



13° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



## NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO PARA USO COMO AGENTES DE CONTRASTE EM IMAGENS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Elisa M. N. de Oliveira (D)<sup>1</sup>, Maximiliano S. da Rocha (M), Priscila de A. Caimi (IC), Nara R. de S. Basso, Mara L. Zanini, Ricardo M. Papaléo

*1 – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre - RS, elisa.oliveira@acad.pucrs.br*

**Resumo:** Neste trabalho foram realizadas sínteses de nanopartículas de óxido de ferro recobertas com dextrana, comparando diferentes concentrações dos sais de ferro, de dextrana, temperatura e de tempo de reação. Os compostos obtidos foram analisados por DLS, DRX, TGA, TEM, FTIR, Potencial Zeta e Relaxividade. Foram obtidas nanopartículas com diâmetros entre 10-15 nm e diâmetros hidrodinâmicos médios entre 16-50 nm, com comportamento superparamagnético. A relação entre as relaxividades ( $r_2/r_1$ ) em soluções aquosas foi de 5.30, valor próximo dos agentes de contrastes de óxido de ferro comercialmente disponíveis.

**Palavras-chave:** nanopartículas de óxido de ferro, coprecipitação, dextrana, agentes de contraste, MRI.

### *Iron oxide nanoparticles for use in contrast agents in magnetic resonance imaging*

**Abstract:** In this work were carried out synthesis of iron oxide nanoparticles coated with dextran, comparing the results of using different concentrations of dextran, iron salts, temperature and reaction time. The compounds were analyzed by DLS, XRD, TGA, TEM, FTIR, Zeta Potential and relaxivity. Nanoparticles with dispersion around 10-15 nm and average hydrodynamic diameters of 16-50 nm, with superparamagnetic behavior were obtained. The ratio of the relaxivities ( $r_2/r_1$ ) in aqueous solutions was 5.30, close to value of the commercially available iron oxide contrast agents.

**Keywords:** iron oxide nanoparticles, coprecipitation, dextran, contrast agents, MRI.

### **Introdução**

Nanopartículas magnéticas (NPs) são materiais promissores para muitas aplicações devido à sua capacidade de serem manipuladas e detectadas através de um campo magnético externo. As NPs compostas por óxido de ferro, principalmente a magnetita e maguemita, apresentam diversas aplicações biotecnológicas e na área biomédica tanto *in vitro*, separação e rotulagem de biomoléculas, como *in vivo*, atuando como carreadores de drogas, indutores de hipertermia no tratamento de câncer ou como agentes de contraste para o diagnóstico em imagens por ressonância magnética (IRM) [1, 2, 3]. Devido à grande razão de área superficial/volume e sua natureza magnética, as NPs tendem a se desestabilizar, agregando-se. Para evitar essa agregação, elas podem ser recobertas com materiais biocompatíveis, como álcool polivinílico (PVA), quitosana [4], dextrana [5, 6] ou carboximetildextrana (CMD) [7]. O presente trabalho apresenta a obtenção de NPs com um núcleo magnético de óxido de ferro revestido com dextrana, seguido da reticulação e adição de grupos amino para posterior bioconjugação. Variações nos parâmetros de síntese foram avaliadas, bem como caracterizações físico-químicas e medidas do tempo de relaxação nuclear.

### **Experimental**

As NPs foram obtidas pelo método de coprecipitação de sais de ferro em meio alcalino [8, 9]. A dextrana foi dissolvida em 30 mL de água, em banho de gelo. Adicionou-se a solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  junto à solução gelada de dextrana, em agitação por 30 min, em atmosfera de  $\text{N}_2$ . Após,

adicionou-se a solução de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e colocado em refluxo. Adicionou-se à mistura, 10 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% v/v) gelado e o sistema foi aquecido por 1h30min. As NPs foram centrifugadas de 5 a 6 vezes, a cada 30 min, para a remoção da dextrana remanescente. Para a reticulação, adicionou-se na solução 35 mL de  $\text{NaOH}$   $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e 14 mL de epicloridrina, sob agitação por 10h. Para a etapa de aminação, adicionou-se 60 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% v/v), em agitação por 24h. Adicionou-se solução tampão de citrato de sódio/ $\text{NaCl}$  para estocagem a  $4^\circ\text{C}$ . Diferentes sínteses foram realizadas, denominadas de A até F, em condições distintas, sumarizadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições de síntese das amostras A até F, indicando as diferentes concentrações, temperatura e tempo de reação.

