01$	$14,05 \pm 0,07$
nFAU-2	$11,9 \pm 0,3$	$1,72 \pm 0,02$	$1,78 \pm 0,01$	$14,2 \pm 0,2$
nFAU-3	$11,61 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	$13,83 \pm 0,06$
*concentração não detectável				

FONTE: Autoria própria, 2020.

Os difratogramas da zeólita A (Figura 45) na escala micrométrica e nanométrica submetidos à troca iônica em solução e à troca iônica no estado sólido apresentam notável diminuição na intensidade de seus picos de difração, indicando que houve uma distorção da estrutura devido a incorporação do íon Gd^{3+} na estrutura da LTA.

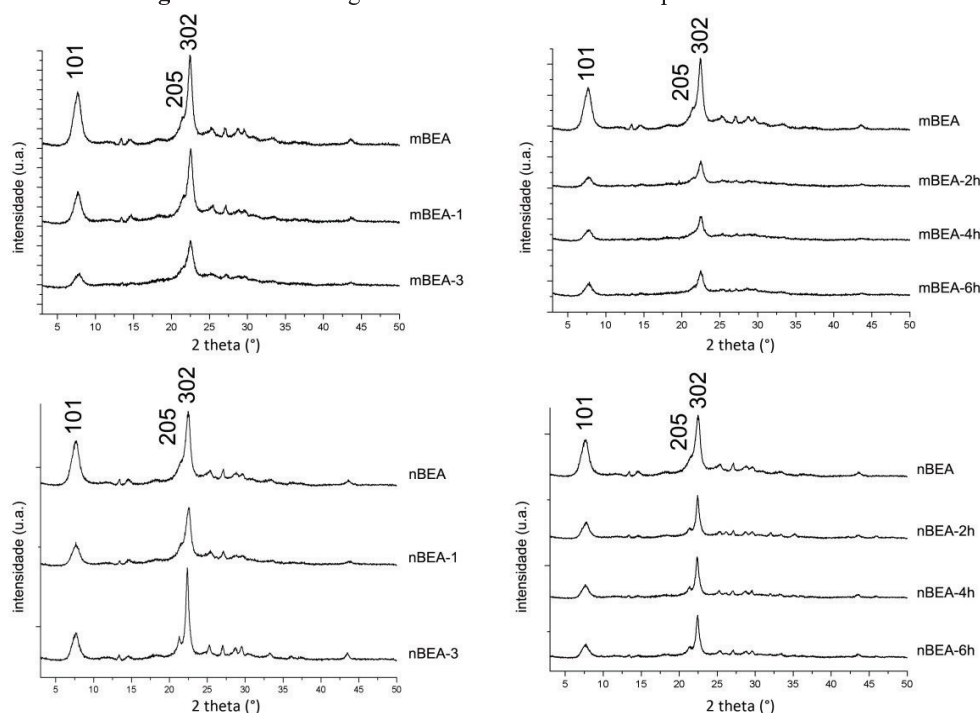
Figura 45 – Difratogramas de Raios-X da LTA após a troca iônica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Os difratogramas das zeólitas Beta apresentados na figura 46 revelam que após os métodos de troca iônica em solução e troca iônica no estado sólido houve mudanças na intensidade dos picos de difração, indicando a incorporação do íon Gd^{3+} em sua estrutura. Nos materiais nBEA-3, nBEA-2h, nBEA-4h e nBEA-6h os picos de difração correspondentes aos índices de Miller (205) e (302) tiveram uma diminuição da largura a meia altura e deixam de se sobrepor. Os dados das tabelas 12 e 13 mostram que cerca de 1,5 % da massa das zeólitas mBEA-1 e nBEA-1 consiste em íons Gd^{3+} .

Figura 46 – Difratogramas de Raios-X da BEA após a troca iônica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 12 – Análise química da zeólita BEA na escala micrométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.

Material	Al	Gd	Na	Si
mBEA	$2,04 \pm 0,01$	*	$0,14 \pm 0,01$	$30,0 \pm 0,3$
mBEA-1	$1,78 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,2$	*	$29,61 \pm 0,09$
*concentração não detectável				

FONTE: Autoria própria, 2020.

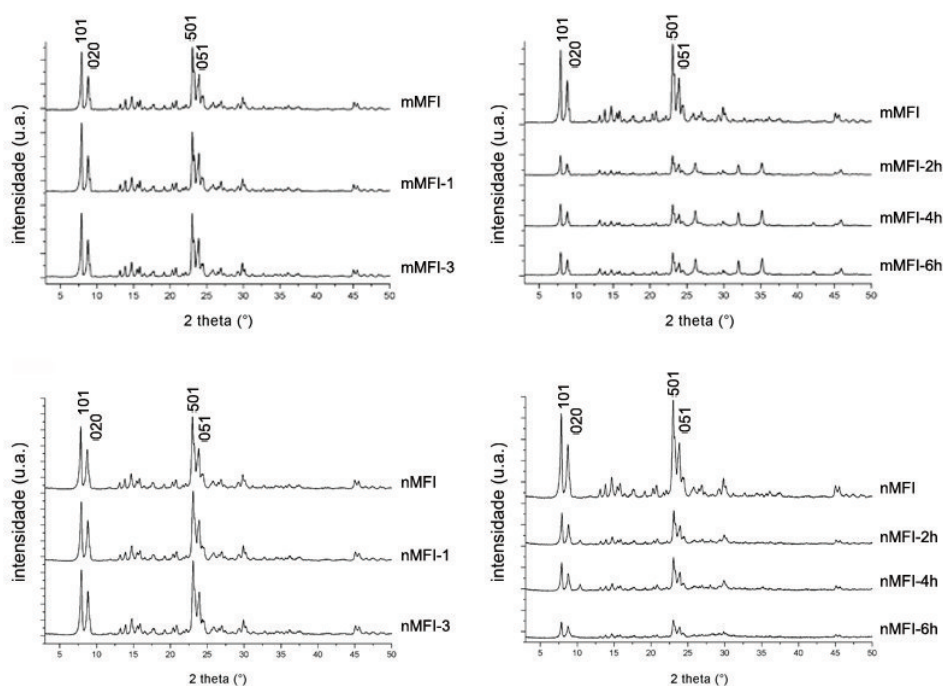
Tabela 13 – Análise química da zeólita BEA na escala nanométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.

Material	Al	Gd	Na	Si
nBEA	$2,16 \pm 0,03$	*	*	$29,2 \pm 0,1$
nBEA-1	$1,35 \pm 0,02$	$1,66 \pm 0,01$	*	$31,0 \pm 0,4$
*concentração não detectável				

FONTE: Autoria própria, 2020.

Nos difratogramas da zeólita ZSM-5 (Figura 47) na escala micrométrica e nanométrica submetidos à troca iônica em solução não houve mudança em relação ao difratograma da zeólita antes do processo de troca iônica, sugerindo que não houve uma incorporação considerável de Gd^{3+} em sua estrutura com esse processo. Quando a zeólita ZSM-5 é submetida à troca iônica no estado sólido nota-se uma considerável diminuição na intensidade de seus picos de difração, e no caso da zeólita ZSM-5 na escala micrométrica percebe-se também um aumento na intensidade dos picos de difração localizados em $2\theta = 32$ e 35° . Essas alterações sugerem a incorporação do íon Gd^{3+} na rede cristalográfica da zeólita pelo processo de troca iônica no estado sólido.

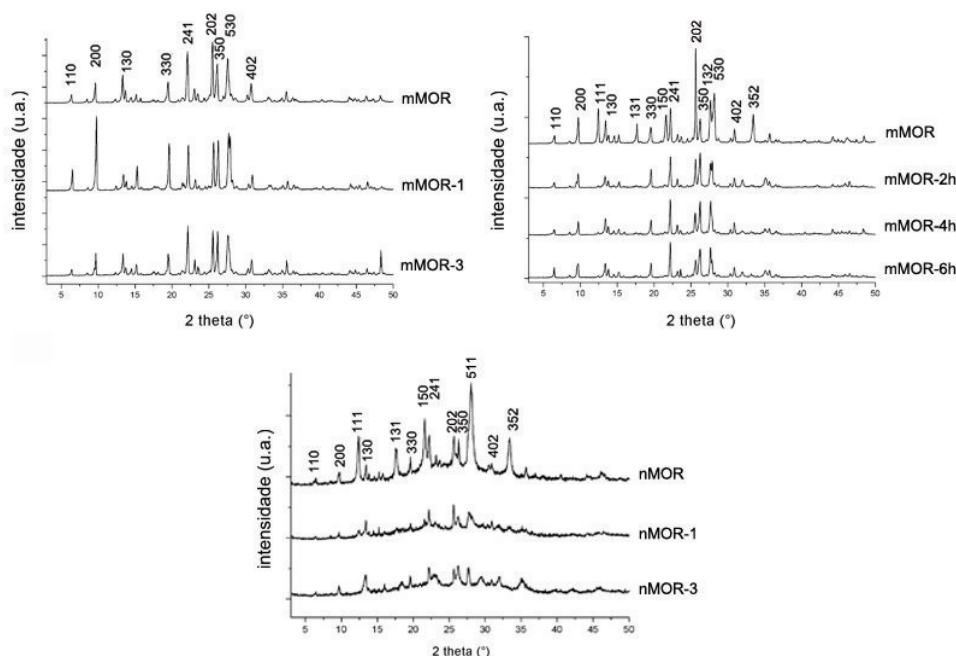
Figura 47 – Difratogramas de Raios-X da MFI após a troca iônica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Os difratogramas da zeólita Mordenita (Figura 48) na escala micrométrica e nanométrica submetidos à troca iônica em solução não apresentam muita diferença quando comparado ao difratograma da Mordenita antes da troca iônica, a não ser por um aumento considerável na intensidade do pico de difração correspondente ao índice de Miller (200) na zeólita mMOR-1. Quando a Mordenita na escala micrométrica é submetida à troca iônica no estado sólido nota-se a diminuição na intensidade do pico de difração correspondente ao índice de Miller (202). Os dados das tabelas 14 e 15 confirmam a incorporação do íon Gd^{3+} na estrutura da zeólita, porém em uma quantidade muito menor do que foi incorporado nas zeólitas FAU e BEA.

Figura 48 – Difratogramas de Raios-X da MOR após a troca iônica.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 14 – Análise química da zeólita MOR na escala micrométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.

Material	Al	Gd	Na	Si
mMOR	$6,03 \pm 0,02$	*	$4,82 \pm 0,02$	$25,9 \pm 0,3$
mMOR-1	$5,98 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,05$	$4,4 \pm 0,1$	$25,88 \pm 0,07$
*concentração não detectável				

FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 15 – Análise química da zeólita MOR na escala nanométrica com concentração de Al^{3+} , Gd^{3+} , Na^{2+} e Si^{4+} em mg/kg.

Material	Al	Gd	Na	Si
nMOR	$10,2 \pm 0,3$	*	$8,27 \pm 0,02$	$22,03 \pm 0,2$
nMOR-1	$10,18 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$	$7,7 \pm 0,1$	$21,7 \pm 0,4$
*concentração não detectável				

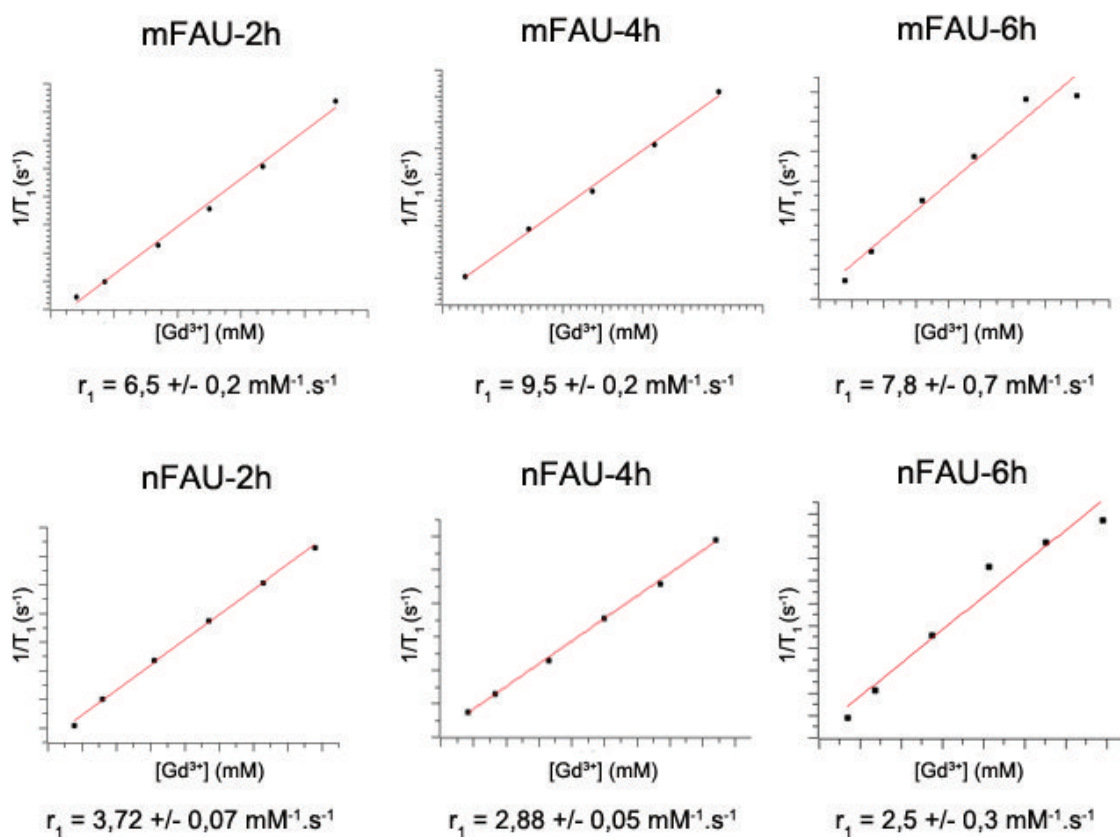
FONTE: Autoria própria, 2020.

Outro ponto a ser destacado é que não há indícios da presença de óxido de gadolínio (Gd_2O_3) após o processo de troca iônica. O padrão de difração do Gd_2O_3 apresenta quatro picos de difração intensos, correspondentes aos índices de Miller (222), (400), (440) e (622). E o difratograma de nenhuma zeólita após a troca iônica apresenta todas essas reflexões.

5.3. Relaxividade

Para o cálculo da relaxividade primeiro foi necessário obter o valor do tempo de relaxação para diversas concentrações de um mesmo material. Cada concentração da dispersão de determinada zeólita, teve o tempo de relaxação (T_1) medido, esses dados formam um ponto em um gráfico de $[\text{Gd}^{3+}] \times 1/T_1$ como os apresentados na figura 49. No mínimo 3 dispersões com concentrações diferentes de uma zeólita devem ter o tempo de relaxação medido para que uma reta possa ser traçada. O coeficiente angular dessa reta corresponde à relaxividade (r_1) daquele material. A relaxividade de um material determina o quanto certa concentração deste consegue afetar o tempo de relaxação de uma amostra. Quanto maior a relaxividade, mais eficiente é o agente de contraste. Na figura 49 estão representados alguns exemplos dos gráficos de $[\text{Gd}^{3+}] \times 1/T_1$ montados utilizando os dados obtidos nas análises realizadas no espectrometro de RMN de 500 MHz, Agilent DD2 do Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio). A relaxividade de cada material testado está apresentada na tabela 16.

