

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
NANOPARTÍCULAS HUECAS PARA SU  
POTENCIAL USO COMO AGENTE DE  
CONTRASTE**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**NÉSTOR MENDOZA MUÑOZ**

**ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatorias**

### ***A mis padres: Eva Muñoz Aguilar y Felipe Mendoza Arroyo.***

*Por su cariño y apoyo que me han mostrado siempre sin los cuales no hubiera sido posible la culminación de mis estudios, sin duda, el mejor legado que me han podido dar. Gracias.*

### ***A mi esposa: Nayeli Granillo Chan***

*Por su apoyo, paciencia y por compartir conmigo todos estos momentos y los que faltan. Te amo.*

### ***A mis hijos: Leonardo Cuauhtémoc y Zuriel Iztlli***

*Mis lucecitas del camino, las razones por las cuales creo que no hay nada imposible.*

### ***A mis suegros: María Luisa y Cuauhtémoc***

*Gracias por el apoyo brindado en estos años, no existe manera de pagar lo que han hecho por nosotros.*

### ***A mis hermanos: Miriam, Oscar y Yolotzín***

*Con mucho cariño para aquellos con los que viví grandes aventuras, pero sobre todo con los que compartí la mayor: la de crecer.*

## **Agradecimientos**

### ***A mi asesor Dr. David Quintanar y a la Dra. Adriana Ganem:***

*Por su apoyo y conocimientos transmitidos además de darme la oportunidad de realizar este trabajo, pero sobre todo, por la manera inigualable en que nos encaminan hacia la investigación.*

### ***A mis compañeros:***

*A todos aquellos que de alguna manera fueron parte de esta etapa: Clara, Cristina, Edgar, Elizabeth J., Elizabeth P., Gerardo, Liliana, Luis, Lupita, Mónica, Marlen, Zaida...., etc.*

### ***A mis amigos:***

*Por los años de amistad y por esas anécdotas irrepetibles: Carlos, Erick, Fabián, Germán y Víctor Hugo.*

## A. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ACUS	Agente de Contraste para Ultrasonido
ANADEVA	Análisis de Varianza
EPR	Enhanced Permeability and Retention
f	Frecuencia
FDA	Food Drug Administration
fps	Frames per second (cuadros por segundo)
IDE	Iodopamida Etil Ester
IP	Índice de Polidispersidad
MDS	Método de Desplazamiento de Solvente
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
NC's	Nanocápsulas
NE's	Nanoesferas
NFT	Naftaleno
NP's	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEG	Polietilenglicol
PFC's	Perfluorocarbonos
PLGA	Ácido poli láctico-co-glicólico
PVAL	Poli Vinil Alcohol
RDI	Región de Interés
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

SNC	Sistema Nervioso Central
TC	Tomografía Computarizada
TCEFU	Tomografía Computarizada de Emisión de Foton Único
TEP	Tomografía de Emisión de Positrones
TPP	Tamaño de Partícula Promedio
US	Ultrasonido
VPEG	Valor Promedio de Escala de Grises

**B. ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Espectro de frecuencias de las ondas sonoras.	18
Figura 2. Oscilación lineal de las burbujas a presiones acústicas moderadas	26
Figura 3. Oscilación no lineal de las burbujas a presiones acústicas altas.	27
Figura 4. Mecanismo de acción de un ACUS basado en la reflexión de la onda acústica.	29
Figura 5. Mecanismo de acción de un ACUS basado en la resonancia de la partícula.	30
Figura 6. Diagrama de flujo experimental	52
Figura 7. Procedimiento esquematizado de la preparación de NP's huecas mediante el MDS seguido de la sublimación del núcleo volátil.	54
Figura 8. Dispositivo para la determinación de la ecogenicidad in vitro de las NP's huecas elaboradas.	60
Figura 9. Distribución de tamaño de partícula para la preparación NPE12.	60
Figura 10. Distribución de tamaño de partícula para la preparación NPE10.	60
Figura 11. Efecto del volumen de fase orgánica sobre la TPP	67

