UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

EDUARD ALEXIS HINCAPIE LADINO

**Avaliação de um biosusceptômetro baseado no
SQUID para medição da concentração do ferro no
fígado e nanopartículas magnéticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, Área: Física
aplicada à Medicina e Biologia.

Ribeirão Preto - SP
2015

EDUARD ALEXIS HINCAPIE LADINO

**Avaliação de um biosusceptômetro baseado no
SQUID para medição da concentração do ferro no
fígado e nanopartículas magnéticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Física aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador:

Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho.

Versão original

Disponível na FFCLRP - USP

Ribeirão Preto - SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Hincapie Ladino, Eduard Alexis

Avaliação de um biosusceptômetro baseado no SQUID para medição da concentração do ferro no fígado e nanopartículas magnéticas / Eduard Alexis Hincapie Ladino; orientador Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho. Ribeirão Preto - SP, 2015.

62 f.:il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2015.

1. Concentração de ferro no fígado. 2. Susceptibilidade magnética. 3. SQUID. 4. Biosusceptometria.

Nome: HINCAPIE LADINO, Eduard Alexis

Título: Avaliação de um biosusceptômetro baseado no SQUID para medição da concentração do ferro no fígado e nanopartículas magnéticas

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Al conocimiento y al amor.
A la física, a mi familia y a Silvana.*

Agradecimentos

Primeiramente, eu quero agradecer infinitamente ao Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho pela orientação deste trabalho, e por toda a paciência e ajuda desde o momento que cheguei no Brasil. Ao Prof. Dr. Antonio Adilton Oliveira Carneiro pelas orientações na instrumentação do susceptômetro e igualmente ao técnico Lourenço Rocha por toda a colaboração e apoio no trabalho no laboratório (Obrigado Lourenço!).

Também, quero agradecer aos colegas do grupo de Biomagnetismo (Biomag) e CSIM, pela amizade e ajuda, e ao Ing. Anderson Rincon por todo o apoio e as discussões científicas.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo auxílio e suporte com os pacientes, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado e auxílios a pesquisa.

Agradeço também aos pacientes e voluntários e a todos que direta ou indiretamente colaboram com projeto.

Resumo

HINCAPIE, E. **Avaliação de um biosusceptômetro baseado no SQUID para medição da concentração do ferro no fígado e nanopartículas magnéticas.** 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2015.

Em pacientes com doenças relacionadas à sobrecarga de ferro, a contínua quantificação dos níveis de ferro no corpo com o fim de evitar os efeitos da toxicidade do ferro no fígado, coração e baço é necessária. O método biosusceptométrico se apresenta como uma alternativa confiável em relação aos métodos tradicionais devido ser uma medição direta do ferro no fígado, e com a vantagem de ser não invasivo. O sistema biosusceptométrico desenvolvido no nosso grupo de pesquisa (Biomag) foi analisado, verificado e tornou-se funcional no Laboratório de Dosagem de Ferro no Hemocentro de Ribeirão Preto, onde a contribuição de ruído magnético ambiental é alta em comparação à localização anterior do equipamento.

Primeiramente foram feitas medições de estabilidade do sinal, avaliação da resposta susceptométrica com a utilização de um *phantom*, avaliação da variabilidade do fator de calibração no tempo; assim como, medidas da resposta susceptométrica para soluções com diferentes concentrações de cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Assim, verificando-se o correto funcionamento do equipamento.

Na parte inicial das medidas *in vivo*, foram realizadas medidas biosusceptométricas em 13 voluntários assintomáticos; na segunda parte, foram realizadas medidas em 48 pacientes com doenças relacionadas à sobrecarga de ferro no fígado (talassemia e anemia falciforme). Com os dados coletados foi

possível calcular o fator de correção necessário para o cálculo da concentração de ferro nos pacientes; além disso, notar a dependência da contribuição do fluxo magnético do paciente com o raio do torso. Foi estimado que o erro na medida na concentração do ferro hepático para medidas *in vivo* é de $0,244 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{g}_{\text{wt}}$.

Medições em nanopartículas magnéticas (MnFe_2O_4 -citrate) foram feitas para soluções com diferentes concentrações, com dois métodos de medida diferentes. Os resultados mostram o potencial do biosusceptômetro para detectar e localizar nanopartículas magnéticas dentro do corpo humano, ou a quantificação da concentração em soluções, com uma calibração prévia do equipamento.

Palavras-chave: 1. Concentração de ferro no fígado. 2. Susceptibilidade magnética. 3. SQUID. 4. Biosusceptometria.

Abstract

HINCAPIE, E. **Evaluation of a SQUID based Biosusceptometer for measurements of liver iron concentration and Magnetic Nanoparticles.** 2015. 62 f. Dissertation (M.Sc. - Postgraduate program in Physics applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2015.

In patients with diseases related with iron overload, the continuous measurement of iron levels in the body in order to avoid the effect of iron toxicity in the liver, heart and spleen is required. The biosusceptometric method presents itself as a reliable alternative to traditional methods because it is a direct measurement of iron in the liver, and has the advantage of being non-invasive. The biosusceptometric system developed in our research group (Biomag) was analysed, verified and became functional at Laboratório de Dosagem de Ferro at Hemocentro de Ribeirão Preto, where the environmental magnetic noise contribution is high compared to the previous location of the equipment.

First, measurements of signal stability were done, evaluation of susceptometric response with the use of a *phantom*, variability evaluation of calibration factor; as well as measurements of solutions of ferric chloride ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Thus, verifying the correct operation of the equipment.

In the first part of *in vivo* measurements, biosusceptometric measurements were performed in 13 asymptomatic volunteers; in the second part, measurements were performed in 48 patients with diseases related to iron overload in the liver (thalassemia and sickle cell disease). With the collected data it was possible to calculate the correction factor necessary for the calculation of the iron concentration in patients; additionally, a dependence of the magnetic

flux with the patient's torso radius was found. The error in the *in vivo* measurement of liver iron concentration was estimated in $0.244 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{g}_{\text{wt}}$.

Measurements on magnetic nanoparticles (MnFe_2O_4 -citrate) were made in solutions with different concentrations, with two different methods of measurement. The results show the potential of the biosusceptometer to detect and locate magnetic nanoparticles within the human body or the quantification of the concentration of solutions with a prior calibration of the equipment.

Key-words: 1. Liver iron concentration. 2. Magnetic susceptibility. 3. SQUID. 4. Biosusceptometry.

Lista de Figuras

1.1	Curvas de magnetização representativas para materiais: a) diamagnéticos. b) paramagnéticos. c) ferromagnéticos [1]	6
1.2	Susceptômetro que opera à temperatura ambiente [2, 3]	8
1.3	a) Representação do detector magnético de ferro (MID). b) Distribuição da função de peso $g(\vec{r})$ que dá a contribuição de um volume unitário de matéria tendo uma susceptibilidade magnética unitária ao sinal de magnetização [4, 5]	9
1.4	a) Componentes do susceptômetro de alta temperatura. 1: conjunto de ímãs. 2: blindagem de mu-metal. 3: sensores magnetoresistivos. 4: bloco de alumínio. 5: vácuo. 6: nitrogênio líquido. 7: Criostato (Dewar) feito de PVC [6]. b) Imagem do susceptômetro de alta de alta temperatura [7]	10
2.1	Densidade do fluxo magnético no centro das bobinas. Valor de pico para B e I	12
2.2	Circuito de compensação. Os dois primeiros blocos correspondem ao controle da fase, e o terceiro a controle do ganho	14
2.3	O biosusceptômetro descrito nas seções anteriores. a) Diagrama do biosusceptômetro mostrando as bobinas de magnetização, a configuração de detecção, paciente posicionado no colchão com a bolsa de água e a cama [8]. b) Fotografia do biosusceptômetro . . .	16
2.4	Fotografias do <i>phantom</i> . a) imagem do <i>phantom</i> cilíndrico. b) O <i>phantom</i> acoplado com a bolsa de água e a guia, posicionados no biosusceptômetro	16
2.5	Painel frontal do programa de aquisição <i>Liver Susceptometry.vi</i> . .	21

2.6	Caixa de diálogo na etapa inicial do cálculo da variação média do sinal de voltagem	22
2.7	Exemplo de saída no cálculo da variação de voltagem para medições em pacientes ou <i>phantom</i>	23
2.8	Exemplo da saída no software para o cálculo do fator de calibração	24
2.9	Painel do aplicativo para calcular a concentração de ferro no fígado	24
3.1	Representação do torso do paciente. Um fígado esférico com raio (RF), e um pulmão cilíndrico com raio (RPu). $D-FPu$ é a distância entre o fígado e o pulmão, e $D-FPe$ entre o fígado e a pele.	28
4.1	Variação percentual das medidas consecutivas no <i>phantom</i> no mesmo dia	31
4.2	Resposta do biosusceptômetro para soluções de $FeCl_3 6H_2O$, num volume de 500 ml. O gráfico mostra o ajuste linear com uma correlação $R^2 = 0,993$	31
4.3	Resposta do biosusceptômetro para soluções de $FeCl_3 6H_2O$, num volume de 32 ml. O gráfico mostra o ajustamento linear com $R^2 = 0,977$	32
4.4	Resposta do biosusceptômetro a várias soluções de Ferripolimaltose ($R^2 = 0,995$)	33
4.5	Resposta do biosusceptômetro para diferentes massas de nanopartículas magnéticas a uma distância de 1,1 cm do gradiômetro ($R^2 = 0,991$)	34
4.6	Resposta do biosusceptômetro para diferentes massas de nanopartículas magnéticas a uma distância de 1,5 cm do gradiômetro ($R^2 = 0,987$)	35
4.7	Resposta do biosusceptômetro para diferentes massas de nanopartículas magnéticas a uma distância de 2,5 cm do gradiômetro ($R^2 = 0,983$)	36
4.8	A dependência do sinal com a distância amostra-gradiômetro. Curva vermelha corresponde ao ajuste com $R^2 = 0,985$	37