Figura 49 – Exemplos de gráfico de $[Gd^{3+}] \times 1/T_1$ montados com medidas realizadas no espectrômetro de RMN de 500 MHz.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Na tabela as células marcadas em preto representam materiais que não foram medidos, já as células marcadas com asterisco representam materiais em que não foi possível medir o tempo de relaxação para mais de uma concentração da dispersão. As células destacadas em vermelho indicam materiais que tiveram o valor de relaxividade negativo. Durante as medidas houveram algumas dificuldades experimentais, como manter algumas zeólitas em dispersão por tempo suficiente para a realização da medida do tempo de relaxação de determinada dispersão. Esta pode ter sido a razão para que não fosse possível medir o tempo de relaxação das amostras marcadas com asterisco e que os materiais marcados em vermelho tenham apresentado uma relaxividade negativa.

Analisando o valores de relaxividade (r_1) para os materiais que foram medidos e apresentaram valores maior que 0, nota-se que a zeólita Faujasita e a zeólita Beta apresentam os maiores valores de r_1 e que a zeólita A apresenta os menores valores de r_1 juntamente com a zeólita Mordenita. Esses dados mais os dados de diâmetro de poros e cavidades das zeólitas

apresentados na tabela 5 (Capítulo 2) e o modelo de dois passos sugerido por Peters e colaboradores [70] indicam que a estrutura da zeólita influencia na relaxividade que esse material apresenta.

Estudos anteriores, investigando a zeólita FAU trocada ionicamente com gadolínio [70] mostram que o íon Gd^{3+} está localizado principalmente na supercage (gaiola- α – 11,2 Å), mas também pode ser encontrado na gaiola sodalita, no prisma hexagonal e na superfície da zeólita. Sabe-se também que seus poros têm 7,4 Å de diâmetro. Estas dimensões são grandes o suficiente para permitir a passagem do íon Gd^{3+} hidratado (6.36 Å) além de permitir que moléculas de água difundam facilmente pelas cavidades onde o íon se encontra. Essas condições são as responsáveis pelos altos valores de relaxividade da FAU. A zeólita LTA, também apresenta grandes cavidades (11 Å), porém seus poros têm diâmetro aproximado de 4,1 Å, dificultando a difusão das moléculas de água pelas cavidades contendo o íon Gd^{3+} .

A zeólita Beta apresenta poros maiores que a LTA (6,6 x 6,7 Å) e cavidade menor que a FAU (6,68 Å), e alguns dos materiais apresentam alta relaxividade, maior até que a da zeólita FAU. As zeólitas MFI e MOR, com pequenos poros e cavidades não apresentam valores de relaxividade significantes.

Tabela 16 – Resultados de relaxividade em $(mM.s)^{-1}$ para as zeólitas testadas – 11.7 T (resultados obtidos no Laboratório Nacional de Biotecnologia – LNBio).

	FAU		LTA		BEA		MFI		MOR	
	micro	nano	micro	nano	micro	nano	micro	nano	micro	Nano
1	26 ± 2	6,3 ± 0,5		*	2,9 ± 0,3	34 ± 5	*	*	1,15 ± 0,06	*
2	14 ± 2	5,5 ± 0,2								
3	20,5 ± 0,1	6,2 ± 0,2	*	*	39 ± 2	2 ± 2	-27 ± 9	-54 ± 15	*	
2h	6,5 ± 0,2	3,72 ± 0,07	0,20 ± 0,03	0,058 ± 0,006	10,7 ± 0,2	9,3 ± 0,5	3,6 ± 0,3	8,07 ± 0,07	1,5 ± 0,1	-0,6 ± 0,2
4h	9,5 ± 0,2	2,88 ± 0,05	0,07 ± 0,03	-0,013 ± 0,003	21,3 ± 0,7	14 ± 2	9 ± 1	4,6 ± 0,3	9,2 ± 0,6	
6h	7,8 ± 0,7	2,5 ± 0,3	0,07 ± 0,01	*	14 ± 1	10 ± 1	6,8 ± 0,3	16,8 ± 0,3	11,2 ± 0,8	*

Células marcadas em preto representam zeólitas que não foram testadas.

Células marcadas em vermelho, taxa de relaxação negativa.

*amostras que não foram medidas por dificuldades experimentais.

FONTE: Autoria própria, 2020.

Analisando a tabela 16 percebe-se, também, que a troca iônica em solução resulta em materiais com maior valor de relaxação que a troca iônica no estado sólido. Isso acontece devido à alta temperatura empregada no processo de troca iônica no estado sólido (580 °C), que fornece energia suficiente para que o íon Gd^{3+} se aloje mais facilmente em cavidades menores do material. Por exemplo, no caso da zeólita FAU, ao invés do íon Gd^{3+} ser incorporado na supercage, ele passa a ser incorporado na gaiola sodalita ou nos prismas hexagonais. Essa mudança de posicionamento dificulta o acesso das moléculas de água ao íon Gd^{3+} diminuindo a velocidade de difusão e consequentemente diminuindo o valor de relaxividade desses materiais.

Por último ao comparar os valores de relaxividade das zeólitas na escala micrométrica com as zeólitas na escala nanométrica, percebe-se que para quase todos os materiais as zeólitas na escala micrométrica apresenta maiores valores de relaxividade. Esses resultado é o oposto ao esperado, uma vez que as zeólitas nanométricas apresentam maior área superficial, o que facilitaria a difusão das moléculas de água pelas cavidades contendo o íon Gd^{3+} . Uma possível explicação para essa diferença se deve ao fato das nanozeólitas se aglomerarem, o que por fim dificulta a difusão das moléculas de água pelas partículas das nanozeólitas.

Sabemos que os valores de relaxividade dependem do campo magnético do equipamento e da temperatura da amostra além de outros fatores, por isso, antes de dar continuidade com os experimentos *in vivo*, alguns materiais de interesse foram selecionados com base nos resultados da tabela 16 e tiveram seus valores de relaxividade medidos no equipamento de MRI (7T) localizado na Universidade do Texas – *Health Science Center (UTHealth)* durante o doutorado sanduíche, para confirmar se eles se comportavam da mesma maneira que no espectrometro de 500 MHz. Os novos valores de relaxividades estão apresentados na tabela 17.

Observando os dados da tabela 17 nota-se que a zeólita FAU continua apresentando os maiores valores de relaxividade, seguida pela zeólita MFI. As zeólitas MOR, LTA e BEA apresentam os menores valores de relaxividade. No espectrômetro de 500 MHz alguns materiais da família BEA apresentavam valores de relaxividade maiores até que o da FAU e agora, no equipamento de MRI de 7T, esses valores diminuíram muito em comparação com a FAU. Porém agora eles concordam ainda mais com o modelo de dois passos de Peters [70]. No equipamento de MRI de 7T a troca iônica em solução e a zeólita na escala micrométrica continuam sendo responsáveis pelos materiais com maiores valores de relaxividade.

Tabela 17 – Resultados de relaxividade em $(\text{mM.s})^{-1}$ para as zeólitas testadas – 7T (resultados obtidos na Universidade do Texas durante doutorado sanduíche).

	FAU		LTA		BEA		MFI		MOR	
	micro	nano	micro	nano	micro	nano	micro	nano	Micro	nano
1	33 ± 5	3.81 ± 1	*	*	3.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	*	*	0.15 ± 0.04	*
2	52 ± 4	13.0 ± 0.8	*	*	*	*	*	*	*	*
3	55.2 ± 0.7	11 ± 1	*	0.50 ± 0.03	4.8 ± 0.2	*	*	*	*	*
2h	*	8.9 ± 0.6	0.3 ± 0.3	*	*	*	*	*	*	*
4h	30 ± 1	*	*	2 ± 1	2.58 ± 0.01	1.9 ± 0.1	5.7 ± 0.3	*	*	*
6h	17 ± 2	*	*	*	2.10 ± 0.05	1.5 ± 0.4	*	7.1 ± 0.6	2.1 ± 0.07	0.15 ± 0.03

*relaxividade desses materiais não foi medida.

Células marcadas em amarelo representam os materiais com relaxividade maior que a medida para o Gd-DOTA.

FONTE: Autoria própria, 2020.

Neste equipamento de MRI de 7T também foi medida a relaxividade do Gd-DOTA, e seu valor é de $5,1 (\text{mM.s})^{-1}$, um valor menor que dos materiais derivados da zeólita FAU e MFI. No caso da mFAU-2 e mFAU-3 esse valor chega a ser 10 vezes maior que o do agente de contraste utilizado comercialmente hoje em dia.

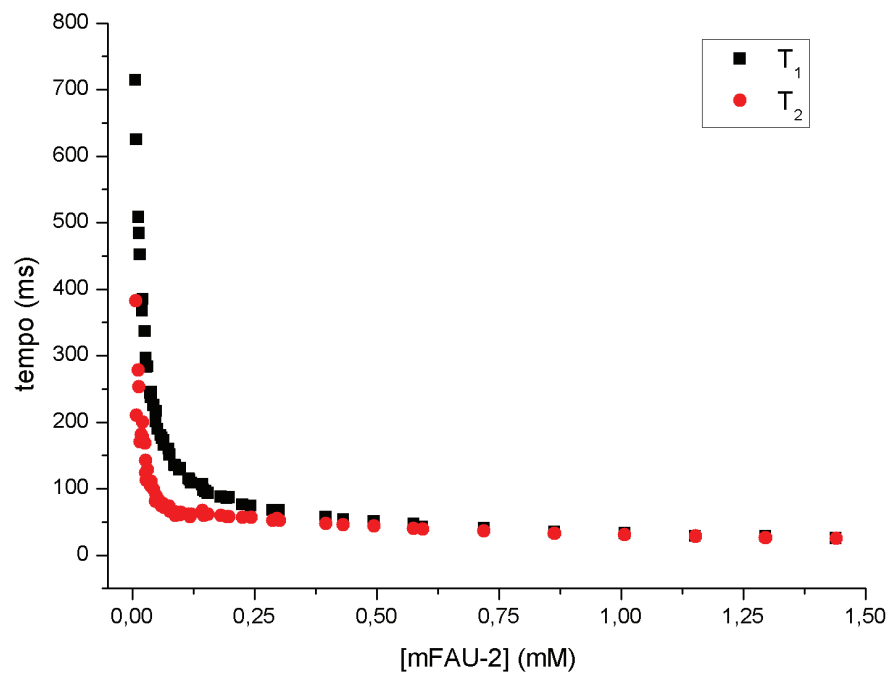
5.4. Cálculo da concentração inicial de contraste a ser administrado

A zeólita mFAU-2 foi o material escolhido para ser comparado com o agente de contraste comercial (Gd-DOTA), devido a seu alto valor de relaxividade ($52 \pm 4 (\text{mM.s})^{-1}$), e a sua capacidade de se manter em suspensão por maiores períodos de tempo quando comparada a outros materiais com altos valores de relaxividade. Caso o material precipite muito rápido a injeção desse material no animal fica comprometida, já que a agulha ou a seringa ligada ao cateter pode entupir. E notou-se que os materiais submetidos à troca iônica no estado sólido precipitavam muito mais rápido que os materiais sujeitos a troca iônica em solução. Dentre os materiais com os maiores valores de relaxividade, a nFAU-2 também precipitava rapidamente.

Novamente devido à injeção, a dispersão final não pode ser muito espessa, igualar a

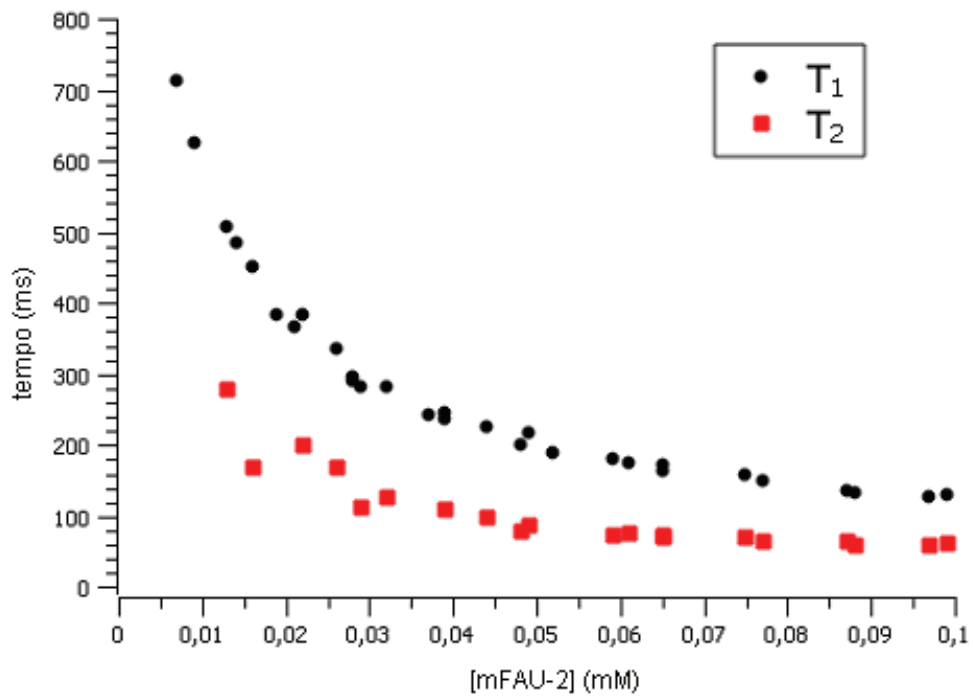
concentração de Gd^{3+} em uma dispersão de mFAU-2 à concentração de Gd^{3+} no Gd-DOTA era difícil pois não é possível manter 0,5 M de zeólita em dispersão, consequentemente o volume de zeólita a ser administrado no animal deveria ser muito maior, o que não é aconselhável, uma vez que o indicado para uma injeção intraperitoneal é um volume máximo de 10 ml/kg do animal [71]. Porém, como a relaxividade da zeólita é muito maior que a do Gd-DOTA, não haveria a necessidade de se administrar a mesma quantidade de Gd^{3+} quando se utiliza a zeólita como agente de contraste. Segunda a bula do Gd-DOTA, a recomendação é que se administre 0,1 mmol de Gd^{3+} por kg do animal para que haja uma melhora no contraste da imagem obtida por MRI. De forma a tentar encontrar uma concentração de zeólita que possa fazer o mesmo efeito que 0,1 mmol de Gd^{3+} , o gráfico na figura 51 foi montado. Ele mostra o tempo de relaxação T_1 (preto) e T_2 (vermelho) versus a concentração de Gd^{3+} . Este gráfico mostra como o tempo de relaxação (T_1) varia com a diluição da dispersão de mFAU-2. Com os dados do gráfico da figura 51 e os dados da tabela 18 é possível observar que com 0,1 mmol de mFAU-2 tem um T_1 menor que 200 ms, um valor muito menor que o T_1 de 0,1 mmol de Gd-DOTA, que é aproximadamente 800 ms. Com 0,02 mmol de mFAU-2 o T_1 é aproximadamente 500 ms, um tempo de relaxação próximo ao obtido quando se utiliza o dobro da concentração recomendada de Gd-DOTA por Kg do paciente. Com isso, foi definido a concentração de mFAU-2 a ser administrada nos primeiros testes (0,02 mmol de zeólita/kg do animal).

Figura 50 – Tempo de relaxação T_1 (preto) e T_2 (vermelho) x concentração da zeólita mFAU-2 para determinação da quantidade de zeólita a ser administrada ao objeto de estudo.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Figura 51 – Insert do gráfico da figura 50.



FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 18 – Concentração de Gd-DOTA x tempo de relaxação T_1 .

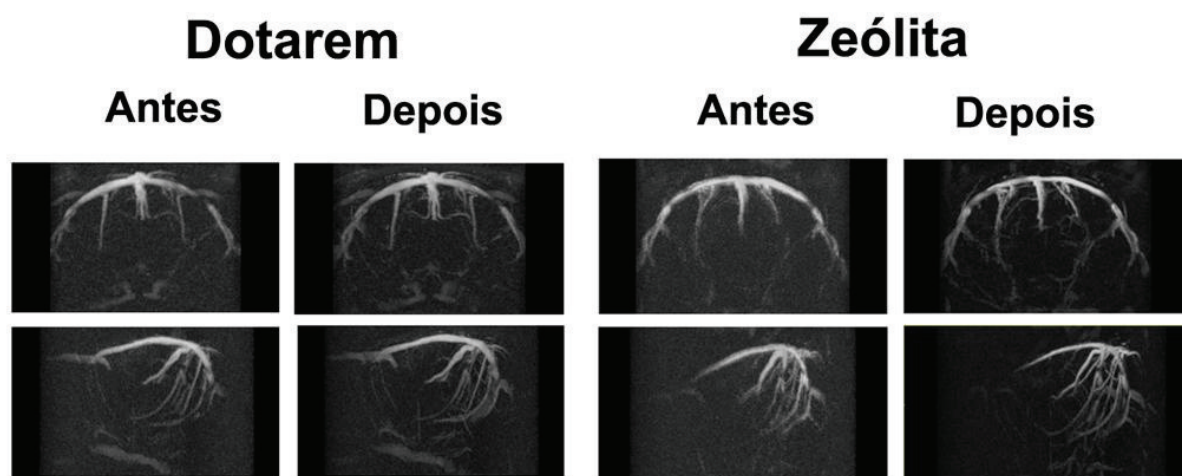
Concentração de Gd-DOTA (mM)	Tempo de relaxação T_1 (ms)
0,125	873
0,25	565
0,5	341
1,0	182

FONTE: Autoria própria, 2020.

5.5. Estudos *in vivo*

De forma a avaliar o efeito das zeólita mFAU-2 na relaxividade longitudinal, experimentos *in vivo* de angiografia cerebral por ressonância magnética foram realizados com ratos Sprague-Dawley. Primeiramente, testes preliminares foram feitos a fim de determinar os melhores parâmetros para o estudo *in vivo*. Para os testes preliminares foram utilizados dois ratos Sprague-Dawley fêmea com aproximadamente 500 g cada um. O método de administração escolhido foi a injeção intraperitoneal, assim como utilizado por Song et. al. [72], desta maneira o contraste seria absorvido mais lentamente pela corrente sanguínea. Como ressaltado na sessão anterior, o agente de contraste a base de zeólitas tem um valor de relaxividade muito maior que o Gd-DOTA, por isso, não foi necessário administrar a mesma concentração de zeólita e Gd-DOTA aos animais. O primeiro animal recebeu 0,2 mmol/kg de Gd-DOTA; e o segundo, 0,042 mmol/kg da zeólita mFAU-2.

Angiogramas cerebrais por RM foram adquiridos pré e pós-contraste. Nos testes preliminares o tempo de scan durou cerca de 30 minutos. Na figura 52, podem-se observar na primeira linha as imagens na orientação coronal e na segunda linha as imagens na orientação sagital. Na primeira coluna de cada material estão as imagens pré-contraste e na segunda as imagens pós-contraste. Nesse teste preliminar é notável que a imagem após a administração do contraste a base de mFAU-2 vasos sanguíneos mais definidos e em maior quantidade quando comparado à imagem obtida após a administração do Gd-DOTA, mesmo a concentração de gadolínio administrada com a zeólita sendo 20% da dosagem administrada com o Gd-DOTA.

Figura 52 – Angiografia de RM. Resultados Preliminares.

FONTE: Autoria própria, 2020.

Para o estudo comparativo foram utilizados seis ratos Sprague-Dawley fêmeas de 200 a 250 g da mesma família. O tempo de scan foi diminuído para 12 minutos, uma vez que a concentração máxima do Gd-DOTA é encontrada na corrente sanguínea apenas cinco minutos após a injeção e sua meia vida é aproximadamente 1 hora [73]. Para diminuir o tempo de scan é necessário diminuir o número de repetições do experimento, diminuindo esse número a imagem final não é tão definida como no caso dos testes preliminares, uma vez que o ruído passa a aparecer mais na imagem. Por isso, mesmo com o uso do Gd-DOTA, não é muito fácil ver uma melhora na imagem após a aplicação do contraste. Nas figuras 53 e 54 estão as imagens obtidas a cada scan de 12 minutos, antes e após a administração do contraste.

No Animal 1 nota-se maior contraste no quadrante esquerdo inferior nas imagens 0 min, 12 min e 24 min, após esse tempo não há muita diferença em relação à imagem sem o contraste. No segundo animal o efeito do contraste parece ser mantido por mais algumas imagens, porém após uma hora não há mais efeito do contraste nas imagens. No terceiro animal a imagem feita após 12 minutos da administração do contraste parece ser a que apresenta melhor contraste. Com isso estima-se que com 12 minutos o Gd-DOTA apresenta seu melhor contraste e em aproximadamente meia hora ele já está sendo recolhido da corrente sanguínea pelos rins.

No animal 4 as imagens obtidas em 24 e 36 minutos aparentam ser as que apresentam maior contraste, porém não há muita diferença entre o antes e depois da aplicação, por isso para o

animal número 5 a quantidade de contraste a ser injetado é cinco vezes maior e mesmo assim não parece haver muita diferenças nas imagens antes e após a injeção do contraste. No animal 6, 0,05mmol/Kg de contraste foi injetado e em algumas imagens dá-se a impressão de que o ruído na imagem aumentou.

Figura 53 – Imagens da Angiografia de MR antes e após a injeção de 0,2 mmol/Kg de Gd-DOTA.

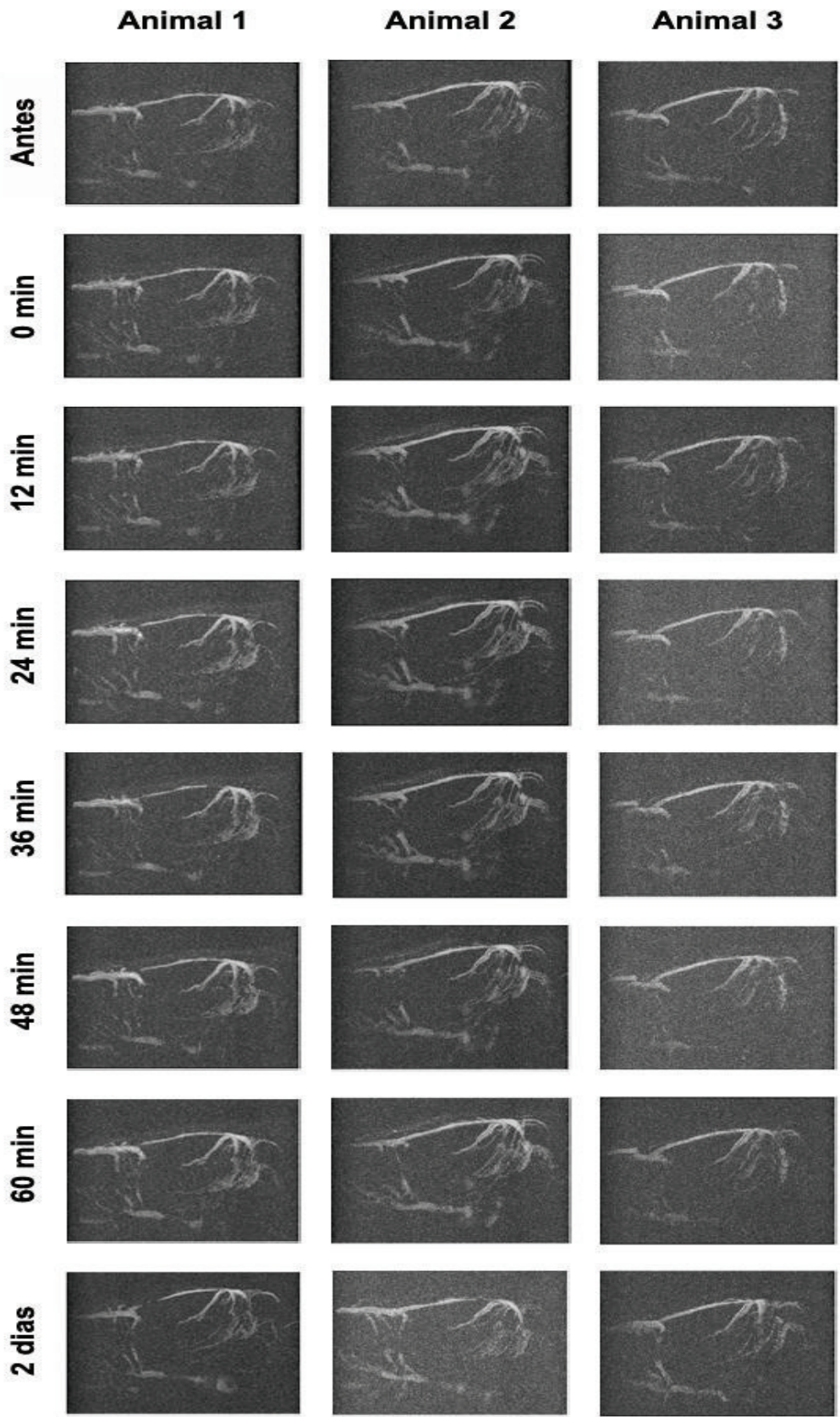
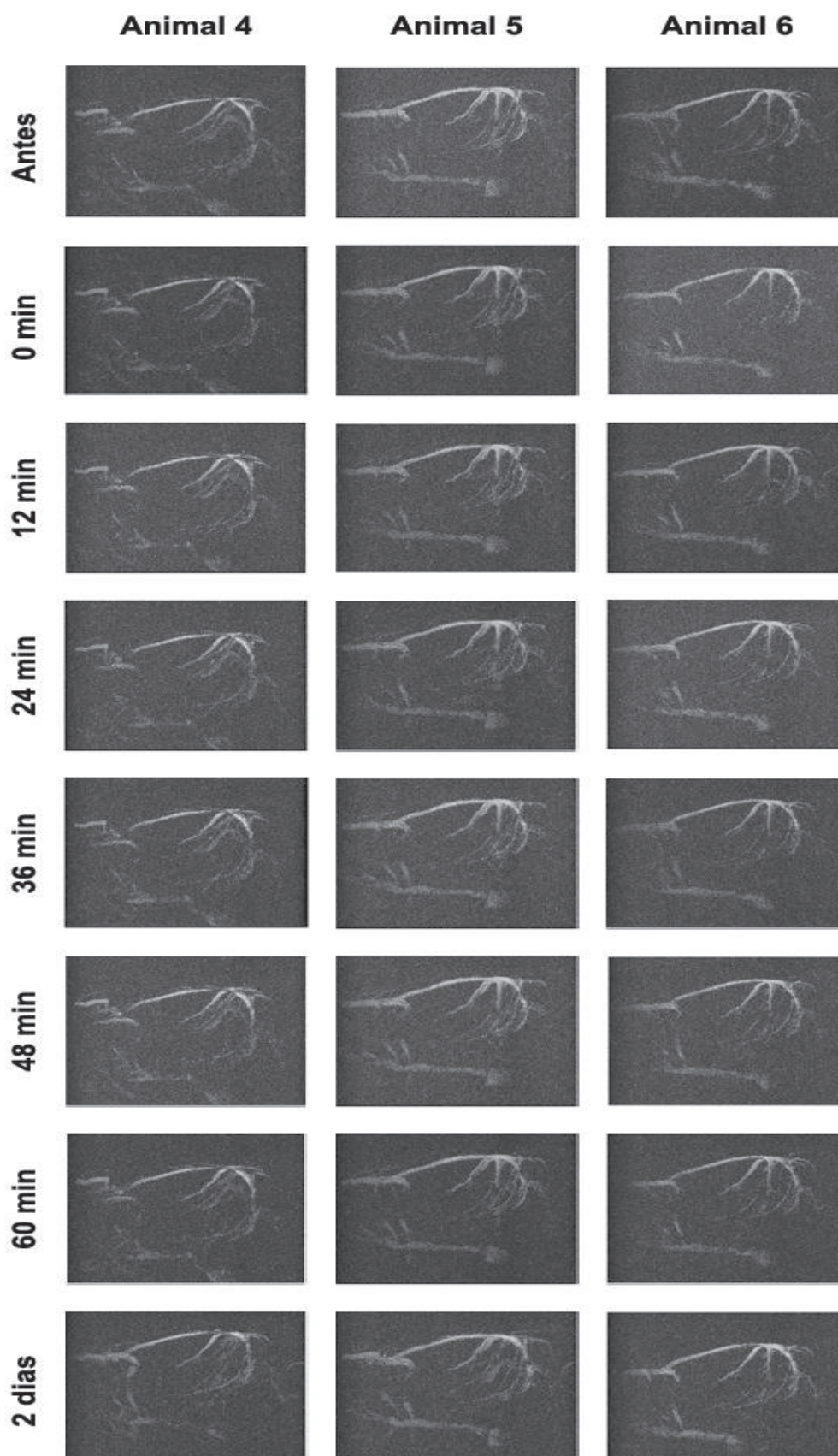


Figura 54 – Imagens da Angiografia de MR antes e após a injeção de 0,004 mmol/Kg no animal 4, 0,02 mmol/Kg no animal 5 e 0,05 mmol/Kg no animal 6 do Contraste à base de zeólita.



FONTE: Autoria própria, 2020.

5.6. Eliminação do agente de contraste

O tempo de retenção do agente de contraste é um importante fator de segurança em aplicações *in vivo*. Qualquer agente de contraste que é retido no corpo por um longo período de tempo pode ser tóxico e não viável para aplicações *in vivo*. Uma forma de investigar a razão de excreção é sacrificar um grande número de animais em diferentes momentos após a aplicação do contraste e fazer uma análise para determinar a concentração de Gd^{3+} em diferentes tecidos. Porém, neste estudo, não era viável usar dezenas de ratos para colher estes dados, uma vez que estudos anteriores já provavam a segurança das zeólitas em usos *in vivo* [41,42,47]. Por isso, o método utilizado foi escolhido, nele o tempo de relaxação longitudinal (T_1) da urina e do sangue de seis ratos Sprague-Dawley colhidos em diversos momentos pré e pós-contraste foram determinados. Como o T_1 é proporcional à concentração de Gd^{3+} , mudanças no T_1 ao longo do tempo refletem as variações na concentração dos agentes de contraste retidos no corpo do animal. Os resultados estão apresentados nas tabelas 19 a 21.

Antes da administração do agente de contraste, o tempo de relaxação longitudinal da urina era de aproximadamente 4000 ms. As amostras de urina colhidas 1 hora após a injeção do contraste apresentam menores valores de T_1 , indicando a presença de Gd^{3+} na urina. O tempo de relaxação T_1 das amostras de urina colhidas dos animais que receberam Gd-DOTA como agente de contraste é muito menor quando comparado aos animais que receberam mFAU-2, sugerindo que o Gd-DOTA é excretado pela urina mais rapidamente que a zeólita. Porém em dois dias os valores de T_1 foram recuperados aos mesmos valores obtidos com as amostras colhidas pré-contraste, indicando que todo o contraste foi eliminado até o dia dois. O mesmo estudo foi feito utilizando soro do sangue coletado antes e depois da injeção dos contrastes e os resultados obtidos foram similares, depois de dois dias o não há mais contraste na corrente sanguínea. Estes resultados mostram a eliminação total dos contrastes da urina e do soro sanguíneo, indicando que o mFAU-2 tem eliminação relativamente rápida.