Figura 12. Efecto del volumen de fase orgánica sobre la TPP	67
Figura 13. Grafico que muestra el porcentaje de NFT cuantificado en cada uno de las etapas y partes de la muestra durante el proceso de elaboración.	69
Figura 14. Porcentaje encapsulado y perdido de NFT relativo, en cada una de las etapas.	70
Figura 15. Distribución de tamaño de partícula para cada una de los sistemas. Para el caso de NP's compuestas de Eudragit® RS. A) antes de liofilizar; B) sin crioprotector; C) con 3% de manitol; D) con 5% de manitol.	72
Figura 16. Distribución de tamaño de partícula para cada una de los sistemas. Para el caso de NP's compuestas de PLGA. A) antes de liofilizar; B) sin crioprotector.	74
Figura 17. Micrografías obtenidas mediante MEB para preparaciones de NP's compuestas de Eudragit® RS y PLGA. A) Preparación NPE1; B) Preparación NPE10; C) Preparación NPP0; D) Preparación NPP12.5.	75
Figura 18. Micrografías obtenidas mediante MET para preparaciones de NP's compuestas de Eudragit® RS y PLGA. A) Preparación NPE1; B) Preparación NPE10; C) Preparación NPP0; D) Detalle de preparación NPP0; E) Preparación NPP12.5; F) Detalle de la preparación NPP12.5; G) Preparación NPP25; H) Detalle de la preparación NPP25.	77



- Figura 19. Curva de calibración para la determinación de la densidad a través de la formación de un gradiente in situ mediante ultracentrifugación. 80
- Figura 20. Bandas de cada uno de los sistemas generadas en gradiente de Percoll™ mediante centrifugación, las líneas punteadas representan los estándares externos 82
- Figura 21. Imágenes de US de los diferentes sistemas probados donde se muestra la RDI. A) Preparación NPE1; B) Preparación NPE10; C) Preparación Blanco consistente de Agua desionizada; D) Preparación NPP0; E) Preparación NPP25. 84
- Figura 22. Histograma de distribución del valor asignado en la escala de grises para la RDI de cada uno de los ultrasonogramas analizados. A) Preparación NPE1; B) Preparación NPE10; C) Preparación Blanco consistente de Agua deionizada; D) Preparación NPP0; E) Preparación NPP25. 86

**C. ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Valores de impedancia acústica para aire, agua y diferentes tejidos biológicos. (Tomada de El-Sherif, 2003a)	19
Tabla 2. ACUS desarrollados y aprobados para su uso clínico.	32
Tabla 3. Evolución generacional de los ACUS y algunas características de cada generación. (Modificado de Burns, 2000).	33
Tabla 4. Matriz de experimentos para la determinación del efecto de la concentración de NFT y volumen de acetona sobre el TPP.	55
Tabla 5. Resultados de la prueba cualitativa de solubilidad de los distintos materiales en acetona, agua y etanol.	62
Tabla 6. TPP correspondiente a NP's de la preparación NPE12.	62
Tabla 7. TPP correspondiente a NP's de la preparación NPE10.	62
Tabla 8. TPP ( $nm \pm \sigma$ ) para cada uno de los lotes preparados de acuerdo a la matriz de experimentos.	65
Tabla 9. ANADEVVA de dos factores para la determinación del efecto del porcentaje de NFT y volumen de fase orgánica sobre el TPP ( $\alpha=0.05$ )	66
Tabla 10. Porcentajes de NFT presentes en cada una de las etapas y partes de la muestra ( $\mu \pm \sigma$ )	68

Tabla 11. Resultados de la prueba de resuspendibilidad para el caso de NP's compuestas de Eudragit <sup>®</sup> RS ( $\mu \pm \sigma$ )	71
Tabla 12. Resultados de la prueba de resuspendibilidad para el caso de NP's compuestas de PLGA ( $\mu \pm \sigma$ )	73
Tabla 13. Densidades para cada uno de los sistemas evaluados determinadas mediante formación de gradiente in situ de Percoll <sup>™</sup> mediante centrifugación de acuerdo a la curva de calibración.	81
Tabla 14. VPEG para cada uno de los sistemas analizados mostrando también el área de la RDI	87

## **D. ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo 1. Estructuras químicas y generalidades de los materiales utilizados .....	99
Anexo 2. Curva de calibración de NFT en etanol: agua (1:9).....	104

## I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un área multidisciplinaria que consiste en la creación y utilización de materiales, dispositivos o sistemas de escala nanométrica. En la actualidad la nanotecnología juega un papel importante en el desarrollo de sistemas con aplicaciones biomédicas como son biomarcadores y biosensores que faciliten el diagnóstico de patologías [Klibanov, 1999]. En la última década se ha sugerido el uso de nanopartículas como acarreadores de fármacos anticancerígenos con el objetivo de reducir los efectos adversos e incrementar la eficacia de sustancias activas. Este tipo de tecnologías pueden presentar varias ventajas también en imagenología [Wheatley, et al., 2004].