4.9	Resposta do biosusceptômetro a soluções de nanopartículas magnéticas, o controle do SQUID com uma sensibilidade de $\times 10$	38
4.10	Resposta do biosusceptômetro a soluções de nanopartículas magnéticas, o controle do SQUID com uma sensibilidade de $\times 100$	39
4.11	Influência do raio do torso no sinal de saída do biosusceptômetro. Ajuste linear com $R^2 = 0,469$	41
4.12	Medições da concentração de ferro hepático em dias diferentes para o mesmo voluntário	42
4.13	Distribuição dos valores dos raios do torso para os voluntários e pacientes	43
4.14	Concentração de ferro no fígado nos pacientes	44

Lista de Tabelas

1.1	Principais categorias na sobrecarga de ferro no fígado [9]	1
2.1	Características das bobinas utilizadas para a produção do campo magnético homogêneo sobre a amostra ou paciente	11
4.1	Limite de detecção (LOD) e sensibilidade de NPM para três distâncias amostra-gradiômetro (A-G)	34
4.2	Dados dos voluntários. O raio do torso foi calculado utilizando o perímetro	40
4.3	Características gerais dos pacientes medidos com o biosusceptômetro	42

Sumário

Lista de Figuras	x
------------------	---

Lista de Tabelas	xiii
------------------	------

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Generalidades sobre o campo magnético	3
1.2	Tipos de magnetismo	4
1.2.1	Diamagnetismo	4
1.2.2	Paramagnetismo	5
1.2.3	Ferromagnetismo	5
1.2.4	Superparamagnetismo	5
1.3	Sistemas biosusceptométricos	6
2	MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1	Geração do campo magnético homogêneo	11
2.2	Medição do campo magnético	12
2.3	Aquisição do sinal	13
2.4	Conjunto de posicionamento	14
2.5	<i>Phantom</i> de calibração	15
2.6	Métodos de medida	17
2.6.1	Medição da concentração do ferro no fígado	18
2.6.2	Medição de amostras com volumes pequenos	19
2.7	Descrição do software utilizado para adquirir e analisar os dados .	20
3	MODELO MATEMÁTICO	25
3.1	Modelo utilizado para o <i>phantom</i>	26

	xv
3.2 Modelo utilizado para pacientes	27
4 RESULTADOS	30
4.1 Medidas no <i>phantom</i>	30
4.2 Medições com soluções de ferro	30
4.3 Medidas com soluções de ferripolimaltose	32
4.4 Medidas com nanopartículas magnéticas	33
4.5 Mediões em voluntários	39
4.6 Medições em pacientes	42
5 CONCLUSÕES	45
Referências Bibliográficas	46

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A acumulação de ferro no corpo está relacionada com uma série de doenças devidas a variadas causas (Tabla 1.1). Em termos gerais o corpo não tem a capacidade de modificar a excreção de ferro do corpo, e os níveis são controlados por meio da regulação da absorção no duodeno [9], onde a relação normal de absorção de ferro é de 1-2 mg/dia [10].

Hemocromatose hereditária	Relacionadas com HFE (hemocromatose hereditária tipo 1)
	Não relacionadas com HFE (hemocromatose hereditária tipo 2A, 2B, 3 e 4)
Hemossiderose secundária à doença sistêmica	Transfusões
	Trastorno nos eritrócitos (hemólise, eritropoiese ineficaz)
	Anemia de doença crônica
	Hemossiderose variada
	Hemocromatose neonatal
Hemossiderose relacionada a cirrose	Hemossiderose associada com doença hepática gordurosa
	Dieta com excesso de ferro

Tabela 1.1: Principais categorias na sobrecarga de ferro no fígado [9]

Aproximadamente 70 % do ferro no corpo é depositado no fígado, e se aceita que a concentração de ferro no fígado é uma estimativa confiável

do ferro total no corpo. Para se medir a concentração de ferro no fígado podem reconhecer-se dois tipos de métodos. Um, consiste da medição direta do tecido no fígado, que pode ser realizado de forma invasiva, através de uma biópsia hepática, ou através de métodos não invasivos como a susceptometria e as imagens por ressonância magnética quantitativas (qMRI). A segundo classe, corresponde a uma medição indireta, como por exemplo, através da análise da ferritina sérica [10].

Em pacientes com hemocromatose hereditária (HFE), seguindo o proposto por Bacon [11] o diagnóstico da doença é feito principalmente pela detecção de um aumento na ferritina e uma posterior análise corroborando a variação genética específica, não representando o alvo principal da detecção de rotina da concentração de ferro. Este não é o caso para os pacientes com doenças não relacionadas com HFE e hemossiderose secundária. O diagnóstico do nível de ferro em pacientes portadores destas anomalias é de fundamental importância para o controle médico principalmente naqueles que estão submetidos à repetidas transfusões e ao tratamento por quelação (substância que sequestra o Fe^{3+} para ser excretado), visto que os agentes quelantes apresentam um certo grau de toxicidade no corpo [10]. Um método comumente usado na maioria dos centros médicos para a avaliação da sobrecarga hepática é a estimativa do nível de ferritina no plasma; porém existem determinados quadros clínicos em que esta avaliação não se correlaciona bem com o verdadeiro nível de ferro depositado no organismo. Outro método também empregado e denominado “padrão ouro” é a biópsia da agulha, onde uma pequena porção do fígado é removida e analisada por métodos químicos, mas, por ser uma técnica invasiva e de risco, a mesma não pode ser usada frequentemente, principalmente em pacientes portadores de hemoglobinopatias. Além disso, essa amostragem é restrita a pequenos volumes e pode resultar em valores pouco representativos da verdadeira concentração de ferro nesse órgão. Um método que permite quantificar o nível de ferro no fígado de forma não invasiva é a medida da susceptibilidade magnética do ferro distribuído no tecido hepático (método biosusceptométrico).

O método biosusceptométrico para quantificar a concentração de ferro no fígado é baseado na medida da magnetização do fígado ($\mathbf{M}$). Para isso se aplica um campo de magnetização $\mathbf{H}$ e considerando as suscetibilidades magnéticas (χ) das diferentes substâncias no corpo pode através de um modelo se encontrar a concentração de ferro nesse órgão. O campo de magnetização pode ser contínuo ou alternado e localizado na região do fígado ou um campo uniforme ao longo de todo o tronco.

Técnicas especiais devem ser utilizadas para conseguir medir as pequenas respostas magnéticas do tecido biológico a um campo magnético aplicado. O mesmo sistema desenvolvido para medir a susceptibilidade magnética do fígado foi também testado em *phantoms* que continham nanopartículas magnéticas (NPMs) para mostrar a capacidade deste sistema para ser utilizado na detecção antecipada de tumores marcados com NPMs.

Primeiramente, os aspectos básicos do magnetismo serão apresentados, seguido de uma revisão dos principais instrumentos desenvolvidos para biosusceptometria *in vivo* e as mais recentes propostas para desenvolvimento de novos equipamentos; depois, o biosusceptometro utilizado nesta tese será descrito assim como as melhorias implementadas no transcurso do trabalho. Os resultados obtidos em voluntários assintomáticos e pacientes, assim como as medidas em simuladores físicos ou *phantoms* serão apresentados e discutidos.

1.1 Generalidades sobre o campo magnético

O campo magnético tem três variáveis relacionadas $\mathbf{H}$, $\mathbf{M}$ e $\mathbf{B}$. O campo magnético ($\mathbf{H}$) é chamado campo de magnetização e é expresso em $[A/m]$ no sistema internacional de unidades (SI). Quando um material é exposto a $\mathbf{H}$ uma magnetização ($\mathbf{M}$) é criada nele, e é linearmente dependente com $\mathbf{H}$ ($\mathbf{M} = \chi_m \mathbf{H}$), onde χ_m é a susceptibilidade magnética do material e permite a classificação dos materiais dependendo na sua capacidade para serem magnetizados, no sistema SI essa grandeza é adimensional.

A densidade de fluxo magnético pode ser pensada como a soma das linhas de força devido à aplicação de campo $\mathbf{H}$ e a magnetização $\mathbf{M}$ criando um campo

B total (equação 1.1).

$$\mathbf{B} = \mu_0(\mathbf{H} + \mathbf{M}) \quad (1.1)$$

no vácuo, a equação será

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H}$$

onde μ_0 é a permeabilidade magnética do espaço livre com um valor de $4\pi * 10^{-7} \text{ Vs/Am}$.

1.2 Tipos de magnetismo

A magnetização pode ser expressa como o momento magnético (**m**) por unidade de volume (*V*)

$$\mathbf{M} = \frac{\mathbf{m}}{V}$$

O momento magnético total de um átomo é a soma vetorial do momento magnético do elétron, do spin eletrônico e nuclear. Para uma molécula, o momento magnético é a contribuição do momento de cada átomo. Dependendo da configuração eletrônica de um átomo, e o arranjo dos átomos nas moléculas, uma substância terá uma resposta característica para um campo magnético aplicado.