Síntese	Dextrana (g)	Massa $\text{Fe}^{+3}$ (g)	Massa $\text{Fe}^{+2}$ (g)	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Tempo de Refluxo (h)
A	9.0	0.65	0.40	80	1.5
B	9.0	0.65	0.40	60	1.5
C*	9.0	0.65	0.40	80	3.0
D	4.5	0.65	0.40	80	1.5
E	2.5	0.65	0.40	80	1.5
F	2.5	1.3	0.80	80	1.5

\*As etapas de reticulação e de aminação foram iguais para as demais sínteses, exceto a C que não participou destas etapas.

## Resultados e Discussão

A Tabela 2 mostra os resultados da análise de distribuição de tamanho por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das NPs em solução diluídas e ultrassonificadas (10 min, 25 kHz). Para as diferentes sínteses, a amostra A apresentou um diâmetro hidrodinâmico médio de 16.2 nm. Para a amostra B, a mudança da temperatura de reação de  $80^\circ\text{C}$  para  $60^\circ\text{C}$ , causou um aumento de tamanho para 21.4 nm. O diâmetro médio para a amostra C foi 13.8 nm, valor menor do que as demais sínteses. De acordo com Xu [10], o tamanho das NPs de óxido de ferro diminui com o aumento da quantidade de dextrana adicionada. A distribuição de tamanho na amostra D mostrou que, mesmo diminuindo pela metade a quantidade de dextrana em relação à amostra A, houve um leve aumento de tamanho. Entretanto, ao diminuir a quantidade de dextrana (amostras E e F), observou-se uma variação significativa da distribuição de tamanho. Observou-se que para a amostra E o tamanho aumentou para 48.5 nm, e para a amostra F o diâmetro médio de  $195.8 \pm 41.2$  nm e o resultado final foi um precipitado. Acredita-se que a quantidade maior do polímero em relação à quantidade de sais ferro pode tornar a solução de NPs supersaturada de moléculas de dextrana e apenas uma pequena parcela do polímero adere quimicamente na superfície do óxido de ferro de forma mais efetiva. As NPs adjacentes podem não ter sido revestidas, devido às forças magnéticas, aglomerando-se [10].

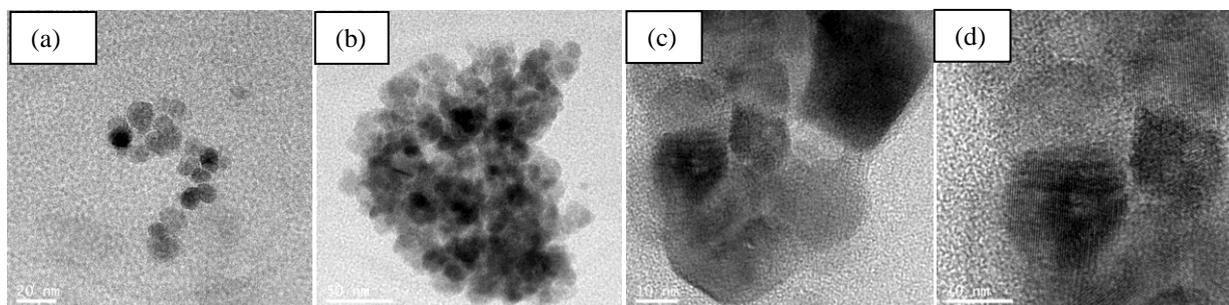
**Tabela 2.** Diâmetros médios por DLS das NPs.