Una de las modalidades imagenológicas con mayor aceptación y uso en el ámbito médico es el Ultrasonido ya que presenta varias ventajas sobre otras como los Rayos X, la RMN y la Tomografía Computarizada. Una de esas ventajas es su bajo costo; tanto en equipo como en costo del estudio, que es no invasivo, es en tiempo real, etc. Sin embargo, su principal desventaja es que al tratarse de una modalidad que basa su diagnóstico en la interpretación de una imagen, resulta obvio que dicha imagen debe de ser de alta calidad. En este sentido algunas estructuras corporales o derivadas de patologías no pueden ser visualizadas adecuadamente, es el caso de la glándula mamaria, hígado, un tumor, etc. Es por ello que en los últimos años se han introducido agentes de contraste que mejoran la calidad de las imágenes obtenidas.

A pesar del avance que ha representado la introducción de agentes de contraste para el diagnóstico ultrasónico, aún no es posible la detección eficiente de tumores, además de presentar una serie de efectos adversos, ambos problemas están relacionados en parte con el tamaño actual de los agentes de contraste comercialmente disponibles, se ha sugerido que la miniaturización de estos sistemas podría mejorar la capacidad de detectar tumores en una variedad de órganos, como hígado, riñón, páncreas, etc. [Goldberg, 2000].

Se ha planteado que los agentes de contraste de tamaño cercano a la micra o submicrónicos pueden ser útiles en nuevas aplicaciones diagnósticas como la detección de tumores ya que pueden atravesar el endotelio linfático después de una inyección intersticial y su tamaño es lo bastante pequeño para poder extravasar a través de los vasos sanguíneos con alta permeabilidad, como los que se encuentran en los tumores activos [\[Bloch, et al., 2005\]](#).

Las predicciones con la revolución de los agentes de contraste es que para el año 2010, el ultrasonido, con la utilización de una variedad de estos agentes, deberá ser la técnica de elección para más del 50% de los estudios imagenológicos. Además se espera la introducción de una extensa variedad de agentes de contraste con propiedades terapéuticas, en donde además de portar el gas se acompañe de sustancias antitumorales que puedan ser dirigidas y liberadas en el sitio específico "targeted imaging". Ésto, con ayuda de los recientes avances en biología molecular y celular que permitirán que los agentes de contraste sean modificados con moléculas, tales como anticuerpos o péptidos, que se unan a las células o tejidos cancerígenos [\[Goldberg, 2000\]](#).

Se ha estimado que hasta la fecha más de US\$ 1 billón han sido asignados a los centros de investigación y compañías farmacéuticas para el desarrollo y evaluación de una extensa variedad de estos agentes [\[Goldberg, 2000\]](#).

La finalidad de este trabajo es proponer una metodología que permita la elaboración de nanopartículas huecas que puedan tener un uso potencial como agente de contraste en ultrasonido, sin duda, ésto proporcionara una herramienta útil en el desarrollo de este tipo de sistemas encaminados al diagnóstico temprano de enfermedades.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **1. IMAGENOLOGÍA**

#### **1.1. Definición**

Es la parte de la Medicina que emplea diferentes modalidades para el estudio de estructuras, órganos y sistemas a través de imágenes obtenidas mediante un conjunto de equipos y métodos con el objetivo de diagnosticar patologías [Mosby, 2003].

#### **2.1. Modalidades imagenológicas**

Actualmente pueden considerarse 5 diferentes técnicas imagenológicas que son usadas para el diagnóstico clínico: Rayos X, Óptica, Medicina Nuclear, Ultrasonografía y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [Elliot, 2005; El-Sherif, 2003a; Licha, et al., 2005].