1.2.1 Diamagnetismo

Nos materiais diamagnéticos os átomos não tem um momento magnético resultante, apesar desse fato os materiais têm uma resposta diamagnética com **H**. A susceptibilidade apresenta valores negativos na ordem de grandeza de 10^{-5} ; então, a magnetização é tênue e na direção oposta de **H** (Figura 1.1a), uma explicação semiclássica do diamagnetismo é dada pela aplicação da lei Lenz para o comportamento da órbita dos elétrons quando em presença de um campo magnético externo.

1.2.2 Paramagnetismo

No paramagnetismo há um cancelamento parcial dos momentos magnéticos, e o átomo ou molécula conserva um determinado momento magnético $\mathbf{m}$. Na ausência de um campo magnético $\mathbf{M} = 0$, porque a direção individual dos momentos magnéticos do material são distribuídos de forma aleatória devido à energia térmica. Quando um campo magnético é aplicado no material paramagnético, é exercido um torque para os momentos magnéticos e tendem a alinhar-se na direção do campo, mas devido à energia térmica o alinhamento é parcial, resultando numa magnetização fraca. Consequentemente, a susceptibilidade paramagnética tem valores positivos e baixos (Figura 1.1b). A dependência da susceptibilidade paramagnética com a temperatura é dada pela lei de Curie-Weiss

$$\chi = \frac{C}{T - \theta}$$

onde C é a constante de Curie e θ uma constante com unidades de temperatura.

1.2.3 Ferromagnetismo

Nos materiais ferromagnéticos os átomos têm um momento magnético total com uma contribuição principal do momento de spin, as interações de acoplamento fazem com que os spins dos átomos adjacentes tendam a alinhar-se, criando domínios magnéticos no material. A magnetização no ferromagnetismo não é uma função linear do campo aplicado, como nos casos anteriores; o material ferromagnético mostra uma histerese como resposta ao campo aplicado (Figura 1.1c).

1.2.4 Superparamagnetismo

A coercitividade é dependente do tamanho das partículas magnéticas e abaixo de um valor crítico, que para partículas de óxido de ferro é da ordem de 80 nm, a coercitividade diminui até zero porque a energia térmica tem um efeito maior no material. Abaixo do ponto crítico, se um campo magnético é

aplicado os momentos magnéticos tendem a alinhar-se na direção do campo, com a oposição de energia térmica, este é o comportamento normal de um material paramagnético; no entanto, uma partícula superparamagnético monodomínio tem um momento magnético muito maior do que uma paramagnética, resultando em uma resposta magnética mais forte [1].

Figura 1.1: Curvas de magnetização representativas para materiais: a) diamagnéticos. b) paramagnéticos. c) ferromagnéticos [1]

1.3 Sistemas biosusceptométricos

A medida da susceptibilidade do fígado foi descrita pela primeira vez por Baumand e Harris em 1967 [12], e nos anos posteriores o interesse na técnica continuou até os dias atuais [11]. R. Fischer e D. Farrell em 2007 [12] fizeram uma revisão da literatura sobre a detecção não-invasivo de ferro no fígado pelo método susceptométrico, mostrando o desenvolvimento da técnica desde 1970, e descrevem três biosusceptômetros em rotina clínica, todos eles usando um campo de magnetização DC.

Um está instalado na University Medical Centre Hamgburg-Eppendorf (Alemanha), e consiste em dois gradiômetros de segunda ordem conectados a um SQUID-RF como configuração de detecção, e dois gradiômetros de primeira ordem para criar o campo magnetizante localizado e não homogêneo. Um segundo equipamento está localizado no Children's Hospital and Research

Centre em Oakland (EUA) e um terceiro em Torino (Itália). Estes dois equipamentos são o Ferritometer, modelo 5700; Tristan Technologies, San Diego, EUA. A parte de detecção está composta por dois gradiômetros de segunda ordem acoplados a um SQUID-DC, e para gerar o campo magnetizante não homogêneo é utilizado um gradiômetro de primeira ordem. Nestes três Biosusceptômetros a detecção e geração do campo magnético são feitas por supercondutores de baixa temperatura.

Outro equipamento utilizando supercondutores de baixa temperatura com um campo de magnetização não localizado, consiste de um gradiômetro de segunda ordem acoplado a um SQUID-DC e um campo de magnetização homogêneo de 10 Hz produzido por um par de bobinas circulares com 1,223 m de raio, com a adição de um gradiente de campo produzido por um par de bobinas com 0,707 m de raio [13]; um sistema de compensação adaptativa foi desenhado para reduzir a contribuição do campo de magnetização [14].

Dois problemas principais na quantificação ferro no fígado por métodos susceptométricos são: o custo do susceptômetro e sua manutenção, além disso, o erro produzido pela resposta magnética do tecido pulmonar e sobrepondo-se ao fígado [2]. Para evitar a utilização de hélio líquido com o objetivo de reduzir o custo do método biosusceptométrico, têm sido propostos sistemas que operam à temperatura ambiente.

Em [2] é descrito um biosusceptômetro constituído por um gradiômetro axial de primeira ordem como fonte de campo magnético e um gradiômetro axial de segunda ordem como bobina de detecção, ambos gradiômetros estão dispostos simetricamente sobre um plano médio comum, todo o conjunto se move para cima e para baixo com relação a pele do paciente com uma frequência de 1 Hz (Figura 1.2). De acordo com os autores o ruído instrumental é inferior a $30 \mu\text{g}/g_{wt}$ e a avaliação da concentração de ferro no fígado em oito pacientes com sobrecarga de ferro mostram uma correlação de 0,98 entre os valores obtidos com o biosusceptômetro à temperatura ambiente e um equipamento baseado em SQUID [2]. A comparação dos resultados do biosusceptômetro com a medição

bioquímica do ferro em tecido do fígado mostrou um coeficiente de correlação de 0,71 ($p = 0,022$.) [3], e a principal fonte de erro foi atribuída ao cálculo da contribuição do tecido que recobre o fígado.

Figura 1.2: *Susceptômetro que opera à temperatura ambiente [2, 3]*

Outra aproximação para medições à temperatura ambiente foi feita por [4], e consiste em duas bobinas de captação simetricamente dispostas num campo magnético de 234 Hz criado por duas bobinas, a temperatura é mantida estável dentro da faixa de milikelvin por meio de um fluxo de água com temperatura controlada (Figura 1.3). A medição é feita mediante uma varredura num eixo na região do fígado, com o fim de obter o sinal devido ao fígado do paciente é subtraído um sinal de fundo, estimada como a magnetização de um torso com as mesmas características antropométricas do paciente. O erro estimado na medida foi de $0,8 g_{Fe}$ em todo o fígado e depende principalmente do cálculo do sinal de fundo. Foram feitas comparações com a biópsia ($R^2 = 0,62$), com medições em um biosusceptômetro baseado em SQUID ($R^2 = 0,79$), com ferritina sérica ($R^2 = 0,72$) e ressonância magnética ($R^2 = 0,71$) mostrando correlações no intervalo 0,62-0,79 [5].

Uma abordagem com o uso de supercondutores de alta temperatura de transição (High-Tc) é apresentada em [6] e [7]. O equipamento consiste de um transformador de fluxo construído com uma fita supercondutora de material

Figura 1.3: a) Representação do detector magnético de ferro (MID). b) Distribuição da função de peso $g(\vec{r})$ que dá a contribuição de um volume unitário de matéria tendo uma susceptibilidade magnética unitária ao sinal de magnetização [4, 5]

de High-Tc acoplado a um sensor magnetoresistivo, e o campo magnético é produzido por um conjunto de ímãs permanentes (Figura 1.4). A vantagem do sistema é o peso e a utilização de nitrogênio líquido como líquido criogênico, em comparação com os sistemas baseados em supercondutores de baixa temperatura. Além disso, o método de medida desloca transversalmente o sensor em relação ao tronco, o que contribui para o aumento da relação sinal/ruído. Medições em *phantoms* mostram a linearidade do sistema e uma incerteza inferior a $10 \mu g_{Fe}/g$. Porém até o presente não foram relatados experimentos utilizando esse sistema em pacientes e/ou voluntários assintomáticos.

Figura 1.4: a) Componentes do susceptômetro de alta temperatura. 1: conjunto de ímãs. 2: blindagem de mu-metal. 3: sensores magnetoresistivos. 4: bloco de alumínio. 5: vácuo. 6: nitrogênio líquido. 7: Criostato (Dewar) feito de PVC [6]. b) Imagem do susceptômetro de alta de alta temperatura [7]

Os objetivos do presente trabalho são:

- Fazer uma revisão de todo o susceptômetro e melhorias em diversos subsistemas que o compõem.
- Realizar medidas em sistemas modelos e simuladores físicos ou *phantoms* (*phantoms* do torso, soluções de ferro, ferropolimaltose e nanopartículas magnéticas).
- Realizar medidas em voluntários assintomáticos e pacientes com sobrecarga de ferro.

Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS

Nas próximas seções é descrito o biosusceptômetro desenvolvido em [15]. Em primeiro lugar, o conjunto de bobinas para produzir um campo magnético homogêneo vai ser descrito; depois, os elementos relacionados com a medida da magnetização, os componentes de aquisição e processamento do sinal, o sistema de posicionamento do paciente/amostra no biosusceptômetro; e finalmente, os métodos detalhados para a realização das medições da concentração de ferro hepático e a magnetização em amostras com volume pequeno.

2.1 Geração do campo magnético homogêneo

Um conjunto de quatro bobinas retangulares, conhecidas como bobinas de Rubens, é utilizado para gerar um campo magnético homogêneo (H). As características das bobinas estão resumidas na Tabela 2.1, onde z representa a distância de cada bobina a partir de um ponto central ($Z = 0$).