Amostras	Diâmetro médio (nm)
A	$16.2 \pm 7.40$
B	$21.4 \pm 6.84$
C	$13.8 \pm 3.91$
D	$21.8 \pm 6.73$
E	$48.5 \pm 8.90$
F	$195.8 \pm 41.2$

O difratograma de RX das NPs indicou picos distintos nos ângulos  $30.3^\circ$ ,  $35.6^\circ$ ,  $43.0^\circ$ ,  $57.2^\circ$  e  $62.7^\circ$ , representando planos cristalinos (220), (311), (400), (511), e (440) de espinélio de ferrita. O tamanho médio dos cristalitos correspondente a maior intensidade de pico (311) das NPs foi calculado de acordo com a equação de *Scherrer*, ficando 6.6 nm para amostra A e 10.5 nm para a amostra E.

Nas imagens de TEM (Fig. 2), observa-se que as NPs aparecem como estruturas circulares mais escuras representando núcleo composto por óxido de ferro, com diâmetro médio de aproximadamente  $9.3 \pm 1.6$  nm para a amostra A (Fig. 2a). Para a amostra E o tamanho das NPs foi maior do que para as demais amostras, com tamanho médio de  $15.1 \pm 3.1$  nm (Fig. 2c) e  $20.7 \pm 4.5$  nm (Fig. 2d).

Os dados de TGA das amostras liofilizadas indicam perda de peso em faixas de temperaturas distintas. A primeira perda de peso pode ser atribuída pela evaporação das moléculas de água contida na matriz de dextrana, com a perda do peso inicial de 7%, 7.5% e 3.4 %, para as sínteses A, C e E, respectivamente. Após uma perda gradual de água, a segunda etapa pode ser atribuída ao início da decomposição de dextrana com perda de peso acima de  $250^\circ\text{C}$ , representando cerca de 61.3%, 46.6%, 25.1% em peso da síntese A, C e E, respectivamente. Após a dextrana decomposta, a terceira perda são as partículas magnéticas, com perda de massa de 7.7%, 7.2% e 18.3% para as sínteses A, C e E, respectivamente. Não há alteração de peso entre  $600$  e  $1000^\circ\text{C}$ , e, por fim, há a presença de massa residual de 22.5%, 38.2% e 53.3% para as sínteses A, C e E.



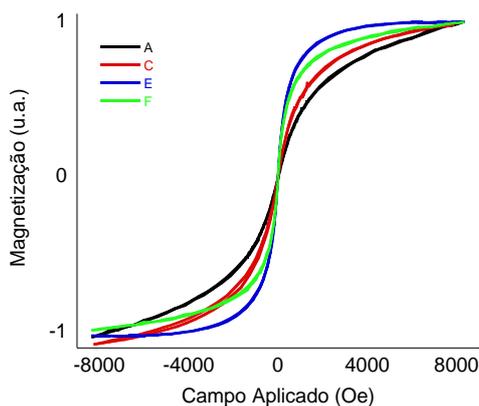
**Figura 2.** Micrografias de TEM das amostras A (a-b) e E (c-d).

A análise por FTIR de dextrana exibiu bandas de absorção características de polissacarídeos. As bandas de absorção em  $1583$  e  $1638\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de estiramento da ligação N-H, possivelmente pertencentes aos grupos amina. Para todas as sínteses, está presente a banda de absorção características de óxido de ferro, em aproximadamente  $598\text{ cm}^{-1}$  [4].

O valor de potencial zeta da solução aquosa para a amostra A foi 5.82 mV e para a amostra E de 0.27 mV. As NPs apresentaram valores positivos de potencial zeta, possivelmente pela presença dos grupos amina em sua superfície. Os valores dos potenciais zeta foram relativamente baixos, o que indica que as NPs na dispersão podem ter sido estabilizadas por repulsão estérica das moléculas de dextrana, com uma pequena carga líquida positiva. Para amostra C, o valor de potencial zeta foi de -6.38 mV, valor diferenciado devido à mesma não ter participado da etapa de adição de grupos amina. Os grupos hidroxilas na molécula de dextrana estão ligados à superfície do óxido de ferro, o que resulta em NPs com uma superfície carregada negativamente pela presença de íons hidroxilas. Foi avaliado a dependência do potencial zeta em função do pH. O ponto isolétrico (P.I.) das amostras A e C foram 7.36 e 4.53, respectivamente, sendo que o P.I. da amostra C ficou numa faixa de pH menor que 7, não sendo ideal para o meio biológico. Já a amostra A, o potencial zeta obtido em pH 7 foi igual a zero, sendo estáveis em pH neutro, fato importante para o uso em meios biológicos [11]. A distribuição de tamanho variou muito pouco em relação ao pH do meio.