##### **2.1.1. Rayos X**

Esta técnica usa radiación ionizante de alta energía. Además de los rayos X tradicionales en esta modalidad se incluye la Tomografía Computarizada (TC) la cual consiste en una técnica asistida por computadora de Rayos X en ella se obtiene imágenes de cortes seccionales del paciente.

##### **2.1.2. Medicina Nuclear**

En esta técnica, pequeñas cantidades de radioisótopos son inyectados dentro del paciente para ayudar a visualizar las estructuras internas. Los niveles de radiación no son tan grandes como aquellos usados en los estudios de Rayos X rutinarios.

Dentro de la Medicina Nuclear se encuentran dos modalidades que han tenido un auge importante en los últimos años: la Tomografía por Emisión de Positrones (TEP) y la Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (TCEFU). En TEP se requiere que sea inyectado intravenosamente una pequeña cantidad de un rastreador (radioisótopo) generalmente ligado a un azúcar simple. El *scanner* detecta las señales que el trazador emite a medida que viaja a través del cuerpo. La TEP puede diferenciar entre tumores benignos y malignos. Por otro lado la TCEFU es una técnica que adquiere cortes tomográficos a través de la región de interés. Las imágenes adquiridas se basan en la concentración de los radionúcleos administrados. La TCEFU es inferior a la TEP debido a la sensibilidad y resolución alcanzada.

#### 2.1.3. Ultrasonografía

La Ultrasonografía o comúnmente llamada Ultrasonido (US) como se le denominará en este trabajo consiste en la técnica diagnóstica que busca observar el interior del cuerpo humano por medio de ondas ultrasónicas que atraviesan la piel y se reflejan en la superficie de los órganos, o el objeto que encuentre a su paso. En secciones posteriores se detallarán algunos aspectos importantes de esta técnica.

#### 2.1.4. Óptica

Esta técnica se apoya en la obtención de imágenes a través sistemas ópticos tradicionales mediante cámaras miniaturizadas como es el caso de la endoscopia. En la actualidad en esta categoría se incluyen novedosas modalidades que basan su principio en la absorción y dispersión elástica de luz visible así como del infrarrojo cercano.



### 2.1.5. Resonancia Magnética Nuclear

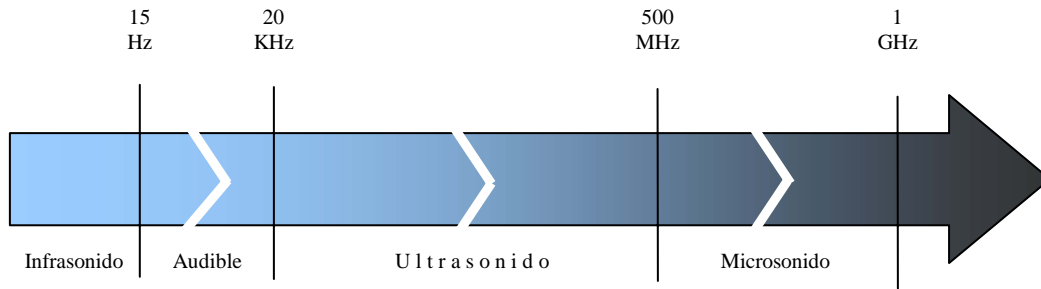
Esta técnica se basa en la absorción y emisión de energía en el rango de la radiofrecuencia del espectro electromagnético. La RMN utiliza fuertes campos magnéticos que actúan sobre los átomos que componen diferentes sustancias en el cuerpo como el hidrógeno. Los diferentes tejidos emiten diferentes ondas en función de su densidad y de su contenido en agua. Una computadora traduce los patrones de estas ondas en imágenes muy detalladas de las partes del cuerpo en las cuales se pueden identificar anomalías que pueden ser utilizadas para un diagnóstico médico.

## 3. ULTRASONIDO

### 3.1. Conceptos

El sonido es una vibración mecánica, éste viaja a través de un medio con una velocidad definida y en forma de una onda, pero, a diferencia de las electromagnéticas, la onda del sonido es un disturbio mecánico del medio mediante el cual se transporta la energía del sonido. Al igual que existe un espectro de ondas electromagnéticas, dentro del cual la luz visible ocupa una mínima porción se tiene un espectro de vibraciones acústicas, en el cual la gama de frecuencias audibles ocupa un porcentaje reducido.