Bobina	Altura x Largura (m)	z (m)	Número de voltas	Resistência (Ω)
C1	2,95 x 2,15	1,372	144	50,3
C2	2,95 x 2,15	0,455	105	36,7
C3	2,95 x 2,15	-0,455	105	36,7
C4	2,95 x 2,15	-1,372	144	50,3

Tabela 2.1: Características das bobinas utilizadas para a produção do campo magnético homogêneo sobre a amostra ou paciente

As bobinas C1 com C4, e C2 com C3 estão ligadas em série, e depois os dois pares estão ligados em paralelo, a resistência total das bobinas é $42,4 \, \Omega$. Em um volume cúbico de $0,3 \, \text{m}$ de lado localizado no centro das bobinas, a homogeneidade da densidade de fluxo magnético é de $99,96 \, \%$, $99,945 \, \%$ e $99,999 \, \%$ nas direções X, Y e Z, respectivamente.

A fonte de corrente é composta por um amplificador de potência de áudio Cíclotron Dynamic 8000 e um gerador de sinais. Este amplificador foi modificado para operar em baixa frequência, em torno de $10 \, \text{Hz}$. A Figura 2.1 mostra o campo magnético em função da corrente através das bobinas C1, C4, e C2, C3. O ajuste linear foi $B_z = 138,1 \, \mu\text{T/A}$ ($R^2 = 0,999$).

Figura 2.1: Densidade do fluxo magnético no centro das bobinas. Valor de pico para B e I

2.2 Medição do campo magnético

A parte de detecção de campo magnético consiste de um gradiômetro supercondutor axial de segunda ordem, com uma linha de base e raio de

4 cm e 2 cm, respectivamente; ligado a um SQUID-RF (Superconducting Quantum Interference Device), estes dois elementos estão dentro de um Dewar criogênico com blindagem para radiofrequência e imerso em hélio líquido para alcançar o estado supercondutor. O SQUID-RF é um componente do sistema de medição BTI 330X de Biomagnetic Technologies, e consiste de uma unidade de radiofrequência (“RF head”) onde se encontra um circuito tanque para sintonizar o sistema e uma unidade de controle.

Para anular o campo magnético na posição do gradiômetro, primeiro é utilizado um cancelamento passivo com pequenas placas de uma liga de chumbo-estanho perto de uma das espiras do gradiômetro que quando imersas em hélio líquido funcionam como eletroímãs; depois é feito um cancelamento ativo por meio de uma bobina com um raio de 7 cm e 4 espiras, acoplada ao pescoço do Dewar, a posição z da bobina é uma função da tensão de saída mínima. Para atingir o cancelamento do campo magnético externo, a bobina de cancelamento é alimentada com o mesmo sinal que alimenta o amplificador de potência (sinal de entrada nas bobinas de magnetização), um ajuste fino do sinal (fase e amplitude) ligado às bobinas de cancelamento é feito com a ajuda de um circuito defasador variável e um amplificador (Figura 2.2).

Este condicionamento do sinal é essencial para se alcançar uma boa rejeição de modo comum, geralmente só o equilíbrio passivo é utilizado, mas no método susceptométrico o campo magnético de magnetização utilizado para excitar a amostra também induz correntes parasitárias (“eddy currents”) na blindagem térmica do Dewar e isso degrada o equilíbrio exigindo o cancelamento ativo.

2.3 Aquisição do sinal

O sinal de saída da unidade de controle do SQUID está ligado a um amplificador lock-in, e é feita uma aquisição sincronizada com a frequência do campo magnético aplicado; A comunicação do Lock-in com a CPU é feita por uma placa GPIB (General Purpose Interface Bus) com uma frequência de aquisição

Figura 2.2: Circuito de compensação. Os dois primeiros blocos correspondem ao controle da fase, e o terceiro a controle do ganho

de 100 amostras/s. O sistema permite o controle total do Lock-in a partir do computador.

A configuração do Lock-in é:

- Sensibilidade = 500 mV
- display = R, PHI
- Fase = -90
- Constante de tempo 100 ms

O processo de aquisição é controlado por um programa desenvolvido em LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench) versão 6.1, e é descrito numa seção posterior.

2.4 Conjunto de posicionamento

O sistema de posicionamento consiste em uma cama feita de madeira e materiais com uma resposta magnética desprezível, a cama tem movimento nas direções x , y e z . A cama utiliza um sistema pneumático para alcançar posições precisas na direção z , a medição da posição é feita por meio de um potenciômetro com uma tensão de alimentação de 10 V da saída analógica do amplificador

Lock-in; a tensão sobre o potenciômetro é diretamente proporcional a mudanças na posição z , e é medida através da entrada analógica do amplificador Lock-in e convertida em sinal digital que será utilizado pelo programa de controle do processo de medida. Uma descrição completa do sistema está disponível em [15].

O posicionamento do paciente e sua fixação em uma posição correta para a medida é realizado utilizando um colchão especial (VAC FIX), que mantém uma forma particular quando o ar do interior é extraído, imobilizando o sujeito de forma confortável para o procedimento.

Para fazer a medida com o biosusceptômetro utiliza-se uma bolsa de água acoplada ao tronco do paciente. A bolsa consiste de um tubo de plástico circular com 20 cm de raio e adaptado para a forma do torso através de uma terminação de plástico flexível. A bolsa tem um guia na parte superior com o objetivo de encaixar a parte mais baixa do Dewar com o centro da bolsa, e controlar a quantidade de água sobre a pele do paciente e a distância pele-Dewar. A água utilizada para encher a bolsa é aquecida até uma temperatura confortável, idealmente igual à temperatura do corpo nesse local, dentro de um recipiente localizado fora das bobinas a uma altura de 1,5 m do chão. Deste modo a água corre para baixo através de um tubo até a bolsa, e quando a medida é finalizada a água é restaurada utilizando uma bomba de vácuo, a qual também é utilizada para o colchão.

A Figura 2.3 mostra um diagrama simplificado e uma foto do biosusceptômetro localizado no Hemocentro de Ribeirão Preto, Laboratório de Dosagem de Ferro.

2.5 *Phantom de calibração*

O *phantom* é composto por um cilindro de acrílico com 30,3 cm de comprimento e 11,0 cm de raio, cheio de água. Dentro do cilindro há uma esfera de 5,6 cm de raio com ar dentro, a distância entre a superfície do cilindro e a esfera é 1,5 cm (Figura 2.4). O *phantom* deve ser medido a cada vez

(a)

(b)

Figura 2.3: O biosusceptômetro descrito nas seções anteriores. a) Diagrama do biosusceptômetro mostrando as bobinas de magnetização, a configuração de detecção, paciente posicionado no colchão com a bolsa de água e a cama [8]. b) Fotografia do biosusceptômetro

que o biosusceptômetro é utilizado, para calcular o fator de calibração C , que corresponde ao fator de conversão entre a tensão e o fluxo magnético.

(a)

(b)

Figura 2.4: Fotografias do phantom. a) imagem do phantom cilíndrico. b) O phantom acoplado com a bolsa de água e a guia, posicionados no biosusceptômetro

2.6 Métodos de medida

Os passos para iniciar o biosusceptômetro serão descritos, e em seguida os procedimentos para realizar a medida da concentração de ferro no fígado e a magnetização de amostras de pequeno volume.

O procedimento a seguir descreve as etapas para iniciar o biosusceptômetro:

1. Sintonize o SQUID-RF com o procedimento descrito no manual do usuário do BTI modelo 330X. Configure o *Sensitivity* em “X100”, o *Function* em “Slow”, e ligue o *Notch Filter*.
2. Configure o gerador de sinais em 10 Hz e na menor tensão, e em seguida, ligue o amplificador de potência. Com o sinal de saída do controle do SQUID conectado em um osciloscópio, podemos visualizar a onda senoidal de 10 Hz induzida no gradiômetro. Aumentar a tensão do gerador lentamente até a metade do máximo.
3. Ligue o circuito de compensação e deixar os potenciômetros de ajuste “grosso” e “fino” no centro do intervalo.
4. Ajustar manualmente a posição z da bobina de compensação no pescoço do Dewar, minimizando a tensão da saída no SQUID, e fixar a bobina. Depois disso, minimizar a tensão de saída com a ajuda do circuito de compensação. Primeiro sintonizando a fase e depois e depois o ganho do circuito.
5. Aguarde pelo menos 15 minutos para estabilizar o sistema termicamente.
6. Ligue o amplificador Lock-in, ligar o sinal de trigger do gerador de sinais na referência de entrada no Lock-in, e executar o programa *Liver suscetometry.vi*, a configuração do Lock-in é feita automaticamente.
7. Aumentar a tensão no gerador de sinais lentamente até 3,0 V; assim, o campo magnético no centro das bobinas é 144,6 μT .
8. Sintonizar novamente com o circuito de compensação.

Seguindo os passos acima a configuração estará completa, e o biosusceptômetro está pronto para fazer medições.