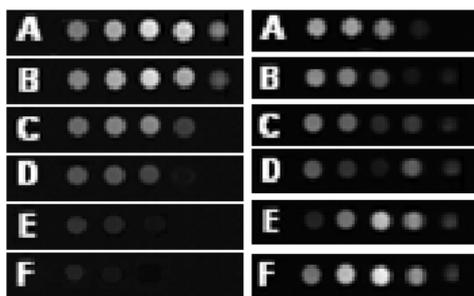
A Fig. 3 mostra a curva de magnetização em função do campo magnético externo, em temperatura ambiente. As NPs não apresentaram magnetização residual quando o campo magnético externo foi

removido, mostrando um comportamento característico superparamagnético. Todas as amostras, tanto em soluções quanto liofilizadas, apresentaram comportamento magnético mediante um ímã.

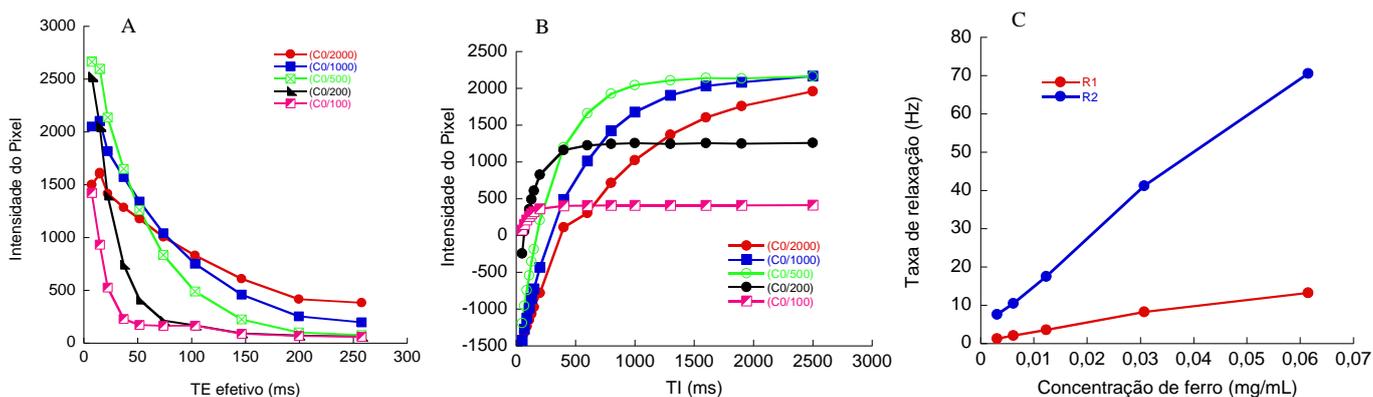


**Figura 3.** Curva de magnetização em função do campo magnético em temperatura ambiente das amostras A, C, E e F.

As imagens de IRM da Fig. 4 representam fatias do *phantom*, contendo soluções de NPs da amostra A em cinco diferentes diluições: 100, 200, 500, 1000 e 2000 vezes, a partir da solução estoque das NPs ( $C_0$ ). Os círculos correspondem às seções transversais da amostra. A intensidade do sinal em cada uma das seringas contendo as NPs foram medidas em função do tempo de eco (TE) para os dados de T2 e em função do tempo de inversão (TI) para os dados de T1 e são apresentadas nas Fig. 5A e Fig. 5B, respectivamente. A partir da regressão dos pontos da curva para cada concentração de ferro nas NPs foi possível obter os valores dos tempos T2 e T1 e das taxas de relaxação R2 ( $1/T_2$ ) e R1 ( $1/T_1$ ).