Tabela 19 – Tempo de relaxação T_1 (ms) das amostras de urina coletadas antes e depois da injeção do contraste mFAU-2.

	T_1 da urina antes da injeção (ms)	T_1 da urina 1 hora após a injeção (ms)	T_1 da urina 2 dias após a injeção (ms)	T_1 da urina 7 dias após a injeção (ms)
Animal 4	3810±90	1352±6	3800±400	3800±400
Animal 5	4400±100	2150±50	4000±100	4000±100
Animal 6	3500±200	*	3300±200	3300±200
Média	3900±500	1800±400	3700±500	3800±400
* Não foi possível coletar este dado específico. O animal urinou antes da coleta da amostra de urina.				

FONTE: Autoria própria, 2020.

Tabela 20 – Tempo de relaxação T_1 (ms) das amostras de urina coletadas antes e depois da injeção do contraste Gd-DOTA.

	T_1 da urina antes da injeção (ms)	T_1 da urina 1 hora após a injeção (ms)	T_1 da urina 2 dias após a injeção (ms)	T_1 da urina 7 dias após a injeção (ms)
Animal 1	4100±200	21.0±0.1	3600±300	4000±200
Animal 2	3810±90	12±4	*	3700±200
Animal 3	4400±100	*	4000±200	*
Média	4100±300	17±4	3800±200	3800±200
* Não foi possível coletar estes dados específicos. Não havia quantidade suficiente de urina dos animais 5 e 6 para a realização das medidas de T_1 .				

FONTE: Autoria própria, 2020.

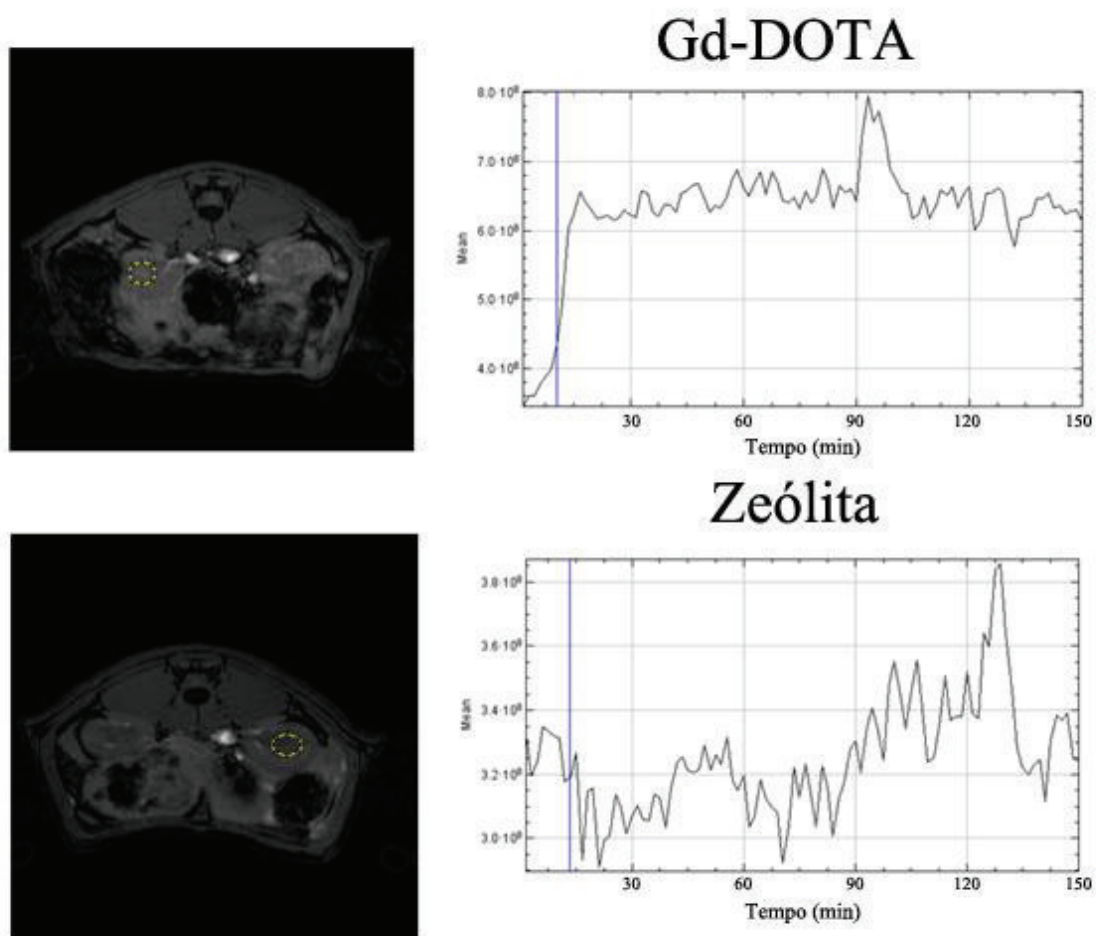
Tabela 21 – Tempo de relaxação T_1 (ms) das amostras de soro coletadas antes e depois da injeção dos contraste mFAU-2 e Gd-DOTA.

	T_1 do soro antes da injeção (ms)	T_1 do soro 1 hora após a injeção (ms)	T_1 do soro 2 dias após a injeção (ms)	T_1 do soro 7 dias após a injeção (ms)
mFAU-2	2820±50	*	2630±90	2690±20
Gd-DOTA	2970±30	*	2790±30	2230±50
* Não foi possível coletar estes dados específicos. A coleta de sangue dos ratos é procedimento muito estressante para eles e somente podia ser colhida uma vez ao dia.				

FONTE: Autoria própria, 2020.

Por último foi realizado um scan do abdômen de dois animais, este scan permite a visualização do rim ao longo do tempo. A cada um minuto e meio uma imagem foi obtida, isso foi feito ao longo de duas horas. Com isso é possível observar o contraste sendo retido pelos rins, conforme maior a quantidade de contraste recolhida maior será a intensidade do brilho neste órgão. Na figura 55 pode-se ver uma secção do abdômen do animal onde é possível visualizar os rins, um deles foi selecionado como região de interesse. Ao lado dessa imagem encontra-se o gráfico da intensidade de brilho nessa região vs. imagens obtidas ao longo do tempo. Com cerca de 10 minutos foi injetado o contraste no animal, esse momento é indicado na figura como uma linha azul. No caso em que o Gd-DOTA foi injetado houve um aumento no contraste quase que instantaneamente, o que confirma que o Dotarem é retirado da corrente sanguínea rapidamente. No caso em que a zeólita foi injetada, pode-se notar que levou muito tempo para que houvesse um aumento no contraste do rim, novamente confirmando que as zeólitas passam mais tempo na corrente sanguínea do animal antes de ser retida pelos rins para futura eliminação.

Figura 55 – Imagem do abdômen do animal e intensidade do brilho na região indicada.



FONTE: Autoria própria, 2020.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo verificar se a topologia de uma zeólita pode influenciar sua relaxividade e consequentemente seu potencial uso como agente de contraste. As conclusões derivadas do conjunto de dados experimentais apresentados anteriormente nos permite chegar às seguintes conclusões.

1. A estrutura cristalográfica de um material, principalmente as dimensões de poros e cavidades, afetam diretamente sua relaxividade. Zeólitas com maiores poros e cavidades, como é o caso da Faujasita (7,4 Å e 11,2 Å, respectivamente), apresentaram os maiores valores de relaxividade.
2. O método de incorporação do íon Gd^{3+} também afeta a relaxividade de determinado material. Métodos de troca iônica que utilizam altas temperaturas prendem o íon em cavidades menores do material, dificultando a difusão da água por essas cavidades e diminuindo a relaxividade desses materiais. Sendo assim, o ideal é incorporar o Gd^{3+} na zeólita por meio da troca iônica em solução.
3. A zeólita mFAU-2 apresenta relaxividade ($52 \pm 4 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) 10 vezes maior que o agente de contraste comercial Gd-DOTA ($5,1 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) quando medidas no equipamento de MRI de 7T.

4. Os testes *in vivo* preliminares, realizados no equipamento de MRI de 7T, mostraram que a zeólita mFAU-2 é um potencial agente de contraste, uma vez que as imagens pós-contraste apresentam vasos sanguíneos em maior quantidade e mais bem definidos que na imagem pré-contraste. Estes teste também mostraram que as imagens pós-contraste utilizando a zeólita mFAU-2 apresentam vasos sanguíneos em maior quantidade e mais bem definidos que na imagem pós-contraste utilizando o agente de contraste comercial Gd-DOTA.
5. Os teste de eliminação do contraste do corpo do animal mostram que tanto o Gd-DOTA como a mFAU-2 foram totalmente eliminados da urina e da corrente sanguíneas em até dois dias, uma eliminação relativamente rápida.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Determinar constante de dissociação do Gd^{3+} e da zeólita e comparar com a constante de dissociação do Gd^{3+} do Gd-DOTA.
2. Determinar concentração ideal de mFAU-2 a ser administrado no animal para estudos *in vivo*.
3. Determinar tempo ótimo entre aplicação da mFAU-2 e início do scan de MRI.
4. Estudos farmacocinéticos mais detalhados para determinação da meia-vida da mFAU-2 no corpo do animal e se quanto tempo depois ainda pode ser encontrada em determinados órgãos, como cérebro, rins e fígado.

REFERÊNCIAS

- 1 Young, I.R. Significant events in the development of MRI. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 20, n. 2, p. 183–186, 2004.
- 2 Damadian, R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 171, n. 3976, p. 1151–3, 1971.
- 3 Kumar, A. History of MRI. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 94, n. 4, p. 363–370, 2014.
- 4 Moser, E.; Laistler, E.; et al. Ultra-high field NMR and MRI-the role of magnet technology to increase sensitivity and specificity. **Frontiers in Physics**, v. 5, n. AUG, p. 1–15, 2017.
- 5 < <https://snc2dmri.weebly.com/components--functions.html> > Acessado em 29/10/2020.
- 6 McRobbie, D.W.; Moore, E.A.; et al. **MRI From Picture to Proton**. Cambridge University Press, 2006.
- 7 Zouridakis, G. **Biomedical Technology and Devices Handbook**. 2003.
- 8 Bushong, S.C.; Clarke, G. **Magnetic resonance imaging: physical and biological principles**. Elsevier Health Sciences, 2013.
- 9 <<https://www.medgadget.com/2018/09/philips-helium-free-mri-system-combines-productivity-with-high-quality-imaging.html>> Acessado em 31/07/2019
- 10 Mark A. Brown; Richard C. Semelka **MRI: Basic Principles and Applications**. 2010.
- 11 < <https://www.zrtlab.com/blog/archive/gadolinium-toxic-rare-earth-element/> > Acessado em 17/07/2019

- 12 Koohsaryan, E.; Anbia, M. Nanosized and hierarchical zeolites: A short review. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 4, p. 447–467, 2016.
- 13 Caldana, R.P.; Bezerra, A.S. de A.; et al. Angiografia por ressonância magnética: aspectos técnicos de um método de estudo vascular não-invasivo. **Radiol Bras**, v. 37, p. 41–50, 2004.
- 14 Ramalho, J.; Semelka, R.C.; et al. Gadolinium-Based Contrast Agent Accumulation and Toxicity: An Update. **American Journal of Neuroradiology**, 2015.
- 15 Junior, J.E.; Santos, A.C. dos; et al. Complicações do uso intravenoso de agentes de contraste à base de gadolínio para ressonância magnética. **Radiologia Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 263–267, 2008.
- 16 Idée, J.-M.; Fretellier, N.; et al. Physico-chimie et profil toxicologique d'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique, les chélates de gadolinium. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 73, n. 4, p. 266–276, 2015.
- 17 Gonçalves, M.A.; Ramalho, C.T. Contrast agents for magnetic resonance imaging: A review. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1511–1524, 2017.
- 18 Zhang, W.; Peters, J.A.; et al. Prototropic exchange governs T1 and T2 relaxivities of a potential MRI contrast agent nanozeolite Gd - LTL with a high pH responsiveness. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 9, p. 5080–5089, 2015.
- 19 Flanigen, E.M.; Broach, R.W.; et al. **Introduction**. 2010.
- 20 Masters, A.F.; Maschmeyer, T. Zeolites – From curiosity to cornerstone. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 142, n. 2–3, p. 423–438, 2011.
- 21 Cundy, C.S.; Cox, P.A. The hydrothermal synthesis of zeolites: History and development from the earliest days to the present time. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 663–701, 2003.
- 22 Thomas, A. Much ado about nothing – a decade of porous materials research. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 11–13, 2020.
- 23 IZA - International Zeolite Association. < <http://izasc-mirror.la.asu.edu/fmi/xsl/IZA-SC/ft.xsl> > Acessado em 20/11/2020.

- 24 Davis, M.E. Ordered porous materials for emerging applications. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 813–821, 2002.
- 25 Cundy, C.S.; Cox, P.A. The hydrothermal synthesis of zeolites: Precursors, intermediates and reaction mechanism. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 82, n. 1–2, p. 1–78, 2005.
- 26 Weitkamp, J. Zeolites and catalysis. **Solid State Ionics**, v. 131, n. 1–2, p. 175–188, 2000.
- 27 Ghobarkar, H.; Schäfer, O.; et al. Zeolites—from kitchen to space. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 27, n. 2–4, p. 29–73, 1999.
- 28 Moshoeshoe, M.; Nadiye-Tabbiruka, M.S.; et al. A review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolites. **American journal of Materials Science**, v. 7, n. 5, p. 191–221, 2017.
- 29 Hiratsuka, R.S.; Santilli, C.V.; et al. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química nova**, p. 171–180, 1995.
- 30 Burkett, S.L.; Davis, M.E. Mechanisms of Structure Direction in the Synthesis of Pure-Silica Zeolites. 1. Synthesis of TPA/Si-ZSM-5. **Chemistry of Materials**, v. 7, n. 5, p. 920–928, 1995.
- 31 Burton, A.W., Zones, S.I. Chapter 5 Organic molecules in zeolite synthesis: Their preparation and structure-directing effects. In: H van BAC and FS Jiří Čejka (Ed.); **Studies in Surface Science and Catalysis**. Elsevier, v. Volume 168.2007, p. 137–179.
- 32 Mercer, B.W.; Ames, L.L.; et al. Ammonia removal from secondary effluents by selective ion exchange. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. R95–R107, 1970.
- 33 Mumpton, F.A. La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3463–3470, 1999.
- 34 Onagi, T. Treating experiment of chicken dropping with zeolite tuff powder. 2. **Experimental use of zeolite tuffs as dietary supplements for chicken. Rep. Yamagata Stock Raising Inst**, p. 7–18, 1966.
- 35 Kondo, N.; Wagai, B. Experimental use of clinoptilolite-tuff as dietary supplements for

pigs. **Yotonkai, May**, p. 1–4, 1968.

36 Colella, C. A critical reconsideration of biomedical and veterinary applications of natural zeolites. **Clay Minerals**, v. 46, n. 2, p. 295–309, 2011.

37 Nayak, S.K.; Mohanty, S.R. Zeolite Synthesis from Waste and its Applications : A Retrospective. v. 4, n. 2, p. 408–423, 2019.