2.6.1 Medição da concentração do ferro no fígado

1. Tome nota dos dados do paciente: nome, peso, estatura, perímetro do tronco, idade e sexo.
2. O paciente não pode estar vestindo algo com uma contribuição magnética forte. Por exemplo, calças, blusa ou camisa com botões metálicos; sutiã com fios metálicos; brincos ou grampo de cabelo.
3. O paciente é colocado em posição supina sobre a cama, com o corpo girado entre 30° - 45° . Por meio de uma imagem com ultrassom a posição do fígado é encontrada e as distâncias pele-fígado e pulmão-fígado. Uma marca sobre a pele é feita para localizar a projeção do lóbulo direito do fígado.
4. Coloca-se a bolsa de água acima do torso do paciente, configura-se a guia sobre a marca do fígado, e com a ajuda do colchão fixar a posição do paciente.
5. Encher a bolsa com água até que alcance o bordo da guia (aproximadamente 0,5 cm sobre a pele).
6. Deslizando a cama nas direções x , y e z ajustar a parte mais baixa do Dewar com a circunferência da guia, que está sobre o fígado; depois disso, fixar a cama na posição correta.
7. Mover a cama para cima até o Dewar quase tocar a pele do paciente; depois disso, mover para abaixo a cama 1,5 cm e remover a guia.

Em segundo lugar, listamos os passos para medir a concentração de ferro no fígado, com a configuração anterior do biosusceptômetro:

1. Verifique na interface do programa que o número de pontos para adquirir é 2.000, e que a distância total entre a posição inicial e final da cama é 80 mm. Especifique a pasta onde os dados serão salvados, por meio da opção "New Patient".

2. Com o paciente na posição correta, fazer a última sintonia com o circuito de cancelamento ativo: ajustar a fase da corrente de tal modo que a tensão de saída atinge um valor mínimo, depois ajustar o ganho até que a tensão de saída seja próxima de 100 mV.
3. Iniciar a aquisição: inicialmente 500 pontos são adquiridos, depois a cama começa a mover-se para baixo com uma velocidade de 8,6 mm/s até atingir 80 mm; em seguida, a cama para e são adquiridos aproximadamente mais 500 pontos. Um arquivo com os dados adquiridos é salvo automaticamente.
4. Retorne a cama para a posição inicial e fazer novamente uma sintonia fina, usando apenas o potenciômetro de ganho.
5. Realizar pelo menos três medições, dependendo da estabilidade do sinal.
6. No final, fazer uma última medição da cama sem o paciente, mantendo a forma e posição do colchão e a cama. Esta medição é usada como a medida de referência (ΔV_{ref}).

2.6.2 Medição de amostras com volumes pequenos

A configuração do equipamento permite um segundo método de medição; ele pode ser utilizado para medir a magnetização de amostras com volumes pequenos. Adicional à configuração normal, uma superfície plana deve ser utilizada para o deslizamento da amostra e permitindo ela ficar tão perto quanto seja possível ao gradiômetro. Com todo o sistema ligado da mesma maneira para medir a concentração de ferro:

1. Na interface do programa em Labview (*Liver Susceptometry.vi*) alterar o número de pontos a ser adquiridos para 200.
2. Com a ajuda da cama, ajustar a distância amostra-gradiômetro, e fixar a cama.
3. Localize a amostra em um lugar específico fora do alcance de detecção do gradiômetro. Ajustar a fase da corrente de cancelamento ativo de tal modo que a tensão de saída atinge um valor mínimo, depois ajustar o ganho até a

tensão de saída seja próxima de 100 mV. Posteriormente, iniciar a aquisição dos primeiros 200 pontos.

4. Depois disso, mover a amostra até uma posição abaixo do sensor, que ambos fiquem concêntricos. Aguarde até que o sinal estivesse estabilizado e inicie uma segunda aquisição de dados.
5. Realizar pelo menos três repetições do processo completo, dependendo da estabilidade do sinal.
6. Para obter a contribuição da amostra, fazer a diferença entre o valor médio dos sinais com e sem a amostra sob o gradiômetro.

2.7 Descrição do software utilizado para adquirir e analisar os dados

A aplicação desenvolvida para controlar o Lock-in, a posição da cama e adquirir os dados na quantificação de ferro no fígado é mostrada na Figura 2.5.

À esquerda está a informação sobre o gerador de sinais: tipo de onda, amplitude do sinal e “offset”. Abaixo há a área onde pode ser ajustada a frequência de aquisição e o número de pontos para adquirir em uma única medição. Usando o botão verde (*New Patient*) é aberta uma caixa de diálogo para especificar o nome da pasta e dos arquivos do novo paciente. Com o botão vermelho (*Acquisition*), o programa inicia o processo descrito acima, quando a medição finaliza o indicador (*Acquisition number*) incrementa. Em *Vertical Displacement* é especificada a distância total que a cama vai deslocar-se, e em *Bed Downed* após uma medição é mostrado o deslocamento atingido da cama. A posição vertical da cama é controlada por meio dos botões *Bed Down* e *Bed up*, na esquerda do painel. O valor da amplitude e da fase do sinal da saída do Lock-in é mostrado, e os respectivos gráficos, em tempo real. A informação da corrente e da tensão sobre as bobinas de magnetização, e o campo de magnetização são apresentados, mas são uma função de uma corrente especificada e não o resultado

de uma medição em tempo real. Por último, há um indicador que acende quando a tensão de entrada é superior a 500 mV.

Figura 2.5: Painel frontal do programa de aquisição Liver Susceptometry.vi

Os arquivos resultantes de uma medição incluem quatro colunas: o tempo de aquisição relativo, a posição de cama, a amplitude da voltagem de saída e sua fase. A parte mais importante da medição é a diferença entre as voltagens nas duas posições verticais do paciente, que depois será transformada numa quantidade de ferro hepático. Para executar essas duas tarefas foram desenvolvidas duas aplicações em MATLAB (Matrix Laboratory).

A primeira é usada para medir a diferença de tensão resultante de uma medição em pacientes ou no *phantom*. Quando o programa é executado, inicialmente aparece uma caixa de diálogo para abrir os arquivos da aquisição

(.dat), e, em seguida, o programa mostra um gráfico de cada sinal e uma caixa de diálogo perguntando se você deseja usar esse sinal no cálculo da média (Figura 2.6).

Figura 2.6: Caixa de diálogo na etapa inicial do cálculo da variação média do sinal de voltagem

Depois de adicionar os sinais, o programa calcula a média dos primeiros 500 pontos e uma média com os pontos após a cama parou, e calcula a variação da tensão média (ΔV). Nestes dois intervalos é também calculada a regressão linear para estimar as mudanças do sinal no tempo, e esse valor é subtraído da média geral.

A Figura (2.7) mostra a saída do programa, a curva média dos sinais, as linhas verticais estão nas posições quando a cama começa a baixar e quando para, e todos os valores calculados. A variação de tensão na medição de referência (ΔV_{ref}) é calculada usando a mesma aplicação.

Figura 2.7: Exemplo de saída no cálculo da variação de tensão para medições em pacientes ou phantom

Com os dados do *phantom* é calculado o fator de calibração ($C = (\Delta V - \Delta V_{ref})/\Delta\Phi$). A fim de fazer isso é usado o programa descrito acima, mais algumas linhas de código, onde são adicionados os dados da integrante fluxo para a esfera dentro do *phantom*.

Figura (2.8) é um exemplo da saída de software para o cálculo de C .

Com o fator de calibração, a variação de tensão por parte do paciente, a variação de tensão de referência e os dados recolhidos do paciente é calculada a concentração de ferro hepático. A Figura (2.9) mostra o painel frontal da aplicação para fazer o cálculos, a saída é um valor em unidades de mg_{Fe}/g_{wt} .

Figura 2.8: Exemplo da saída no software para o cálculo do fator de calibração

CFHbeta
Arquivo

Cálculo da Concentração de Ferro Hepático (CFH) por Susceptometria Magnética

Dados Pessoais

Nome: Registro:

Nasc.: dd/mm/aaaa Idade: Altura (cm): Peso (kg):

Dados do Exame

Data: Hora:

Parâmetros Físicos

Profundidade do Fígado (m):

Distância Fígado - Pulmão (m):

Distância Fígado - Coração (m): 0.1

Raio do Torso (m):

Parâmetros Susceptométricos

Variação do Sinal (V):

Variação da Referência (V):

Fator de Calibração:

CFH (mg / g WET tissue):

Fator de Correção

Window Snap

0.0

Calibração

Fator de Calibração

Comentários:

Calcular CFH

SALVAR

Figura 2.9: Painel do aplicativo para calcular a concentração de ferro no fígado

Capítulo 3

MODELO MATEMÁTICO

O fluxo magnético total (Φ) sobre de umas bobinas detectoras, produzido por uma amostra com susceptibilidade magnética $\chi(\mathbf{r})$ e magnetizada por um campo aplicado $\mathbf{B}_e$ é igual a

$$\Phi = \frac{1}{\mu_0} \int_{vol} \chi(\mathbf{r}) \mathbf{B}_e(\mathbf{r}) \cdot \frac{\mathbf{B}_R(\mathbf{r})}{I_R} dv \quad (3.1)$$

na equação 3.1 $B_e(\mathbf{r})$ é o campo magnético aplicado sobre o torso, para o nosso caso particular é constante em todo o volume de integração devido a configuração das bobinas de magnetização, e isso vai ajudar nos cálculos futuros. $B_R(\mathbf{r})$ é o campo magnético recíproco da bobina de detecção, e corresponde à densidade de fluxo magnético produzida em cada ponto no espaço por as bobinas de captação, se uma corrente de um ampere passa através dela [15, 16].

O método para medir a concentração de ferro no fígado e o fluxo magnético produzido pelo *phantoms* é baseado na técnica de medição diferencial [17] [16] [12]. Enquanto o gradiômetro se move verticalmente através de um meio com uma susceptibilidade magnética homogênea e conhecida (de referência), o resultado da medição da susceptibilidade magnética da amostra será um valor relativo à susceptibilidade da referência ($\chi - \chi_{ref}$) e a equação 3.1 muda para

$$\Phi = \frac{1}{\mu_0} \int_{vol} (\chi(\mathbf{r}) - \chi_{ref}) \mathbf{B}_e(\mathbf{r}) \cdot \frac{\mathbf{B}_R(\mathbf{r})}{I_R} dv \quad (3.2)$$

as equações 3.1 e 3.2 podem ser aplicadas, em geral, a qualquer volume

com uma certa função de susceptibilidade magnética, e qualquer campo de magnetização em função da posição (r).