**Figura 4.** Imagem de MRI do *phantom* com TR de 1000 ms e TE nominal de 7.4 ms (A), 14 ms (B), 35 ms (C), 75 ms (D), 150 ms (E), 200 ms (F) (à esquerda); Imagens de MRI do *phantom* com TR de 3000 ms e TI de 50 (A), 90 (B), 130 (C), 200 (D), 600 (E), 1000 (F) ms (à direita).



**Figura 5.** Curvas de intensidade do pixel em função de TE efetivo para diferentes concentrações de NPs

(A). Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de NPs (B). Gráfico das taxas de relaxação R2 e R1 em função da concentração de ferro das NPs (C).

As retas do gráfico da Fig. 5C representam a relação das taxas de relaxação R2 e R1 em função da concentração de ferro presente nas NPs e sua declividade são as relaxividades  $r_2$  e  $r_1$ . Os valores de relaxividade da amostra A foram de  $60.15 \text{ (mMs)}^{-1}$  para  $r_2$  e  $11.36 \text{ (mMs)}^{-1}$  para  $r_1$  e a razão  $r_2/r_1$  foi de 5.30. O valor está dentro dos valores esperados para agentes de contraste de óxido de ferro comercialmente já disponíveis [12-14].

## Conclusão

A síntese das NPs magnéticas pelo método da coprecipitação mostrou ser eficiente, levando em conta os resultados obtidos nas caracterizações físico-químicas. Os resultados mostraram ser possível controlar a distribuição de tamanho das NPs variando as quantidades de dextrana e de sais de ferro, a temperatura de reação e o tempo de reação durante a síntese. A curva de magnetização das NPs não apresentou magnetização residual e nem histerese, indicando comportamento superparamagnético. As medidas de IRM mostraram os efeitos de contraste das NPs pelo decréscimo da intensidade de sinal de ressonância magnética, com o aumento da concentração de ferro nas soluções das NPs, através da redução dos tempos de relaxação T1 e T2. A razão entre as relaxividades  $r_2/r_1$  encontradas para a amostra A foi de 5.30, resultado dentro dos valores esperados para agentes de contraste compostos por óxido de ferro, podendo ser utilizadas como agente de contraste T2.

## Agradecimentos

À CAPES, FAPERGS e a HP.

## Referências Bibliográficas

1. Qiao, R.; Yang, C.; Gao, M. *J. Mat. Chem.* 2009, 19, 6293.
2. Schladt, T., Schneider, K.; Schild, H; Tremel, W. *D. Trans.* 2011, 40, 6343.
3. Figuerola, A.; Corato, R. D.; Manna, L.; Pellegrino, T. *Pharm. R.* 2010, 62, 143.
4. Hong, R.Y.; Feng, B.; Chen, L.L.; Liu, G.H.; Li, H.Z.; Zheng, Y.; Wei, D.G. *Biochem. Eng. J.* 2008, 42, 300.
5. Muthiah, M, Park, I, Cho, C. *Biotec. Adv.* 2013, 31(8), 1236.
6. Hradil, J., Pisarev, A, Babic, M., Horák, D. *China Partic.* 2007, 5, 168.
7. Liu, G., Hong, R.Y., Guo, L., Li, Y.G., Li, H.Z. *App. Surf. Sci.* 2011, 257, 6717.
8. Palmacci, S. W.; Josephson, L. A. US 5,262,176, *Advanced Magnetics* 1991, 16.
9. Wunderbaldinger, P.; Josephson, L.; Weissleder, R. *Acad. Rad.* 2002, 9, S306.
10. Xu, X.Q., Shen, H., Xu, J.R., Li, X.J., Xiong, X.M.. *App. Surf. Sci.* 2005, 252, 500.
11. Liu, S., Wei, X, Chu, M, Peng, J, Xu, Y. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 2006, 51, 106.
12. Weissleder, R., Ross, B. D. Rehemtulla, A., Gambhir, S. S. *PMHM*, 2010, 1357.
13. Wang, Y. X. J.; Hussain, S. M.; Krestin, G. P. *Europ. Rad.* 2001, 11, 2331.
14. Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; Vuong, Q. L.; Roch, A. *Nanomed Nanobiotech.* 2009, 1, 310.