38 Laurenti, J.B.; Zazeri, G.; et al. Enhanced pro-coagulant hemostatic agents based on nanometric zeolites. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 239, p. 263–271, 2017.

39 Balkus, K.J., Sherry, A.D., & Young, S.W. (1992). Zeolite-enclosed transistion and rare earth metal ions as contrast agents for the gastrointestinal tract.

40 Bresinska, I.; Balkus, K.J.J. Studies of Gd (III)-exchanged Y-type zeolites relevant to magnetic resonance imaging. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 49, p. 12989–12994, 1994.

41 Young, S.W.; Qing, F.; et al. Gadolinium zeolite as an oral contrast agent for magnetic resonance imaging. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 5, n. 5, p. 499–508, 1995.

42 Rubin, D.L.; Falk, K.L.; et al. A multicenter clinical trial of Gadolite Oral Suspension as a contrast agent for MRI. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 7, n. 5, p. 865–872, 1997.

43 Tosheva, L.; Valtchev, V.P. Nanozeolites: Synthesis, Crystallization Mechanism, and Applications. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 10, p. 2494–2513, 2005.

44 Platas-Iglesias, C.; Elst, L. Vander; et al. Zeolite GdNaY nanoparticles with very high relaxivity for application as contrast agents in magnetic resonance imaging. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 8, n. 22, p. 5121–31, 2002.

45 Csajbók, É.; Bányai, I.; et al. Gadolinium (III)-Loaded Nanoparticulate Zeolites as Potential High-Field MRI Contrast Agents: Relationship Between Structure and Relaxivity. **Chemistry–A European Journal**, v. 11, n. 16, p. 4799–4807, 2005.

46 Balkus, K.J.; Bresinska, I. Molecular sieve based MRI contrast agents. **Journal of alloys and compounds**, v. 207, p. 25–28, 1994.

- 47 Yan, Y.; Shao, E.; et al. Microwave-assisted synthesis of Gd(III)-loaded nanozeolite SOD as MRI contrast agent with remarkable stability in vivo. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 20, p. 3041–3049, 2014.
- 48 Zhang, W.; Peters, J.A.; et al. Prototropic exchange governs T1 and T2 relaxivities of a potential MRI contrast agent nanozeolite Gd - LTL with a high pH responsiveness. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 9, p. 5080–5089, 2015.
- 49 Mayer, F.; Zhang, W.; et al. Nanozeolite-LTL with GdIII deposited in the large and Eu III in the small cavities as a magnetic resonance optical imaging probe. **Chemistry - A European Journal**, v. 20, n. 12, p. 3358–3364, 2014.
- 50 Pereira, G.A.; Ananias, D.; et al. NMR relaxivity of Ln³⁺-based zeolite-type materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 35–36, p. 3832–3837, 2005.
- 51 Pereira, G.A.; Norek, M.; et al. NMR Transversal relaxivity of aqueous suspensions of particles of Ln³⁺-based zeolite type materials. **Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions**, v. 9226, n. 17, p. 2241–2247, 2008.
- 52 Ministério da Saúde Avaliação de tecnologias em saúde: seleção de estudos apoiados pelo Decit. 2011.
- 53 < <https://www.tuasaude.com/ressonancia-magnetica/> > Acessado em 16/01/2018.
- 54 < https://www.cisamusep.org.br/uploads/credenciamento/86_Tabela_SUS_referencia-SETEMBRO_2019.pdf > Acessado em 12/09/2019.
- 55 < <http://redeglobo.globo.com/globociencia/noticia/2013/06/custo-e-manutencao-dos-aparelhos-de-imagem-encarecem-exames.html> > Acessado em 01/10/2019.
- 56 < https://www.diariomunicipal.sc.gov.br/arquivosbd/atos/1412703006_TABELA_Valores_CIS_Anexo_I_outubro_2014.doc > Acessado em 11/11/2020.
- 57 < <http://g1.globo.com/mato-grosso/noticia/2015/11/fila-de-espera-por-exames-pelo-sus-em-cidade-de-mt-tem-2-mil-pessoas.html> > Acessado em 16/06/2019.
- 58 < http://www.jornalnh.com.br/_conteudo/2016/03/noticias/regiao/304227-pacientes-chegam-a-aguardar-dois-anos-por-exames-pelo-sus.html > Acessado em 16/01/2018.

- 59 Zhan, B.-Z.; White, M.A.; et al. A novel, organic-additive-free synthesis of nanometer-sized NaX crystals. **Chemical Communications**, n. 13, p. 1176–1177, 2001.
- 60 Cambor, M.A.; Corma, A.; et al. Synthesis of nanocrystalline zeolite beta in the absence of alkali metal cations. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 105, p. 341–348, 1997.
- 61 Dwyer, F.G. & Jenkins, E.E. (1976). Crystalline Silicate and Method of Preparing the Same. (9) .
- 62 Zhang, L.; Laak, A.N.C. van; et al. Synthesis of large mordenite crystals with different aspect ratios. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 126, n. 1–2, p. 115–124, 2009.
- 63 Biemmi, E.; Bein, T. Assembly of nanozeolite monolayers on the gold substrates of piezoelectric sensors. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 11196–11202, 2008.
- 64 Larlus, O.; Mintova, S.; et al. A powerful structure-directing agent for the synthesis of nanosized Al-and high-silica zeolite Beta in alkaline medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 142, n. 1, p. 17–25, 2011.
- 65 Hincapie, B.O.; Garces, L.J.; et al. Synthesis of mordenite nanocrystals. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 67, n. 1, p. 19–26, 2004.
- 66 Karge, H.G. solid-state Reactions of Zeolites. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 83, p. 135–146, 1994.
- 67 Bilgen, M.; Dogan, B.; et al. In vivo assessment of blood-spinal cord barrier permeability: serial dynamic contrast enhanced MRI of spinal cord injury. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 20, n. 4, p. 337–341, 2002.
- 68 Frank, S.J.; Stafford, R.J.; et al. A Novel MRI Marker for Prostate Brachytherapy. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 71, n. 1, p. 5–8, 2008.
- 69 Cejka, J. Corma, A. Schueth, F. Introduction to Zeolite Molecular. In: **Introduction to Zeolite Molecular Sieves**. Elsevier Science, 2007, p. 81.
- 70 Peters, J.A.; Djanashvili, K. Lanthanide Loaded Zeolites, Clays, and Mesoporous Silica Materials as MRI Probes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 12, p. 1961–1974, 2012.

- 71 Diehl, K.H.; Hull, R.; et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15–23, 2001.
- 72 Song, X.-X.; Liu, Z.-J.; et al. Folate grafted Prussian Blue entrapped with gadolinium(III) as a new contrast agent for tumor-targeted magnetic resonant imaging. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, 2013.
- 73 Giorgi, H.; Ammerman, J.; et al. Non-clinical safety assessment of gadoterate meglumine (Dotarem®) in neonatal and juvenile rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 960–970, 2015.

ANEXO A – Manuscrito Submetido ao Journal of Biomedical Materials – Part B

In vitro and in vivo comparative performance studies of gadolinium-loaded zeolites and Gd-DOTA as contrast agents for MRI applications

Abstract

Gadolinium-based contrast agents were synthesized using faujasite zeolite (NaX) and zeolite Beta (BEA) and their performances *in vitro* and *in vivo* were compared to the widely used commercial contrast agent, gadoteric acid (Gd-DOTA). Magnetic resonance imaging (MRI) relaxometry studies (considering longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times) were performed using gadoteric acid and the zeolitic materials loaded with Gd^{3+} . The Gd-loaded NaX, which presented large pores and cavities (7.35 Å and 11.24 Å, respectively), exhibited relaxivity values of around $52 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, while BEA, which presented smaller pore and cavity diameters (5.95 Å and 6.68 Å, respectively) showed lower relaxivity values of $\sim 4.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. The effect of the Gd-loaded NaX as MRI contrast agent was tested *in vivo* in Sprague-Dawley rats, employing a 7T tomógrafo, with comparison to Gd-DOTA MRI angiography. The relaxivity measurements showed that the Gd-loaded NaX ($50 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) provided better image contrast than Gd-DOTA ($5.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Clearance studies of the contrast agents using urine and blood showed that both Gd-loaded NaX and Gd-DOTA were eliminated from the body after two days, demonstrating the potential of Gd-loaded NaX for

use as an MRI contrast agent.

Keywords: Contrast agent, gadolinium, zeolite, Gd-DOTA, relaxivity.

1. Introduction

Magnetic resonance imaging (MRI) is extensively used as a non-invasive medical diagnostic procedure, due to its ability to visualize different soft tissues with high contrast [1]. In order to improve sensitivity and specificity, contrast agents (CAs) are used [2]. Most of the contrast agents are based on paramagnetic metal ions such as gadolinium (Gd^{3+}), which act to decrease relaxation times. These metal ions are often bound to large molecules, in order to reduce toxicity. Zeolites have attracted attention as possible binding molecules, due to their pores and cavities, as well as the presence of cations that can be substituted by paramagnetic ions [2]. There are around 250 zeolites [3], most of them composed by silicon and aluminium tetrahedral structures. Each zeolite has a different combination of these tetrahedrals, resulting in a particular pore structure that influences the relaxivity [4]. Among all these zeolites, only four have been extensively tested as CAs: faujasite (NaY type) [5–11], Zeolite A (LTA) [10], sodalite (SOD) [12], zeolite LTL [13–15], and the zeolite type OPT material AV-9 [16,17]. In principle, many zeolite structures could be used for producing MRI contrast agents, among them zeolite Beta [18,19].

The first time that zeolites were suggested as contrast agents (CAs) was in 1992, when Balkus [20] proposed the use of several zeolite-enclosed transition ions as CAs for the gastrointestinal (GI) tract. Some examples of zeolites incorporating Gd^{3+} or Mn^{2+} ions are NaX, NaY, CaA, ZSM-5, and mordenite. Compared to the paramagnetic iron oxide CAs, Gd-loaded zeolites were preferred, because the T_1 -weighted images appear hyperintense at the site of accumulation, making it easier to distinguish healthy tissue from pathology. In contrast, the administration of iron oxide CAs results in hypointense regions, which makes it difficult to visualize pathology. The NaY type faujasite zeolite was used to produce Gadolite, an oral

positive MRI contrast agent for the GI tract [5]. Gadolite was clinically tested and was shown to be safe for patients, so in around 1996, it was approved for clinical use in the US and Europe [6,7].

During the 1990s, there was the development of the synthesis of nanozeolites with reduced sizes (diameter <200 nm), resulting in modified physical-chemical characteristics. The greater external surface area increases the diffusion of water molecules through the structure [8], consequently increasing proton relaxivity, which is desirable for CAs.

The first study involving nanozeolite-based CAs was published in early 2000 by Peters and collaborators [9], when Gd^{3+} -containing nanozeolite NaY was used in aqueous suspension. This material had much higher relaxivity values, compared to Gadolite, and due to its reduced diameter it was proposed as a CA for the intravascular system [9,10]. These studies also proposed a two-step model considering that there is a concentrated solution of Gd^{3+} inside the zeolite, which exchanges with bulk water outside the zeolite, by means of diffusion [2]. In the first step, only the relaxivity inside the zeolite cavity is considered, and the interior of the zeolite is treated as a highly concentrated aqueous solution of Gd^{3+} , in which water molecules in the first coordination sphere of Gd^{3+} ions exchange with free water molecules inside the zeolite. In the second step, the exchange of water is considered between the inside of the zeolite and the bulk by diffusion through the zeolite channels. This step enables the propagation of the relaxation enhancement from the interior of the material to the bulk water outside. Briefly the two-steps mechanism demonstrate that the Gd^{3+} ion is immobilized in the interior of the zeolite and that the relaxivity is mainly limited by the relatively slow diffusion of water protons from the pores of the zeolite channels into the bulk water [2].

This led to the conclusion that faster diffusion of water improved the relaxation rate enhancement. It was also shown that when the Gd^{3+} -containing zeolite was heated to

temperatures higher than 200 °C, the ion moved irreversibly from the supercage to the sodalite cage or its hexagonal entrance, reducing the interaction of the paramagnetic ion with the bulk water, which reduced the relaxivity values [10,11].

In vitro studies with sodalite (SOD) nanozeolite [12] showed that the Gd^{3+} ions were located inside β cages and that the longitudinal relaxivity (r_1) values were higher when the Gd^{3+} ions filled the cages closer to the surface of the SOD. *In vivo* studies [12] using Kunming mice showed higher contrast enhancement in the liver, low toxicity, and high stability.

An *in vitro* study of Gd-loaded LTL nanozeolite [15] showed that the relaxivity values (r_1 and r_2) were pH dependent, making it an excellent contrast agent for visualizing tumours. Another *in vitro* study involving LTL nanozeolites [14] inserted Gd^{3+} ions in the large channel-like cavities and Eu^{3+} ions in small cages. In this way, the Gd^{3+} conferred magnetic properties and the Eu^{3+} provided photophysical properties for this zeolite, making it an interesting candidate for a bimodal optical/MRI probe.

The Ln^{3+} -based zeolite type material AV-9 consists of microparticles that have paramagnetic properties, due to the Ln^{3+} ions incorporated in the framework. *In vitro* studies with this material [16,17] showed that it presented problems related to its stability in solution, because of its size, and that the ions had little effect on longitudinal relaxivity, but led to high transverse relaxivity values.

This work explored the use of faujasite zeolite (FAU) and zeolite Beta (BEA) as carriers of Gd^{3+} ions, using different methods of ion exchange. The FAU framework has the SiO_4 and AlO_4 tetrahedra assembled in sodalite units (or β -cages): truncated octahedra with six four-membered and eight six-membered rings on their surface. Eight such sodalite units are interconnected through six-membered oxygen bridges (hexagonal prisms). The resulting void space forms spherical supercages (or α - cages) with a free diameter of about 11.8 Å, which

are tetrahedrally connected to each other through windows of 12- membered rings with an open diameter of about 7.4 Å to form a diamond-like cubic lattice [2,3].

The framework structure of zeolite Beta (BEA) is built up by different three polymorphs: polymorph A (space group $P4_122$, $a = 12.632$ Å and $c = 26.186$ Å), polymorph B (space group $C2/c$, $a = 17.896$ Å, $b = 17.920$ Å, $c = 14.328$ Å, and $\beta = 114.8^\circ$), and polymorph C (space group $P4_2/mmc$, $a = 12.769$ Å and $c = 12.977$ Å). These different polymorphs are built from different stacking of the same building layer which result in a complex three-dimension intersecting channel system: two mutually perpendicular straight channels, each with a cross section of 0.76 x 0.64 nm, run in the a- and b-directions. A sinusoidal channel of 0.55 x 0.55 nm runs parallel to the c-direction [3,19].