Las vibraciones de un cuerpo elástico cuya frecuencia es mayor a 500 MHz se denominan microsonidos. Las comprendidas entre 500 MHz y 20 kHz se llaman ultrasonidos. El sonido audible se encuentra entre los 20 kHz y los 15 Hz. Los infrasonidos se encuentran por debajo de los 15 Hz (ver Figura 1) [[Wilson, et al., 2003](#)].



**Figura 1. Espectro de frecuencias de las ondas sonoras.**

Como se definió anteriormente el US es una técnica diagnóstica exploratoria que utiliza para el caso clínico sonidos de frecuencias entre 3 y 10 MHz. El diagnóstico por ultrasonidos depende del medio físico en el que el sonido se propaga y de cómo las ondas ultrasónicas interaccionan con los materiales biológicos que atraviesan, especialmente con las estructuras de los tejidos blandos del cuerpo humano.

### 3.2. Modo de acción

Un transductor emite ondas acústicas de alta frecuencia (de entre 3.5-10 MHz), dicho transductor puede ser colocado sobre la piel o en algunas ocasiones insertado en alguna cavidad del cuerpo. Las ondas ultrasónicas viajan del exterior del cuerpo a través de los fluidos corporales hasta que golpean un tejido o el borde de un hueso. En el límite de dos tejidos, parte de la onda ultrasónica es transmitida a través del tejido y otra parte es reflejada. La cantidad reflejada depende de la diferencia de impedancias de los dos tejidos. La impedancia acústica ( $Z$ ) se define como el producto de la densidad ( $\rho$ ) y la velocidad del sonido ( $c$ ) en un medio tal como se muestra en la ecuación 1. Parte de la energía reflejada regresa al transductor cuyo papel cambia de emisor a receptor y posteriormente se amplifica la señal.

$$Z = \rho c \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Las superficies de dos tejidos blandos tienen impedancias similares, y por consiguiente la reflexión de la interfase tejido/tejido debe ser menor que de la tejido/hueso o de la tejido/aire debido a la gran diferencia de impedancias entre el hueso o aire y el tejido (ver Tabla 1). Esta impedancia desigual puede tener ventajas (incrementar realce de una imagen) o desventajas (impedir la visualización más allá de un hueso) dependiendo del tejido y de su localización [El-Sherif, 2003a].

**Tabla 1. Valores de impedancia acústica para aire, agua y diferentes tejidos biológicos. (Tomada de El-Sherif, 2003a)**

Material	Impedancia (Rayl)
Agua	1.4
Hueso	6.0
Aire	0.000415
Sangre	1.61
Hígado	1.65
Riñón	1.62

### 3.3. Ventajas del US

El US como herramienta médica representa una invaluable ayuda para el diagnóstico de enfermedades. Comparado con otras modalidades diagnósticas imagenológicas, el US tiene las siguientes ventajas [El-Sherif, et al., 2003b; Lewin, 2000; Burns, 2000]:

- a) No invasivo
- b) En tiempo real; 30 fps
- c) Portátil; lo que lo hace una invaluable herramienta en las unidades de hospitalarias de emergencia
- d) Seguro; el ultrasonido es una modalidad de radiación no ionizante.
- e) Barato; los *scanner* mas sofisticados cuestan menos de la mitad comparado con otras modalidades.

### 3.4. Modalidades del US

Las técnicas ultrasónicas más importantes que están actualmente disponibles o bajo investigación son [Simpson, 2000; Nayaran, 1999; Jong, et al., 2000]:

#### 3.4.1. Fundamental

En la técnica ultrasónica conocida como fundamental la onda ultrasónica es transmitida y recibida en el mismo valor de frecuencia (frecuencia fundamental  $f_0$ ). En el modo A, la representación gráfica es unidimensional, proporcional a la intensidad de ecos reflejados en una línea; mientras que en el modo B la representación de los ecos reflejados es bidimensional, en forma de puntos luminosos de claridad variable dependiendo de su frecuencia y profundidad (escala de grises); finalmente el modo M o de movimiento es una representación en modo A, pero de forma continua, variando en función del tiempo. De las técnicas mencionadas anteriormente la más utilizada en la clínica práctica es el modo B ya que proporciona imágenes en tiempo real bidimensionales en donde la mejora en resolución se ve reflejada en el aumento del brillo en la escala de grises.