Para o biosusceptômetro descrito nas seções anteriores o campo de magnetização ($\mathbf{B}_e$) é homogêneo e na direção z na região central das bobinas, onde as amostras ou pacientes são posicionados. Além disso, a susceptibilidade magnética ($\chi(\mathbf{r})$) pode ser considerada constante para um volume particular de integração. Usando as considerações descritas acima na equação 3.2:

$$\Phi = \frac{\chi_{vol} - \chi_{ref}}{\mu_0} B_e \int_{vol} \frac{\mathbf{B}_R(\mathbf{r})}{I_R} dv \quad (3.3)$$

O princípio do método para medir a concentração de ferro no fígado (section 2.6.1) é baseado na resposta do biosusceptômetro em dois pontos espaçados verticalmente com relação ao gradiômetro. A amostra começa a medição a partir de uma posição inicial (i) e termina numa posição final (f), a variação do fluxo magnético será

$$\Delta\Phi = \Phi_f - \Phi_i$$

A partir desse ponto, a notação para a diferença entre as duas integrais de fluxo será ΔInt_{vol} . A equação 3.3 para uma amostra medida com o método diferencial é

$$\Delta\Phi = \frac{\chi_{vol} - \chi_{ref}}{\mu_0} B_e \Delta Int_{vol} \quad (3.4)$$

3.1 Modelo utilizado para o phantom

Para calcular o fator de calibração C do equipamento, a equação 3.5 é usada

$$C = \frac{\Delta V - \Delta V_{ref}}{\Delta\Phi} \quad (3.5)$$

Onde ΔV corresponde à voltagem medida experimentalmente com o phantom, ΔV_{ref} é a voltagem de referência resultante da medição da cama, e

$\Delta\Phi$ representa a alteração no fluxo magnético calculada por meio da equação 3.6 utilizando água como referência e as características da esfera descritas na secção 2.5.

$$\Delta\Phi_{sph} = \frac{\chi_{ar} - \chi_{H_2O}}{\mu_0} B_e \Delta I_{nt_{esf}} \quad (3.6)$$

3.2 Modelo utilizado para pacientes

O cálculo da concentração de ferro no fígado é feito através da comparação da voltagem medida experimentalmente com o biosusceptômetro e a estimativa do fluxo magnético utilizando os dados coletados do paciente.

Para construir um modelo do torso do paciente devemos ter algumas considerações. Em primeiro lugar, o valor da susceptibilidade magnética dos componentes principais do tronco (músculo, osso e tecido adiposo) é próximo da susceptibilidade magnética da água, com uma variação máxima de 10 %. Assim, utilizando a bolsa de água é criada uma referência quase homogênea com a susceptibilidade magnética da água, eliminando o problema da variação da susceptibilidade para diferentes corpos devido às diferenças na geometria, e permitindo a utilização do princípio de medição diferencial (equação 3.4).

A segunda consideração está relacionada com a geometria do fígado e do pulmão. Para simplificar o cálculo, o fígado é modelado como uma esfera, e o pulmão como um cilindro. A figura (3.1) mostra as distâncias características do modelo.

O volume do fígado é calculado usando os dados dos pacientes (equação 3.7) [15]. O raio do pulmão é igual que o raio do fígado e a sua altura igual ao diâmetro. Outro parâmetro importante usado para calcular o campo recíproco é a distância entre o fígado e pulmão e entre a pele e fígado, medição feito com a ajuda de imagens de ultrassom.

$$Volume_l(ml) = 13 * Altura(cm) + 12 * Peso(kg) - 1530 \quad (3.7)$$

Em resumo, a contribuição para o fluxo magnético é devida à ferritina homogeneamente distribuída num fígado esférico com uma susceptibilidade

Figura 3.1: Representação do torso do paciente. Um fígado esférico com raio (RF), e um pulmão cilíndrico com raio (RPu). $D - FPe$ é a distância entre o fígado e a pele, e $D - FPu$ entre o fígado e o pulmão.

magnética $\chi_{f_{tn}}$, e o ar e tecido distribuído num pulmão cilíndrico com susceptibilidade magnética χ_{pul} .

Aplicando a equação 3.4 com as características do modelo descritas anteriormente

$$\Delta\Phi = \frac{\chi_{f_{tn}}}{\mu_0} B_e \Delta Int_{fig} + \frac{(\chi_{pul} - \chi_{H_2O})}{\mu_0} B_e Int_{pul} \quad (3.8)$$

A susceptibilidade magnética volumétrica é proporcional à concentração da amostra e da susceptibilidade magnética mássica ($\chi_{f_{tn}} = C_{f_{tn}} \chi_{f_{tn_m}}$). Fazendo a correlação com a voltagem adquirida (equação 3.5)

$$\Delta V - \Delta V_{ref} = C \frac{C_{f_{tn}} \chi_{f_{tn_m}}}{\mu_0} B_e \Delta Int_{fig} + C \frac{(\chi_{pul} - \chi_{H_2O})}{\mu_0} B_e Int_{pul} + C\alpha \quad (3.9)$$

onde α é um fator de correção para as medições, como resultado das contribuições do ar entre a superfície da água e o Dewar, e os possíveis erros induzidos com os supostos do modelo. O fator de correção (α) é calculado usando a equação (3.9) os dados dos voluntários e a hipótese que a concentração de ferritina nos voluntários é $0,250 \text{ g}_{Fe}/\text{g}_{wt}$.

Finalmente, a equação para calcular a concentração de ferro no fígado em unidades de mg_{Fe}/g_{wt} é

$$C_{ftn} = \frac{1}{\chi_{ftn_m} B_e Int_{fig}} \left[\mu_0 \left(\frac{\Delta V - \Delta V_{ref}}{C} - \alpha \right) - (\chi_{pul} - \chi_{H_2O}) B_e Int_{pul} \right] \quad (3.10)$$

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1 Medidas no *phantom*

Com o objetivo de homogeneizar todas as medições do *phantom*, minimizando possíveis fontes de variação entre as medições realizadas em dias diferentes, as seguintes considerações foram tidas em conta: a quantidade de água na bolsa, a posição do *phantom* na cama e a posição de cama dentro das bobinas foi fixada para todas as medições. Com estas condições foram tomadas medidas do *phantom* desde as 11:00 até às 18:00. Esse período reflete um momento típico quando os pacientes foram medidos. Os resultados obtidos foram expressos como uma percentagem de variação relativa à média (Figura 4.1). O valor médio das oito medidas foi 241,3 mV, com um desvio padrão de 10,8 mV. A distribuição das variações é simétrica em torno do zero, com uma variação máxima de cerca de 6 % acima e abaixo da referência.

4.2 Medições com soluções de ferro

Soluções de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ foram feitas para avaliar a resposta biosusceptométrica em uma faixa de massas de Fe entre 0,05 g e 1,0 g, utilizando um volume de amostra de 500 ml. O método de medição foi o mesmo utilizado para medir a concentração de ferro hepático descrito no Capítulo 2, com uma distância entre a parte superior da amostra e a bobina gradiométrica mais próximo de 2,0 cm (Figura 4.2).

Na segunda parte do ensaio, a massa de Fe variou entre 33 mg e 160

Figura 4.1: Variação percentual das medidas consecutivas no phantom no mesmo dia

Figura 4.2: Resposta do biosusceptômetro para soluções de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, num volume de 500 ml. O gráfico mostra o ajuste linear com uma correlação $R^2 = 0,993$

mg, e o volume da amostra foi de 32 ml, o método de medição foi o segundo descrito no Capítulo 2; que consiste em mover a amostra continuamente abaixo do gradiômetro, com uma distância amostra-gradiômetro de 1,0 cm (Figura 4.3).

Figura 4.3: Resposta do biosusceptômetro para soluções de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, num volume de 32 ml. O gráfico mostra o ajustamento linear com $R^2 = 0,977$

O limite de detecção (LOD) para as duas medições foi de 96 mg e 25 mg, respectivamente. A diferença entre os dois valores encontrados, pode estar relacionada com o fato que no segundo método, quando a subtração é feita entre as duas medidas (com e sem a amostra sob o sensor) atua como um filtro diferencial, removendo o sinal de fundo, tornando assim, o resultado mais preciso.

4.3 Medidas com soluções de ferripolimaltose

O complexo Fe^{+3} -hidróxido de polimaltose (ferripolimaltose) em uma solução com uma concentração de 50 mg/ml foi usada para testar a sensibilidade do biosusceptômetro, usando uma série de diluições deste composto num volume de 32 ml. O método de medição foi o segundo descrito no Capítulo 2, com uma distância amostra-gradímetro de 1,0 cm (Figura 4.4). Calculado por meio do ajuste da curva, a sensibilidade foi de $27,5 \frac{\text{mV}}{\text{mg/ml}}$ e o limite de detecção foi de 0,68 mg/ml.

Figura 4.4: Resposta do biosusceptômetro a várias soluções de Ferripolimaltose ($R^2 = 0,995$)

4.4 Medidas com nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPM) utilizadas foram ferritas dopadas com manganês e revestidas com ácido cítrico ($MnFe_2O_4$ -Citrate), dissolvidas em água a várias concentrações. A magnetização de saturação das NPM foi de 51,2 *emu/g*, e a solução de nanopartículas tinha uma concentração de 23,17 *mg/mL*, correspondendo a $1,7 \times 10^{12}$ *Particles/μl*.