Evaluation was made of the longitudinal relaxivity (r_1) values, in order to determine whether the relaxivity was influenced by the framework or the method of incorporation of Gd^{3+} . In addition to traditional ion exchange in solution, solid state ion exchange was also investigated, where the Gd^{3+} ion was dehydrated, making it smaller and facilitating its incorporation in different frameworks. These materials were studied at the micrometric and nanometric scales, in order to determine whether their size also influenced the relaxivity values. The longitudinal relaxivity values were also calculated for gadoteric acid (Gd-DOTA), a commercial contrast agent, for the purpose of comparison with the materials developed in this work.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of the zeolites

The syntheses of the NaX and BEA zeolites at micrometric and nanometric scales were performed using methods adapted from the literature [21–23]. The faujasite zeolite was synthesized according to the procedure described by Zhan et al. [21]. For this, sodium hydroxide (NaOH, 5.34 g, 0.13 mol) was solubilised in distilled water (H_2O , 50 g, 2.8 mol),

followed by the addition of sodium aluminate (NaAlO_2 , 2.42 g, 0.03 mol), while the solution was stirred. Subsequently, fumed silica (SiO_2 , 3.43 g, 0.06 mol) was added to the solution. The gel, with pH ~ 13 , was transferred to a hydrothermal reactor and heated at 90 °C for 4 days for the synthesis of faujasite zeolite in micrometric scale (mFAU); and for the synthesis of faujasite zeolite in nanometric scale (nFAU), the gel (pH ~ 13) was maintained under magnetic stirring at 60 °C for 48 h. During this time, the zeolitic material was formed. The zeolite Beta at the micrometric scale (mBEA) was synthesized according to the procedure described by Cambor et al. [22]. Two solutions were prepared for the synthesis. The first was produced using tetraethylammonium hydroxide (TEAOH (20%), 44.8 g, 0.3 mol), sodium chloride (NaCl , 0.132 g, 0.003 mol), and potassium chloride (KCl , 0.36 g, 0.005 mol), which were mixed and stirred until complete dissolution. Fumed silica (SiO_2 , 7.38 g, 0.12 mol) was then added to the first solution and the mixture was homogenised. For the second solution, distilled water (H_2O , 5 g, 0.27 mol), sodium hydroxide (NaOH , 0.0825 g, 0.002 mol), and sodium aluminate (NaAlO_2 , 0.4475 g, 0.005 mol) were stirred together until complete dissolution. Solution 1 was added to solution 2, with stirring for 10 min until the formation of a dense gel. Finally, the gel (pH ~ 13.5) was transferred to a hydrothermal reactor and heated at 135 °C for 20 h, resulting in formation of the solid zeolitic material. The zeolite beta at the nanometric scale (nBEA) was synthesized according to the procedure described by Larlus et al. [23]. Firstly, tetraethylammonium hydroxide (TEAOH (20%), 67.86 g, 0.15 mol) was mixed with aluminium isopropoxide ($\text{Al}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_3$, 0.94 g, 0.004 mol), under stirring for 1 h at room temperature, followed by the addition of fumed silica (SiO_2 , 11.18 g, 0.19 mol). The gel (pH ~ 14) was maintained under magnetic stirring at room temperature for 12 h, followed by heating in a hydrothermal reactor at 140 °C for 5 days. The materials were submitted to a purification and washing process, including the removal of the mother water and redispersion in distilled water (3 times), using an ultrasonic bath, after which the

materials were dried in an oven at 60 °C for 10 h. The zeolites Beta were also subjected to a calcination process at 600 °C for 8 h, in order to remove the organic template.

2.2. Ion exchange

Different ion exchange methods (Table 1) were tested in order to define the best conditions to obtain high relaxivity. The first three methods involved ion exchange in solution [5,10], where the zeolite was dispersed in deionized water, the pH of the dispersion was adjusted to 5.5 with HCl (0.1 M), GdCl₃ was mixed with the solution, and the mixture was maintained at 25 °C (method 1) or 80 °C (method 2), under stirring for 12 h. In method 3, the dispersion of zeolite and GdCl₃ was transferred to a hydrothermal reactor and heated in an oven for 12 h at 80 °C. The other three methods involved solid-state ion exchange [24], where the zeolite was ground with the GdCl₃ and then transferred to the oven, with heating at 580 °C, under an atmosphere of N₂, for three different times (2, 4, and 6 h). For each zeolite, the proportion of GdCl₃ was calculated in order to have 1 ion of Gd³⁺ available for 3 ions of aluminium in the zeolite. Table 1 shows the parameters for each method of ion exchange. The materials obtained were labelled according to the scale, framework, and method of ion exchange. For example, the BEA at the nanometric scale, submitted to ion exchange method 4, was denoted nBEA-4.

Table 1. Description of the ion exchange methods.

Method code	Method description			Temperature	Time
1	Solution	Stirring (400 rpm)	1 atm	25 °C	12 h
2				80 °C	
3		Static	Auto-generated pressure		
4	Solid state		N ₂ atmosphere	580 °C	2 h
5					4 h
6					6 h

2.3. Characterization

All the polycrystalline samples were characterized by X-ray diffraction (XRD), using a MiniFlex II instrument (Rigaku, Tokyo, Japan) equipped with a graphite monochromator and a rotating anode source with flat plate Bragg-Brentano geometry, operating with Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), at 40 kV and 40 mA. The powder diffraction patterns were recorded in the 2θ range from 3° to 50° , with a goniometer scanning speed of $2^\circ (2\theta) \text{ min}^{-1}$. SEM images were recorded using an XL30 FEG instrument (FEI/Philips), at DEMa/UFSCar, with deposition of a thin coating of gold onto the samples prior to the analyses. AFM analyses were performed at the Brazilian National Nanotechnology Laboratory (LNNano, Campinas). The data were collected using a Dimension 3000 scanning probe microscope (SPM) equipped with a Nano-ScopeIIIa SMP controller (Digital Instruments Inc.). Tapping mode AFM images were acquired in ambient air, using TESP tapping mode etched silicon probes. Elemental chemical analyses of Si, Al, Na, and Gd in the zeolites were performed by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES), at the Chemical Analysis Laboratory Facilities of São Paulo University (USP).

2.4. Relaxivity studies

The relaxivity studies were based on the published literature [5,12]. Zeolites exchanged with Gd $^{3+}$ ions were mixed into a solution of agarose (0.5%), with ultrasonication for 5 min to disperse the particles. This solution was used to prepare five 1 mL samples with different concentrations of zeolite (from 0.1 to 0.5%). Longitudinal and transverse relaxation times (T_1 and T_2) were measured for every concentration of each solution, at 36°C , using a 7T spectrometer (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Germany), with an inversion recovery spin echo sequence, varying the inversion time (TI), but keeping the repetition time (TR) fixed at 10 s (TR = 10000 ms; TE = 1100 ms; TI = 10000, 5000, 2500, 1000, 400, and 200 ms; slice thickness = 5 mm; matrix = $1 \times 3 \times 3$). The longitudinal relaxivity, r_1 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, per

Gd³⁺ ion concentration), is defined as the slope of the plot of $1/T_1$ against the concentration of Gd³⁺ ions.

2.5. Contrast solution preparation for animal studies

For administering to the animals, the contrast agent was prepared by dispersing 0.1 mmol of the ion exchanged zeolites (mNaX-2) in 10 mL of saline solution, with adjustment to pH 7 by adding drops of sodium hydroxide solution.

2.6. MRI angiography

The performance of the contrast agents was evaluated using two healthy female Sprague-Dawley rats weighing between 200 and 250 g. Since these were healthy animals without any pathology, it was decided to test the performance of the contrast agents on the vasculature, since contrast agents are known to improve visualization of the blood vessels. One animal received an intraperitoneal injection of the Gd-zeolite, while the other one received an intraperitoneal injection of the commercial Gd-DOTA contrast agent (Dotarem, Guerbet LLT), serving as a control. The animals were firstly anesthetized with 4% isoflurane and were then maintained under anesthesia with a mixture of 2% isoflurane, air, and oxygen, administered using a rodent ventilator (Model 683, Harvard Apparatus, South Natic, MA) during the entire MRI scanning procedure. The body temperature of the animals was maintained at 35 °C by circulating warm air through the animal holder during the MRI scans. There was strict adherence to the NIH guidelines for humane treatment of these animals.

The *in vivo* MRI studies were performed using a 7T spectrometer (BioSpec 70/30 USR, Bruker, Karlsruhe, Germany), with a transmit/receive head coil for the imaging. The procedures were performed as described by Narayana et al. [25,26]. A pre-contrast agent MR angiogram was acquired using a 3D TOF protocol, with the following parameters: repetition time of 10.9 ms and echo time of 3.4 ms; 180 sections with 0.147 mm thickness and 0.147 mm separation between consecutive sections; field of view of 16 x 11.6 mm; matrix of 180 x

3 x 3. The total acquisition time was 24 min. After obtaining the pre-contrast agent MR angiogram, the contrast agent was injected into the peritoneum using a catheter attached to a syringe, with a silicone tube long enough to allow administration of the contrast agent without moving the animal bed during the procedure. Immediately after administration of the contrast agent, new MR angiograms were acquired several times, with identical geometry and scan parameters. The total scan time for an MR angiogram was 96 min. The first animal received 0.04 mmol/kg of mNaX-2 and the second animal received 0.2 mmol/kg of Gd-DOTA.

2.7. Contrast agent clearance

The clearance of the contrast agent from the animals was evaluated using six female Sprague-Dawley rats weighing between 200 and 250 g. The animals were divided into two groups of three individuals. One group received an intraperitoneal injection of the Gd-zeolite, while the other group received an intraperitoneal injection of Gd-DOTA (Dotarem, Guerbet LLT) and served as a control. Urine and blood were collected from each animal before injection of the contrast agent and then at 1 h, 2 days, and 7 days after administration of the agent. The longitudinal relaxation time of each sample was obtained as a measure of the contrast agent concentration, using the same method described in Section 2.4.

3. Results

3.1. Synthesis and characterization of the exchanged zeolites

The XRD patterns (Fig. 1) of the synthesized zeolites were in agreement with the patterns reported in the literature [21–23], confirming that the synthesized zeolites had the desired framework and dimension, as well as high crystallinity. The diffractograms for the nNaX and nBEA samples presented broader and less intense peaks, compared to the mNaX and mBEA samples. A typical micrograph of mNaX (Fig. 2A) shows crystal particles with hexagonal morphology and particle size in the range 1-3 μm . The mBEA SEM image (Fig. 2C) shows that most particles presented square morphology and sizes in the range 1-2 μm .

The SEM and AFM images of the nanometric materials (Figs. 2B, 2D, and 3) showed crystal particles smaller than 100 nm, which were interconnected to form agglomerates.

Figure 1. X-ray diffractograms of the synthesized materials.

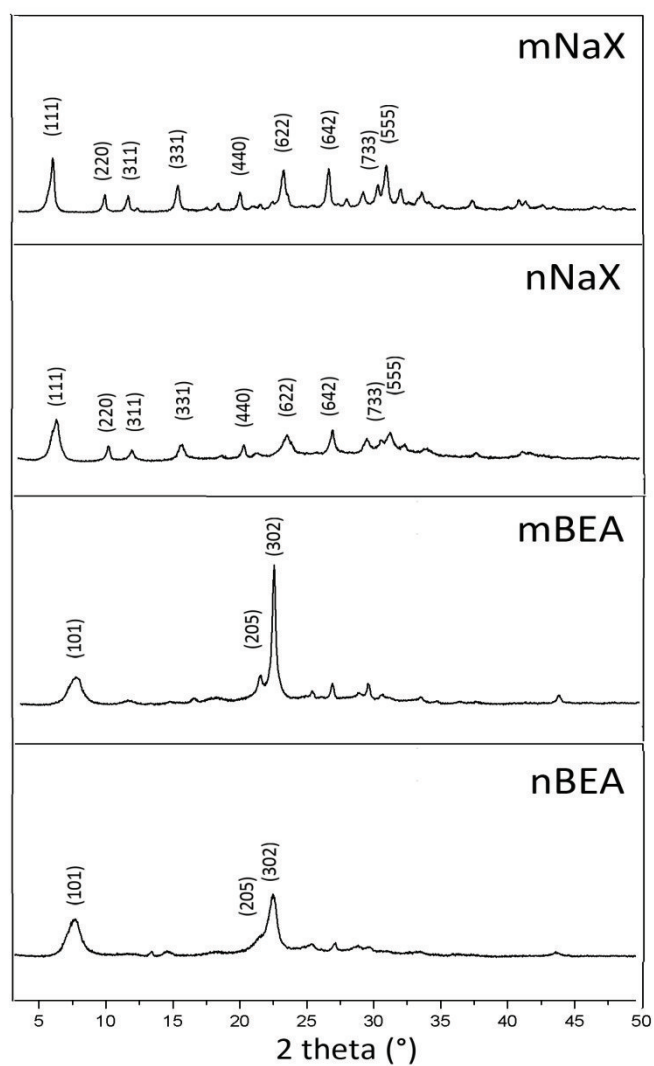


Figure 2. SEM images of A) mNaX, B) nNaX, C) mBEA, and D) nBEA.

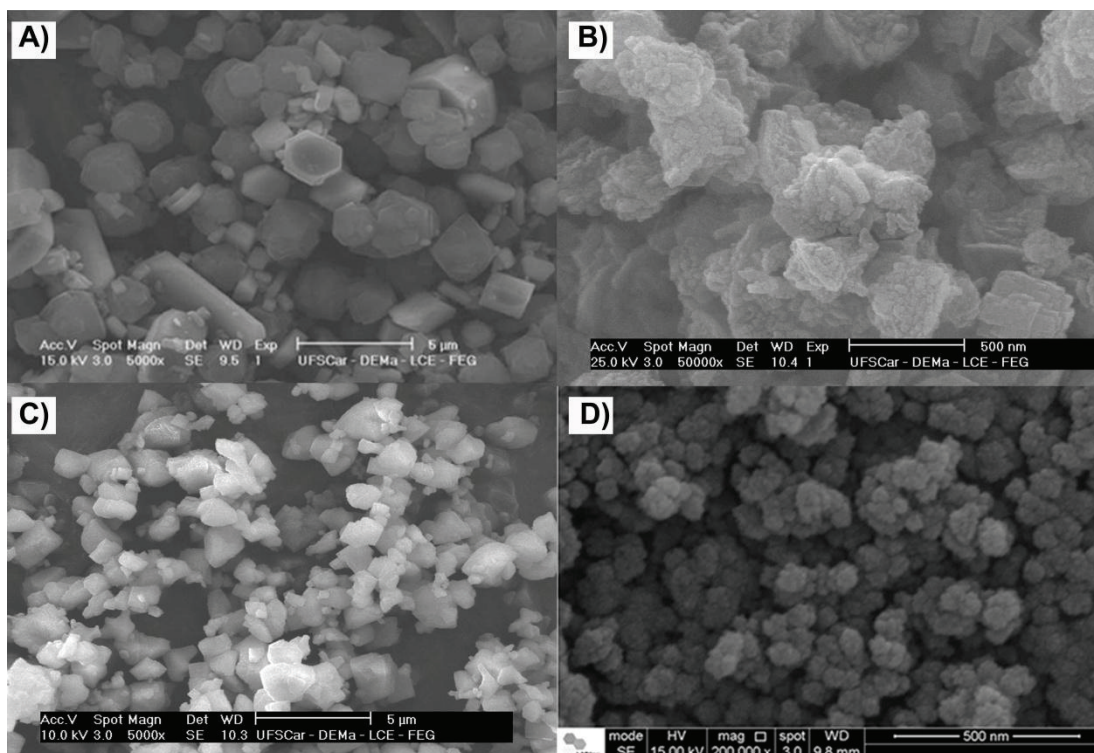
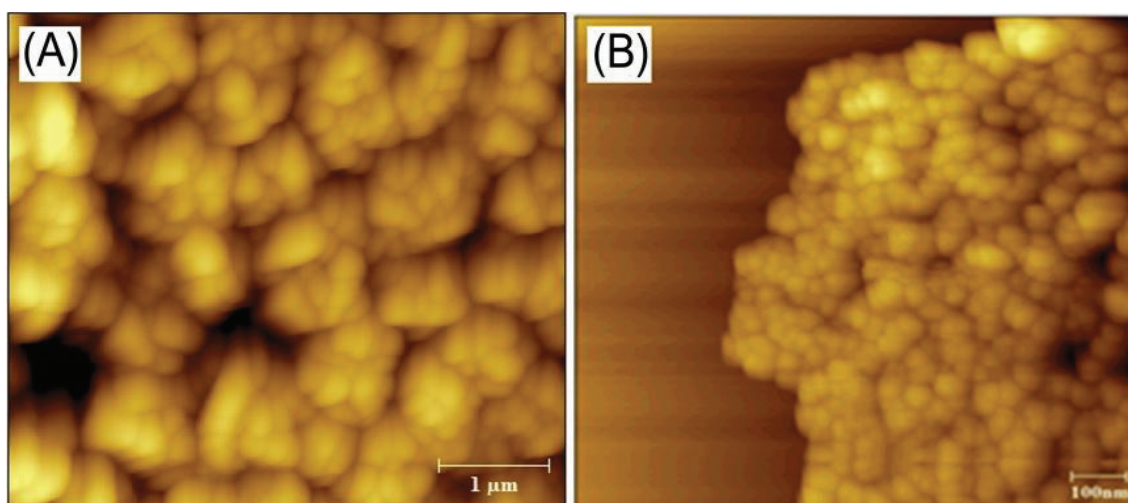


Figure 3. AFM images of (A) nNaX and (B) nBEA.