#### 3.4.2. Armónica

En esta técnica la onda ultrasónica es transmitida a cierta frecuencia fundamental, pero, a diferencia de la técnica anterior, la onda recibida no sólo posee la frecuencia fundamental, sino que también contiene frecuencias armónicas superiores ( $2f_0$ ,  $3f_0, \dots, nf_0$ ); subarmónicas ( $f_0/2$ ,  $f_0/3$ ,  $f_0/4, \dots$ ,  $f_0/n$ ) y ultrarmónicas ( $3f_0/2$ ,  $5f_0/2$ ,  $7f_0/2, \dots$ ,  $nf_0/2$ ). En esta modalidad, el sistema de ultrasonido separa la señal recibida en la parte armónica y la parte fundamental procesando solamente la parte armónica.

De estas frecuencias la segunda armónica ( $2f_0$ ) es la de mayor intensidad y la que comúnmente es utilizada para fines clínicos, la aplicación de las demás está en fase de investigación. Este tipo de respuestas son generadas debido a fenómenos no lineales entre la onda ultrasónica y objetos dispersores introducidos para este fin.

### 3.4.3. Doppler

La modalidad Doppler es una herramienta importante para el diagnóstico vascular no invasivo, por lo tanto, tiene un gran uso en angiografía. Se basa en el efecto Doppler que se define como el cambio de la frecuencia de sonido recibida respecto a la emitida, cuando la distancia entre el emisor y el receptor cambia, por el movimiento de la fuente del sonido o del receptor.

En estudios clínicos se utilizan dos modalidades Doppler: el continuo y el pulsado. En el modo continuo, la transmisión del sonido y recepción de la información ocurren simultáneamente en el transductor. Esto permite una mayor sensibilidad del método, pero no la ubicación espacial de la señal. Se utiliza en monitoreos fetales y estudios vasculares. En el modo pulsado, se envían pulsos de ondas de ultrasonido que “interrogan” el vaso sanguíneo, esperando que la información regrese antes de enviar el próximo pulso. Esto permite la discriminación espacial, investigando en forma exacta el vaso a estudiar.

Dentro del sistema pulsado, la información, es decir, el cambio de frecuencia o velocidad, se puede codificar de distintas maneras dando origen a tres submodalidades distintas:

Doppler Pulsado: Se despliega una curva de velocidad (o frecuencia) contra el tiempo en que los glóbulos rojos pasan por el volumen en estudio.

Doppler Color: Se codifica el promedio de las velocidades asignándoles un color que va a estar determinado en relación con el sentido del flujo. El color generalmente rojo indica el flujo que se acerca al transductor y el azul el que se aleja.

Doppler Power Color: Se codifica la amplitud de la señal, es decir, la cantidad de glóbulos rojos moviéndose. No da información de sentido del movimiento, pero permite detectar flujos muy lentos.

#### 3.4.4. Inversión de pulso

En la modalidad inversión de pulso, una secuencia de dos ondas ultrasónicas es transmitida a través del tejido. La segunda onda es transmitida después de un conveniente retraso y es una replica invertida de la primera onda, y la suma de las dos respuestas es cero. Para un sistema no lineal, la respuesta podría no ser una copia invertida. La suma no es cero y el residuo está relacionado con el grado de no linealidad. La mayor ventaja de la inversión de pulso sobre las modalidades armónicas convencional y Doppler es que esta puede funcionar sobre todo el ancho de banda de la ecoseñal captada, lo que resulta, en imágenes con una resolución superior.

### 3.5. Desventajas del US

Usando las técnicas ultrasónicas anteriormente mencionadas, es posible generar imágenes de manera segura y en tiempo real; sin embargo, el diagnóstico final depende de la calidad de la imagen obtenida mediante US.

La principal desventaja del diagnóstico mediante US es la dificultad de diferenciar entre tejidos (anormal y normal) debido a las similares propiedades acústicas. El tejido anormal y el saludable tienen impedancias acústicas similares; por tanto, la reflexión en la interfase debe ser pequeña, y la detección del tejido anormal resulta difícil [Nayaran, 1999]. Por lo tanto, las señales recibidas al mismo tiempo producen imágenes que tienen bajo contraste, o bien la señal es de baja intensidad. Por ejemplo, el uso de la imagen ultrasónica en la detección de cáncer de mama se ha limitado debido a la baja resolución que presentan estas estructuras.