As medições foram efetuadas num volume de 30 ml com diferentes diluições das nanopartículas; o método experimental utilizado foi o segundo descrito no Capítulo 2. As medições foram realizadas em três distâncias diferentes (1,1 cm; 1,5 cm e 2,5 cm) a partir da parte superior da amostra à bobina do gradiômetro mais próxima (Figures 4.5, 4.6 and 4.7), levando em consideração uma espessura do Dewar de 0,5 cm, e o gradiômetro localizado na parte mais baixa do Dewar.

Figura 4.5: Resposta do biosusceptômetro para diferentes massas de nanopartículas magnéticas a uma distância de 1,1 cm do gradiômetro ($R^2 = 0,991$)

A Tabela (4.1) apresenta a sensibilidade calculada por meio da curva de ajuste, e o limite de detecção (LOD) para cada distância com um 5 % de incerteza.

Distância A-G (cm)	LOD (μg)	Sensibilidade ($\text{fWb}/\mu\text{g}$)
1,1	3,3	3,7
1,5	4,0	2,8
2,5	4,5	1,3

Tabela 4.1: Limite de detecção (LOD) e sensibilidade de NPM para três distâncias amostra-gradiômetro (A-G)

A comparação do LOD de nosso sistema e outros já relatados na literatura são difíceis, visto que existem diferenças no método de medição de nanopartículas magnéticas em sistemas biológicos; alguns equipamentos medem o campo remanente e outros medem a suscetibilidade magnética em amostras

Figura 4.6: Resposta do biosusceptômetro para diferentes massas de nanopartículas magnéticas a uma distância de 1,5 cm do gradiômetro ($R^2 = 0,987$)

com volumes muito pequenos.

Mediante medições de campo remanente num sistema baseado em um SQUID encontraram que o limite mínimo detectável é de 10 *ng* de NPM a uma distância de 1,7 cm do gradiômetro [18].

Do mesmo modo, o campo remanente foi medido em simulações de ensaios imunológicos. Em [19] com um SQUID de uso geral, a mínima quantidade detectável foi $2,39 \times 10^{10}$ partículas ligadas a células cancerosas. Em [20] uma quantidade de 0,93 *ng* de NPM foi detectada. Com um SQUID de alta de temperatura de transição a quantidade mínima detectável foi de 2,4 *pg* [21].

Por outro lado, no caso da susceptibilidade magnética, medindo a resposta da amostra a um campo de magnetização (“driven field”), foi encontrado um mínimo de detecção de 17 *ng* a uma distância de 1,0 *cm* [22] e 100 *pg/mL* de

Figura 4.7: Resposta do biosusceptômetro para diferentes massas de nanopartículas magnéticas a uma distância de 2,5 cm do gradiômetro ($R^2 = 0,983$)

amostra [23]. O método de imagem de partículas magnéticas (MPI) é constituído por um campo de magnetização (“driven field”) AC que magnetiza as NPM, e tirando vantagem do comportamento não linear da curva de magnetização dessas partículas, o segundo ou o terceiro componente harmônico é medido; deste modo a feita a construção de uma imagem com a distribuição das partículas na amostra. Nesse tipo de sistema o mínimo detectável de NPM foi de 100 μg a uma distância de 30 mm [24], 100 μg a uma distância de 100 mm [25, 26], e 100 μg a uma distância de 35 mm [27].

Usando o sistema descrito (Capítulo 2) e tendo em conta o LOD encontrado, o biosusceptômetro pode ser usado para MPI, onde a limitação é a capacidade de reconhecer duas fontes magnéticas próximas, determinada pelo raio do gradiômetro ($r = 1 \text{ cm}$) [18]. Em termos do número de NPM, o LOD foi $2,40 \times 10^{11}$ que é relativamente alto comparado com relatado em simulações de

ensaios imunológicos [20, 23]. O limite mínimo detectável em imunoenaios é inferior, devido ao pequeno volume utilizado (μl), no entanto, o biosuscetômetro pode ser usado para este tipo de experiências, se o volume da amostra aumentar até alcançar a quantidade de NPM do limite de detecção. Posteriormente, com 37 de NPM num volume de 32 ml, foi avaliada a dependência do sinal com a distância amostra-gradiômetro (Figura 4.8). O método de medição foi o mesmo descrito acima, mas tomando como referência a água.

Figura 4.8: A dependência do sinal com a distância amostra-gradiômetro. Curva vermelha corresponde ao ajuste com $R^2 = 0,985$

A relação entre o fluxo magnético produzido pela amostra (ϕ) e a distância amostra-gradiômetro (z) foi proporcional a $1/z^3$, em acordo com o fato que o sinal vem de um campo dipolar [26].

O objetivo da segunda parte das medições consistiu na detecção de NPM num volume que simula a ligação de nanopartículas de um órgão ou estrutura específica. Para isso, a bolsa de água usada na medição com pacientes

desempenhou o papel de tecido fisiológico, porque a susceptibilidade magnética da água é semelhante ao tecido; e um volume cilíndrico de 500 ml cheio com soluções de NPM simulado um órgão. O método de medição foi o mesmo utilizado nas medições para concentração de ferro hepático descritos no Capítulo 2. Acima do cilindro tem 1,0 cm de água, e 1,0 cm entre a superfície da água e o gradiômetro (2,0 cm de distância amostra-gradiômetro).

A Figura (4.9) mostra a resposta para massas de NPM entre 0,58 mg e 4,63 mg, nesta faixa o sensor foi saturado devido à grande contribuição da magnetização das NPM; Devido a isso, a sensibilidade do SQUID foi ajustada na interface eletrônica em "X10". Para evitar a saturação na sensibilidade máxima (X100), as massas foram reduzidas para uma faixa entre 29 μg e 463 μg (Figure 4.10). Com a sensibilidade máxima o limite de detecção foi de 15 μg , que é maior que os valores encontrados anteriormente (Tabela 4.1) empregando o segundo método de medição; isso acontece porque o método atua como um filtro diferencial, e atenua a contribuição do fundo reduzindo o limite de detecção, de acordo com os resultados encontrados com soluções de $\text{FeCl}_3 6\text{H}_2\text{O}$.

Figura 4.9: Resposta do biosusceptômetro a soluções de nanopartículas magnéticas, o controle do SQUID com uma sensibilidade de X10

Figura 4.10: Resposta do biosusceptômetro a soluções de nanopartículas magnéticas, o controle do SQUID com uma sensibilidade de X100

4.5 Mediões em voluntários

Medidas em um grupo de 13 voluntários (Tabela 4.2) foram realizados a fim de calcular o fator de correção α na equação 3.4. O cálculo foi feito para uma concentração média de ferro de $0,250 \text{ mg}_{Fe}/g_{wt}$, o valor achado foi

$$\alpha = 3,75 * 10^{-15} \text{ Tm}^2$$

O valor de α é dado em unidades de fluxo magnético (Weber ou Tm^2) e será utilizado para calcular a concentração de ferro hepático em pacientes e em uma grande população de voluntários assintomáticos.

O fator de correção é usado para agrupar as medidas biosusceptométricas em uma distribuição normal centrada em $0,250 \text{ mg}_{Fe}/g_{wt}$ e para normalizar as contribuições que não foram tidas em conta no modelo matemático.

O fluxo magnético total resultante da presença do torso do voluntário ($\Delta\Phi$) foi calculado com a ajuda do fator de calibração (C) medido no dia e a diferença

Voluntário	Idade	Altura (m)	Peso (Kg)	Raio do torso (cm)
1	59	1,70	72	14,2
2	26	1,70	63	12,4
3	27	1,74	86	15,1
4	20	1,81	73	12,9
5	21	1,70	84	14,0
6	23	1,78	100	16,4
7	43	1,75	82	13,5
8	33	1,86	96	15,3
9	21	1,93	98	15,1
10	42	1,80	83	15,4
11	41	1,88	90	14,2
12	59	1,78	89	16,7
13	26	1,67	57	12,1

Tabela 4.2: *Dados dos voluntários. O raio do torso foi calculado utilizando o perímetro*

de tensão ($\Delta V - \Delta V_{ref}$). Na Figura 4.11 a resposta do biosusceptômetro (fluxo magnético) é mostrada em relação com o raio do torso, apesar de ser um pequeno grupo de voluntários uma fraca correlação (0,469) pode ser observada entre as duas variáveis. Embora este não seja um valor grande, não é raro encontrar estas correlações entre as variáveis biológicas. Também se pode argumentar que a baixa correlação é devido à outra variável, a concentração de ferro no fígado é diferente para cada voluntário, e não é levado em consideração nestas análises.

Quando o raio do torso diminui a tensão de saída torna-se mais negativa, a razão de esta resposta pode ser devido a que o volume de água na bolsa é dependente com o raio do torso, consequência de que a distância entre a pele e a superfície da água tem de ser constante entre os pacientes (1,0 cm). Com a diminuição do volume de água na bolsa, a condição de medição diferencial (equação 3.2) poderia não ser completamente satisfeita. Outras medições devem

ser feitas num grupo maior de voluntários, incluindo uma ampla gama de raios de torso.