Some of the materials required organic molecules as templates for their synthesis. Consequently, these materials were submitted to a calcination process, in order to remove the organic molecules from the frameworks. X-ray diffractograms acquired after calcination (Fig. 4) showed that the frameworks were not degraded during the process. The diffractograms of the zeolites before and after each method of ion exchange are shown in Figure 5.

Figure 4. X-ray diffractograms acquired before and after the calcination process.

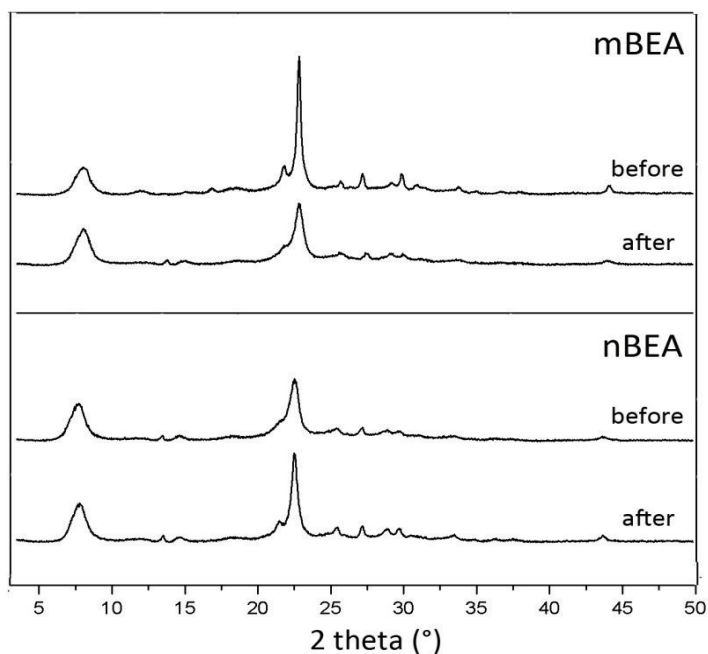
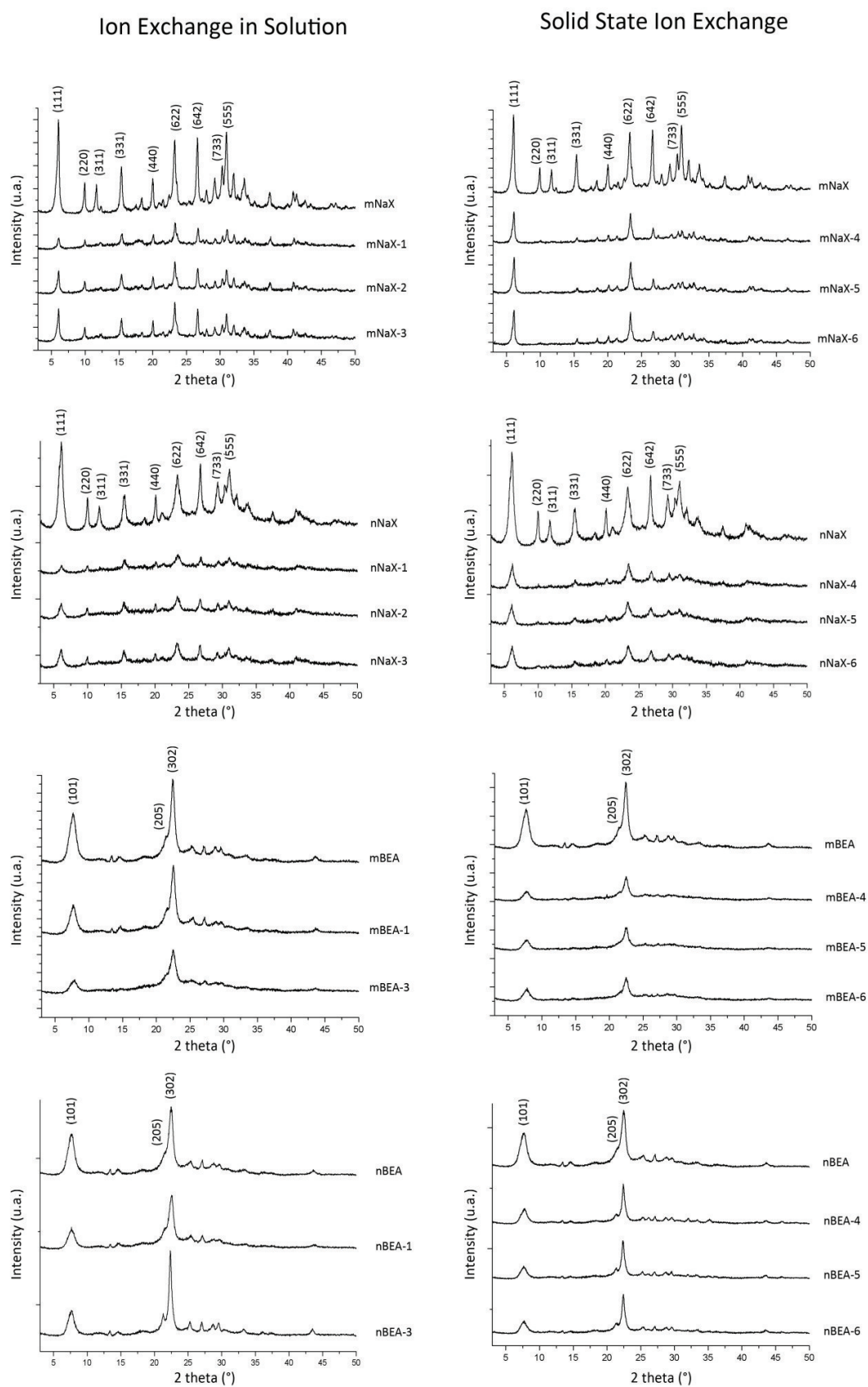


Figure 5. X-ray diffractograms of the zeolites before and after the ion exchange procedures.

3.2. Relaxivity determinations

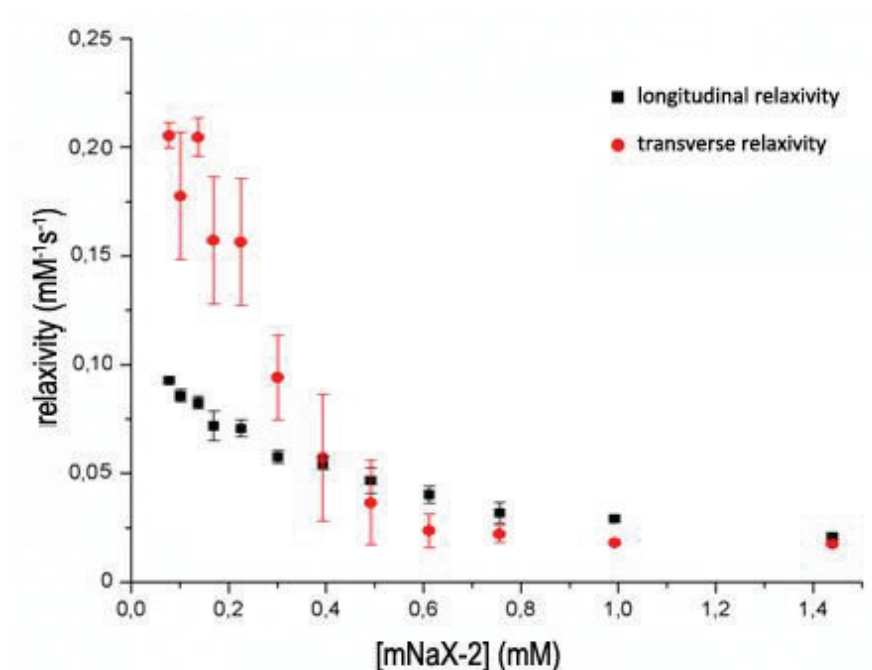
Measurements were made of the longitudinal relaxivities (r_1) of the micrometric and nanometric NaX zeolites subjected to the different ion exchange processes. The results are summarized in table 2. The longitudinal relaxivity (r_1) of mBEA-2 is $4.8 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Table 2. Longitudinal relaxivities (r_1 , in $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) of the NaX zeolites tested using a 7T MRI spectrometer.

Ion exchange temperature	25 °C, 1 atm	80 °C, 1 atm	580 °C, 1 atm
mNaX	33 ± 5	52 ± 4	30 ± 1
nNaX	3.81 ± 1	13.0 ± 0.8	8.9 ± 0.6

The micrometric NaX prepared in solution at 80 °C (mNaX-2) showed the best relaxivity results, so it was selected for use in the *in vivo* studies and was compared with the commercial Gd-DOTA contrast agent. Firstly, the Gd^{3+} content was determined by ICP-OES, with the degree of exchange expressed using the molar ratio $3\text{Gd}/\text{Al}$, because the amount of Al remained constant and one Gd^{3+} ion balanced three negative charges ($(\text{AlO}_4)^{-1}$). The $3\text{Gd}/\text{Al}$ ratio was 1 when all the counterions were exchanged by Gd^{3+} ions. For the mNaX-2 sample, $3\text{Gd}/\text{Al}$ was 0.12 ± 0.01 . Another analysis performed was measurement of the longitudinal and transverse relaxivities (r_1 and r_2) for dispersions with different concentrations of mNaX-2 in saline solution at 37 °C (Fig. 6).

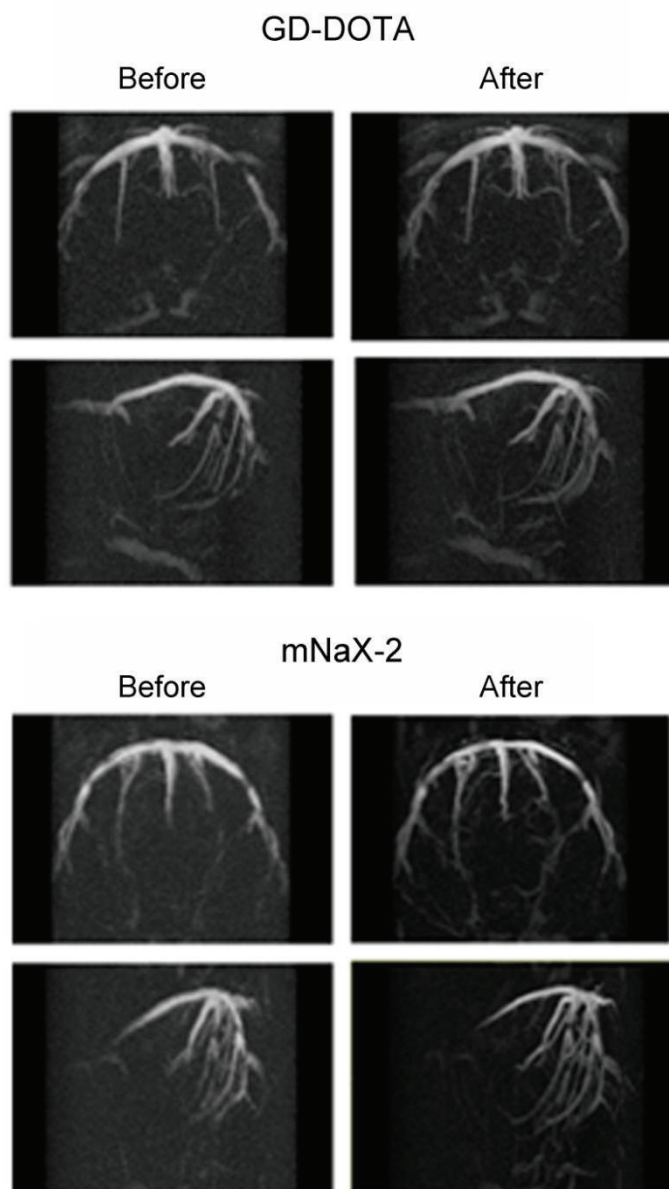
Figure 6. Plot of r_1 (squares) and r_2 (dots) according to the concentration of mNaX-2 in saline solution.



3.3. MRI *in vivo* using mNaX-2

The effect of the Gd-exchanged zeolite mNaX-2 on longitudinal relaxivity was evaluated *in vivo* by magnetic resonance brain angiography using two Sprague-Dawley rats. One of the animals received 0.04 mmol/kg of the zeolite-based contrast agent, while the other received 0.2 mmol/kg of Gd-DOTA. Since the zeolite-based contrast agent had a high relaxation value, it was unnecessary to administer the same concentration as Gd-DOTA. For both rats, angiograms were acquired before and after administration of the contrast agent and the images are presented in Figure 7.

Figure 7. Magnetic resonance images of the rat brains before and after the administration of 0.2 mmol/kg of Gd-DOTA or 0.04 mmol/kg of mNaX-2. The images acquired after administration of the contrast agents show more blood vessels, indicating the effectiveness of the agents in reducing the longitudinal relaxation times.



3.4 Clearance of mNaX-2

In order to determine the duration of retention of the contrast agents the longitudinal relaxation times (T_1) of urine and blood collected before and after the contrast agent administration. The results of these measurements are summarized in Tables 3-5.

Table 3. Relaxation times (T_1) for urine samples collected before and after injection of the mNaX-2 contrast agent.

	T_1 of urine before injection (ms)	T_1 of urine 1 hour after injection (ms)	T_1 of urine 2 days after injection (ms)	T_1 of urine 7 days after injection (ms)
Animal 1	3810±90	1352±6	3800±400	3800±400
Animal 2	4400±100	2150±50	4000±100	4000±100
Animal 3	3500±200	*	3300±200	3300±200
Mean	3900±500	1800±400	3700±500	3800±400
* It was not possible to obtain this data point, because the animal urinated before collection of the urine sample.				

Table 4. Relaxation times (T_1) for urine samples collected before and after injection of the Gd-DOTA contrast agent.

	T_1 of urine before injection (ms)	T_1 of urine 1 hour after injection (ms)	T_1 of urine 2 days after injection (ms)	T_1 of urine 7 days after injection (ms)
Animal 4	4100±200	21.0±0.1	3600±300	4000±200
Animal 5	3810±90	12±4	*	3700±200
Animal 6	4400±100	*	4000±200	*
Mean	4100±300	17±4	3800±200	3800±200
* It was not possible to obtain these data points, because there was insufficient urine from animal 5 to perform the measurements and animal 6 urinated before collection of the urine.				