Figura 4.11: Influência do raio do torso no sinal de saída do biosusceptômetro. Ajuste linear com $R^2 = 0,469$

A fim de avaliar as flutuações das medições causadas por erros na localização do fígado por imagens ultrassônicas, pelo posicionamento do paciente e de variação da distância entre a pele do paciente e o gradiômetro; medições foram feitas em dias diferentes no mesmo voluntário (voluntário número 1 na Tabela 4.2).

A Figura 4.12 mostra a concentração de ferro hepático para oito medições. Há um conjunto de dados positivos e outros negativos. Uma hipótese para explicar este resultado está relacionada com a contribuição do pulmão que dá um valor de susceptibilidade negativo. Este fato é reforçado porque em voluntários normais, a concentração de ferro é pequena e o conjunto com o torso fica num ponto entre diamagnético e paramagnético, fazendo a medição mais propensa a erros experimentais. Assim, faz mais sentido considerar no cálculo da média da concentração de ferro apenas os valores positivos obtidos na série de medições. A concentração de ferro no fígado tem um valor médio de $0,256 mg_{Fe}/g_{wt}$ (linha

vermelha na Figure 4.12) com um desvio padrão de $0,142\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{g}_{\text{wt}}$.

Figura 4.12: Medições da concentração de ferro hepático em dias diferentes para o mesmo voluntário

4.6 Medições em pacientes

Medições foram realizadas em um grupo de 48 pacientes com doenças relacionadas com a sobrecarga de ferro no fígado (talassemia e anemia falciforme). Um resumo dos dados dos pacientes são apresentados na Tabela 4.3.

	Média	Desvio padrão	Variação
Idade (anos)	25,2	13,8	6 - 63
Altura (m)	1,60	0,16	1,16 - 1,86
Peso (kg)	54,5	15,0	22 - 80
Raio do torso (cm)	12,5	2,0	9,1 - 18,9

Tabela 4.3: Características gerais dos pacientes medidos com o biosusceptômetro

Na figura 4.11 foi mostrado o efeito do raio do torso no fluxo magnético resultante, consequentemente o efeito será refletido no fator de correção (α), por

consequente, o valor de α não pode ser aplicado para analisar todas as medições de pacientes. O grupo de voluntários não é uma amostra representativa de todos os pacientes, a Figura 4.13 mostra a comparação da distribuição dos raios dos torsos.

Figura 4.13: Distribuição dos valores dos raios do torso para os voluntários e pacientes

Tendo em conta a discussão acima foram selecionadas as medições dos pacientes cujo raio do torso estava dentro do intervalo do raio do torso dos voluntários (12,1 cm - 16,7 cm); dos 48 pacientes 26 estão dentro do intervalo mencionado. A concentração de ferro no fígado foi calculada e é mostrada na figura 4.14.

Estes resultados mostram 2 valores negativos que podem ser devido a um erro de posicionamento do paciente. Normalmente, quando isso é notado o paciente deve ser reposicionado e medir novamente. Então existem 11 medições na faixa 0 - 0,5 mg que está associado com uma sobrecarga menor, 9 estão na faixa de 0,5 - 1,0 mg que pode ser considerada uma sobrecarga intermediária e,

finalmente, apenas 4 mostraram uma sobrecarga no intervalo de 1,0 - 3,0 mg. De acordo com Angulo et al 2008, estes níveis são de pequeno risco e reflete o fato de que todos os pacientes estão sendo tratados no Hemocentro de Ribeirão Preto. Em geral, as medições de concentração de ferro no fígado em pacientes assintomáticos e em pacientes foram consistentes com as medições anteriores em um ambiente não clínico.

Figura 4.14: Concentração de ferro no fígado nos pacientes

Capítulo 5

CONCLUSÕES

O trabalho realizado mostrou que foi possível operar o susceptômetro no novo local com a mesma sensibilidade que tinha quando estava localizado no Departamento de Física, FFCLRP-USP. Essa observação é importante pois a nova localização está próxima a várias torres de TV, rádio e telefonia celular que são fontes de ruído de radiofrequência e exigem especial atenção na blindagem dos SQUID. Além disso, a nova localização possui uma vizinhança de maior ruído magnético de baixa frequência que a anterior, o que também exigiu cuidados adicionais no ajuste do sistema, desde o balanceamento do gradiômetro até os filtros para o sinal.

O processo de medida nos voluntários e pacientes segue um processo bayesiano, onde as incertezas são modificadas periodicamente após observações de novos dados ou resultados. Logo, quanto mais medidas forem feitas mais precisa será a curva que irá fornecer o fator de correção α na equação 3.4.

As medidas realizadas com os simuladores físicos contendo as nanopartículas magnéticas mostraram o potencial do sistema para estudos *in vivo*, quando as nanopartículas magnética estão dispersas em grandes volumes e distantes do sensor.

Referências Bibliográficas*

- [1] CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. *Introduction to Magnetic Materials*. Second. [S.l.]: IEEE Press, 2009.
- [2] ARVIN, W. F.; KUMAR, S. Noninvasive liver iron measurements with a room-temperature susceptometer. *Physiol Meas.*, v. 28, n. 4, p. 349–361, 2007.
- [3] MALIKEN, B. D. et al. Room-temperature susceptometry predicts biopsy-determined hepatic iron in patients with elevated serum ferritin. *Ann Hepatol*, v. 11, n. 1, p. 77–84, 2012.
- [4] MARINELLI, M. et al. Non-invasive measurement of iron overload in the human body. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, 2006.
- [5] MARINELLI, M. et al. Total iron-overload measurement in the human liver region by the magnetic iron detector. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 57, n. 9, p. 2295–2309, 2010.
- [6] FARREL, D. E. et al. Magnetic measurement of liver iron stores: engineering aspects of a new scanning susceptometer based on high-temperature superconductivity. *IEEE Transactions on magnetics*, v. 43, n. 11, 2007.
- [7] FARREL, D. E. et al. A new instrument designed to measure the magnetic susceptibility of human liver tissue *In vivo*. *IEEE Transactions on Magnetism*, v. 43, n. 9, 2007.
- [8] CARNEIRO, A. A. O. et al. Liver iron concentration evaluated by two magnetic methods: magnetic resonance imaging and magnetic susceptometry. *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 54, p. 122–128, 2005.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- [9] BATTS, K. P. Iron overload syndromes and the liver. *Modern Pathology*, v. 20, p. S31 – S39, 2007.
- [10] JENSEN, P. D. Evaluation of iron overload. *British journal of Haematology*, v. 124, n. 6, p. 697–711, 2004.
- [11] BACON, B. R. Measurement of hepatic iron concentration. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 13, p. 64–65, 2015.
- [12] ANDRA, W.; NOWAK, H. (Ed.). *Magnetism in medicine. A handbook*. [S.l.]: Wiley-VCH, 2007.
- [13] PENAN, S. D. et al. An ac magnetizing field biosusceptometer using a squid based sensor with additional compensation module. *IEEE Transactions on applied superconductivity*, v. 13, n. 2, p. 348–351, 2003.
- [14] PENNA, S. D. et al. Squid sensor with additional compensation module for operation in an ac applied field. *Journal of Physics: conference series*, v. 43, p. 1247–1249, 2006. 7th European Conference on Applied Superconductivity.
- [15] CARNEIRO, A. A. O. *Um biossceptômetro superconductor AC para quantificar o fero hepático*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2001.
- [16] WILLIAMSON, S. et al. (Ed.). *Biomagnetism. And interdisciplinary approach*. [S.l.]: Plenum Press, New York, 1983.
- [17] FARREL, D. E. et al. Magnetic measurement of human iron stores. *IEEE Transactions on magnetics*, MAG-16, n. 5, 1980.
- [18] GE, S. et al. Development of a remanence measurement-based squid system with in-depth resolution for nanoparticles imaging. *Physics in Medicine and Biology*, v. 54, p. N177–N188, 2009.
- [19] HASHIMOTO, S. et al. The measurement of small magnetic signals from magnetic nanoparticles attached to the cell surface and surrounding living cells using a general-purpose squid magnetometer. *Physics in Medicine and Biology*, v. 54, p. 2571–2583, 2009.

- [20] CARVALHO, H. R. et al. Quantitative magnetic immunoassays with a squid by means of mutual inductance calculations. *IEEE Transactions on Magnetics*, v. 44, n. 11, p. 4472–4475, 2008.
- [21] ENPUKU, K. et al. Biological immunoassays without bound/free separation utilizing magnetic markers and hts squid. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, v. 17, n. 2, p. 816–819, 2007.
- [22] ENPUKU, K. et al. Ac susceptibility measurement of magnetic markers in suspension for liquid phase immunoassay. *Journal of Applied Physics*, v. 108, n. 034701, 2010.
- [23] YANG, S. Y. et al. Clinical applications in assaying ultra-low-concentration bio-markers using hts squid-based ac magnetosusceptometer. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, v. 23, n. 3, p. 1600604, 2013.
- [24] OTHMAN, N. B. et al. Magnetic nanoparticle imaging using harmonic signals. *IEEE Transactions on Magnetics*, v. 43, n. 11, p. 3776–3779, 2012.
- [25] ENPUKU, K. et al. Magnetic nanoparticle imaging using cooled pickup coil and harmonic signal detection. *Japanese Journal of Applied Physics*, v. 52, n. 8R, p. 087001, 2013.
- [26] MORISHIGE, T. et al. Highly sensitive magnetic nanoparticle imaging using cooled-cu-hts-superconductor pickup coils. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, v. 24, n. 4, p. 1800105, 2014.
- [27] BAI, S. et al. Magnetic particle imaging utilizing orthogonal gradient field and third harmonic signal detection. *IEEE Transactions on Magnetism*, v. 50, n. 11, p. 5101304, 2014.