Table 5. Relaxation times (T_1) for serum samples collected before and after injection of the contrast agents.

	T_1 of serum before injection (ms)	T_1 of serum 1 hour after injection (ms)	T_1 of serum 2 days after injection (ms)	T_1 of serum 7 days after injection (ms)
mNaX-2	2820±50	*	2630±90	2690±20
Gd-DOTA	2970±30	*	2790±30	2230±50
* It was not possible to obtain these data points, because blood collection is highly stressful to rats, so only one blood sample was collected per day.				

4. Discussion

The XRD patterns (Fig. 1) and SEM and AFM images (Fig. 2 and 3) confirm that the synthesized materials have the desired structure and dimension. The diffractograms of the zeolites were the same before and after each method of ion exchange (Fig. 5), indicating that the zeolite framework was unchanged, even after exposure to the high temperatures of the solid-state ion exchange process. The diffractogram of Gd_2O_3 presents four main reflections, corresponding to the (222), (400), (440), and (622) crystal lattice planes [27], while none of the materials showed these four reflections after the ion exchange, indicating that there was no formation of Gd_2O_3 .

The diffractograms for the micrometric and nanometric NaX submitted to the ion exchange in solution (methods 1-3) showed a substantial decrease of the (311) plane reflection ($2\theta = 12^\circ$). Before the ion exchange, the (111) plane reflection ($2\theta = 6^\circ$) was the most intense peak, but afterwards its intensity was comparable to those of the (331) and (440) reflections. Changes were also observed in the diffractograms of the NaX submitted to solid-state ion exchange (methods 4-6), with lower intensity and broadening of the peaks corresponding to hkl reflections (220), (311), (331), and (440) (between 2θ of 6° and 23°),

while the (111) and (622) reflection peaks were the most intense and were almost the same. The BEA diffractograms revealed that after all the ion exchange methods, there was decreased intensity of the (101) reflection ($2\theta = 7^\circ$). For the nanometric scale BEA, the diffractograms exhibited sharper peaks for the (205) and (302) plane reflections ($2\theta = 21^\circ$ and 22.5°) after the ion exchange than before, especially for methods 3 to 6, where these peaks in the diffractograms no longer overlapped. These changes of intensity provided evidence of the introduction of Gd^{3+} ions into the crystallographic structures of the NaX and BEA zeolites after the ion exchange.

In vitro measurements were made of the longitudinal relaxivities (r_1) of the micrometric and nanometric NaX zeolites subjected to the different ion exchange processes. The results showed that the temperature of the ion exchange affected the relaxivity of the materials (Table 2), with higher r_1 at 80°C than at room temperature or 580°C . At 80°C , the ion exchanges were performed at atmospheric pressure and under autogenous pressure, with comparable relaxivity values obtained (for mNaX, $r_1 = 52 \pm 4$ and $55.2 \pm 0.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively).

Another variable evaluated was the scale of the zeolites. Nanozeolites were previously suggested as contrast agents [9] due to their small size and easier diffusion of water molecules through the cavities containing the Gd^{3+} ions, since greater proximity to the bulk water outside the zeolite would increase the relaxivity values. However, in the present work, the opposite behaviour was observed (Table 2). It is quite possible that the low relaxivity value observed in our studies for the nanometric NaX is caused by formation of agglomerates as shown by the SEM and AFM data (Figs. 2B, 2D, and 3). The formation of these agglomerates can preclude or induce a slow diffusion of water protons from the pores of the zeolite channels into the bulk water, therefore affecting the relaxivity of the nNaX in comparison with the mNaX as predicted by the two-steps model [2].

The results also showed that the NaX framework presented higher relaxivity (52 ± 4

$\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) than the BEA framework ($4.8 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$). In this case, the higher relaxivity observed for mNaX in comparison with mBEA can be attributed to the different channel structures of both zeolites. In principle, the three-dimensional intersecting channel system of zeolite Beta (BEA) is a direct result of the crystallographic faulting of the three polymorphs. This disordered stacking of layers could partially obstruct the exchange of water protons located inside of the zeolite and the bulk water by diffusion through the two perpendicular straight channels and the sinusoidal one. This could explain the a drastic decrease in the relaxivity value of the mBEA ($4.8 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) in comparison with the mNaX ($52 \pm 4 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) as observed in this study.

Many studies reported in the literature concerning the application of the zeolite faujasite (FAU) to magnetic resonance imaging corroborate the relaxivity values obtained in this study [2,9,10]. The authors concluded that zeolite faujasite (FAU) with pores diameter of **7.35 Å** provided sufficient space for diffusion of the hydrated Gd^{3+} ions (**6.36 Å**) during the ion exchange through the sodalite cage, hexagonal prism, and supercage cavities. Furthermore, the supercages with diameter of **11.2 Å** were sufficiently large to contain Gd^{3+} ions and still allow high diffusion of water molecules (**2.75 Å**) from the interior of the zeolite cavities towards the bulk water, making it possible to achieve high relaxation values [2,9].

It is worth to notice that throughout the literature, zeolite NaY was also studied with the purpose of magnetic resonance imaging application [28]. Both zeolites NaY and NaX have the same faujasite-type framework (FAU) and a three dimensional pore system with their differences being based on the silica content. For NaY, the Si/Al ratio is higher than 1.5, while NaX presents values between 1 and 1.5. Nevertheless, both zeolites showed high relaxivity values, which corroborate the relevance of the framework topology and channel system in the two-steps model for enhancement of the relaxivity parameters [2,9].

Differently from the BEA zeolite, which has smaller pores (**5.95 Å**) and cavities (**6.68**

Å) than NaX, this slows down the diffusion of water and limits the relaxivity to lower values. The solid-state ion exchange process was used to try to find a solution to the problem of the size of the pores of BEA, by incorporating dehydrated Gd^{3+} ions (**1.88 Å**) into the framework. However, due to the high energy involved in this process, the Gd^{3+} ions became trapped inside the small cavities of the zeolite, where there was insufficient space for a satisfactory flow of water molecules, so r_1 was around **$1.9 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$** . Hence, ion exchange in solution was the technique that led to materials with higher relaxivity (**$4.8 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$**).

Relaxivity values are affected by several factors, including the magnetic field under which they are measured, as well as temperature. The results presented in this work can be compared among themselves, but it is difficult to compare them with other results published in the literature. As an example, the relaxivity of NaY has been measured twice before, once using a 40 MHz spectrometer ($\sim 1\text{T}$), with a value of $7.73 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ obtained [5], and later using a 60 MHz spectrometer (1.4T), with values between 11.4 and $37.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ obtained [10]. In the present work, the NaX relaxivity was measured using a 300 MHz MRI (7T), resulting in a value of $52 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. The relaxivity of Gd-DOTA was also measured under the same conditions as the Gd-loaded zeolites, resulting in longitudinal relaxivity of $5.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. The mNaX-2 sample presented longitudinal relaxivity almost 10 times higher than that of the Gd-DOTA.

Because of the higher relaxivity of mNaX-2 the following experiments are focused on it. The results in Fig. 6 showed that when the dispersion of mNaX-2 was more concentrated, the relaxivity was lower. At low concentrations, r_2 was higher than r_1 , while at around 0.4 mM they were about the same, and at higher concentrations the longitudinal relaxivity became higher than the transverse relaxivity. A higher transverse relaxivity may be useful for T_2 contrast agents, typically employed in liver imaging.

The next step was the *in vivo* assays. For both rats, angiograms were acquired before and after administration of the contrast agent. The angiograms (Figure 7) showed higher contrast, with the vasculature being more clearly visualized, after the administration of both contrast agents. However, the image acquired after the administration of mNaX-2 showed more blood vessels and the highest contrast of all the angiograms shown in Figure 7. For the animal injected with mNaX-2, higher contrast was observed in the image collected 30 min after the administration of the contrast agent, indicating that the zeolite-based contrast agent required a longer time for distribution throughout the body of the rat.

The duration of retention of a contrast agent is an important safety consideration for *in vivo* applications. A contrast agent that is retained in the body for a long period of time may be toxic and is not suitable for *in vivo* applications. One way to investigate the clearance rate is to sacrifice a large number of animals at different times after contrast agent administration, with tissue analysis to determine the Gd^{3+} concentrations. However, this would require a large number of animals and was beyond the scope of this study. Instead, determinations were made of longitudinal relaxation times (T_1) using urine and blood collected at different times after contrast agent administration. Since T_1 was proportional to the Gd^{3+} concentration, the temporal changes of T_1 reflected the concentration of the contrast agent retained in the body. The results of these measurements are summarized in Tables 3-5. Prior to administration of the contrast agent, T_1 for the urine was around 4000 ms, while a shorter relaxation time was obtained for the urine sample collected 1 h after the injection, indicating the presence of Gd^{3+} in the urine. The T_1 relaxation times were shorter for the urine samples of the animals that received Gd-DOTA, compared to those that received mNaX-2, suggesting that the clearance of Gd-DOTA was faster than that of the zeolite. However, within two days, the T_1 values returned to the pre-administration values, indicating that the contrast agent had been eliminated from the body by day 2. This assay was also performed with serum collected

before and after injection of the contrast agents. The results were the same, with the contrast agent being eliminated from the blood stream after two days. The total elimination of the contrast agent from the urine and the serum indicated that the mNaX-2 had a relatively fast clearance rate.

5. Conclusions

The findings of this work showed that the different natures of the frameworks of NaX and BEA affected the relaxivity of these materials ($r_1 = 52 \pm 4$ and $4.8 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively). The small pores and cavities of BEA resulted in low relaxivity values. The relaxivity values for mNaX-2 were higher than for the commercial Gd-DOTA contrast agent ($5.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), while *in vivo* MR angiography images obtained using mNaX-2 showed higher contrast, compared to those obtained using Gd-DOTA. The clearance of Gd^{3+} was determined considering the presence of the ion in the urine and blood of the rats, before and after administration of the Gd-loaded NaX and Gd-DOTA. The results showed that the two agents were eliminated from the body after about the same time, suggesting that Gd-loaded NaX is a potential new contrast agent.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), in the form of grants to JGN (grants #11/51851 and #19/01858-5), and by the National Council for Scientific and Technological Development (grants #465594/2014-0 and #406761/2013-2). We thank CAPES for financial support provided to JC (PDSE process 88881.189630/2018-01). We also thank Dr. Mauricio Sforça and Dr. Silvana Aparecida Rocco (CNPEM/LNBio - National Research Centre for Energy and Materials) (RMN-22793), Dr. Adriano de Vasconcellos (Ibilce-Unesp) and Dr. Juan J. Herrera and Dr. Kurt Bockhorst (Diagnostic and Interventional Imaging Department at McGovern Medical School - UTHealth).

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- [1] M.A. Gonçalves, C.T. Ramalho, *Rev. Virtual Quim.* 9 (2017) 1511–1524.
- [2] J.A. Peters, K. Djanashvili, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2012) 1961–1974.
- [3] International Zeolite Association – IZA
- [4] C.S. Cundy, P.A. Cox, *Microporous Mesoporous Mater.* 82 (2005) 1–78.
- [5] I. Bresinska, K.J.J. Balkus, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 12989–12994.
- [6] S.W. Young, F. Qing, D. Rubin, K.J. Balkus, J.S. Engel, J. Lang, W.C. Dow, J.D. Mutch, R.A. Miller, *J. Magn. Reson. Imaging* 5 (1995) 499–508.
- [7] D.L. Rubin, K.L. Falk, M.J. Sperling, M. Ross, S. Saini, B. Rothman, F. Shellock, E. Zerhouni, D. Stark, E.K. Outwater, U. Schmiedl, L.C. Kirby, J. Chezmar, T. Coates, M. Chang, J.M. Silverman, N. Rofsky, K. Burnett, J. Engel, S.W. Young, *J. Magn. Reson. Imaging* 7 (1997) 865–872.
- [8] L. Tosheva, V.P. Valtchev, *Chem. Mater.* 17 (2005) 2494–2513.
- [9] C. Platas-Iglesias, L. Vander Elst, W. Zhou, R.N. Muller, C.F.G.C. Geraldes, T. Maschmeyer, J.A. Peters, *Chemistry* 8 (2002) 5121–31.
- [10] É. Csajbók, I. Bányai, L. Vander Elst, R.N. Muller, W. Zhou, J.A. Peters, *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 4799–4807.
- [11] K.J. Balkus, I. Bresinska, *J. Alloys Compd.* 207 (1994) 25–28.
- [12] Y. Yan, E. Shao, X. Deng, J. Liu, Y. Zhang, Y. Tang, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 3041–3049.
- [13] M. Tsotsalas, M. Busby, E. Gianolio, S. Aime, L. De Cola, *Chem. Mater.* 20 (2008) 5888–5893.
- [14] F. Mayer, W. Zhang, T. Brichart, O. Tillement, C.S. Bonnet, É. Tóth, J.A. Peters, K. Djanashvili, *Chem. - A Eur. J.* 20 (2014) 3358–3364.
- [15] W. Zhang, J.A. Peters, F. Mayer, L. Helm, K. Djanashvili, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 5080–5089.
- [16] G.A. Pereira, D. Ananias, J. Rocha, V.S. Amaral, R.N. Muller, L. Vander Elst, É. Tóth, J.A. Peters, C.F.G.C. Geraldes, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3832–3837.

- [17] G.A. Pereira, M. Norek, J.A. Peters, D. Ananias, J. Rocha, C.F.G.C. Geraldles, J. Chem. Soc. Dalt. Trans. 9226 (2008) 2241–2247.
- [18] A. Corma, M.T. Navarro, F. Rey, J. Rius, S. Valencia, Angew. Chemie Int. Ed. 40 (2001) 2277–2280.
- [19] J.M. Newsam, M.M.J. Treacy, W.T. Koetsier, C.B. De Gruyter, Proc. R. Soc. London. A. Math. Phys. Sci. 420 (1988) 375–405.
- [20] K.J. Balkus, A.D. Sherry, S.W. Young, U.S. Patent 5,122,363 (1992).
- [21] B.-Z. Zhan, M.A. White, K.N. Robertson, T.S. Cameron, M. Gharghour, Chem. Commun. (2001) 1176–1177.
- [22] M.A. Camblor, A. Corma, A. Mifsud, J. Pérez-Pariente, S. Valencia, Stud. Surf. Sci. Catal. 105 (1997) 341–348.
- [23] O. Larlus, S. Mintova, S.T. Wilson, R.R. Willis, H. Abrevaya, T. Bein, Microporous Mesoporous Mater. 142 (2011) 17–25.
- [24] H.G. Karge, G. Pa'l-Borbe'ly, H.K. Beyer, Zeolites 14 (1994) 512–518.
- [25] M. Bilgen, B. Dogan, P.A. Narayana, Magn. Reson. Imaging 20 (2002) 337–341.
- [26] S.J. Frank, R.J. Stafford, J.A. Bankson, C. Li, D.A. Swanson, R.J. Kudchadker, K.S. Martirosyan, Int. J. Radiat. Oncol. 71 (2008) 5–8.
- [27] L. Kuzníková, K. Dedková, L. Pavelek, J. Kupková, R. Vána, M.H. Rummeli, J. Kukutschová, Proc. 2nd Czech-China Sci. Conf. 2016 (2017).
- [28] W. Lutz, Adv. Mater. Sci. Eng. 2014 (2014).