Para mejorar la resolución se hace necesario el incremento de la frecuencia de insonificación, incrementándose la atenuación, esto limita su uso mas profundo y puede traer consigo bioefectos adversos. El limitado contraste ha conducido al desarrollo de los agentes de contraste que aumentan la señal acústica y por ende mejoran la calidad de las imágenes obtenidas [Basude, et al., 2001; Chen, et al., 2003; Georgiou, et al., 2003].

## **4. AGENTES DE CONTRASTE PARA ULTRASONIDO**

### **4.1. Definición**

Un agente de contraste para US (ACUS) es un sistema capaz de alterar la absorción, reflexión o refracción de las ondas ultrasónicas; con la finalidad de aumentar la diferencia de señal presente entre el tejido de interés y su alrededor [Wheatley, et al., 1999; Morawski, et al., 2005]. En la actualidad el término ACUS suele restringirse a aquellos sistemas particulados de tamaño micrométrico denominados “microburbujas”; en este contexto un ACUS consiste de microesferas con huecos o poros en su estructura interna, de entre 3-10  $\mu\text{m}$ , en donde estos huecos o poros son “llenados” con algún tipo de gas [Chatterjee, et al., 2005].

### **4.2. Fundamentos físicos**

En general, un ACUS deberá modificar una o más de las propiedades acústicas del tejido de interés. Esencialmente, deberá existir una impedancia acústica desigual entre el ACUS y el fluido en que se encuentra suspendido, generalmente la sangre. La impedancia acústica es producto de la densidad del medio y la velocidad del sonido en ese medio. Los parámetros acústicos más importantes que se ven afectados son: la sección transversal ( $\sigma$ ), atenuación, y la velocidad de propagación, aunque esta última es menos frecuente.

La sección transversal está relacionada con la intensidad de ultrasonido recibida  $I_r$  de acuerdo a la ecuación 2; donde,  $I_i$  es la intensidad incidente, y  $d$  la distancia entre el transductor que emite la radiación y la partícula dispersora [Ophir, et al., 1989].

$$I_r = \frac{I_i \bar{\sigma}}{4\pi d^2} \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Para múltiples partículas este valor se multiplica por el número de ellas. Esta relación asume que el tamaño de la partícula es mucho menor que la longitud de onda. Esta es una de las razones por la cual el tamaño de los ACUS se encuentran en el orden de 3-10  $\mu m$ , que es mucho menor que la longitud de onda, (a 3.5 MHz la longitud de onda en agua es de 500  $\mu m$ ). La sección transversal  $\bar{\sigma}$  ( $m^2$ ) puede calcularse mediante la aproximación de Born mostrada en la ecuación 3 [Morse, et al. 1975]:

$$\bar{\sigma} = \frac{4\pi}{9} k^4 r^6 \left[ \left( \frac{\kappa_s - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{1}{3} \left( \frac{3(\rho_s - \rho)^2}{2\rho_s + \rho} \right)^2 \right] \dots\dots \text{Ecuación 3}$$

Donde  $k$  es el numero de ondas =  $2\pi/\lambda$  ( $m^{-1}$ );  $\lambda$  es la longitud de onda ( $m$ );  $\kappa_s$  es la compresibilidad de la partícula dispersora;  $\kappa$  es la compresibilidad del medio;  $\rho_s$  es la densidad de la partícula dispersora ( $kg/m^3$ );  $\rho$  es la densidad del medio ( $kg/m^3$ ). Esto puede ser expresado según la ecuación 4:

$$\bar{\sigma} = A \left[ B^2 + \frac{1}{3} C^2 \right] \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

Donde A es el término de amplitud, B es el término de compresibilidad y C es el término de densidad.



El objetivo en el desarrollo de un ACUS es maximizar la sección transversal. En la ecuación 3 se puede ver que  $\bar{\sigma}$  se relaciona a la sexta potencia del radio y a la cuarta potencia de la frecuencia. Para un radio dado, al aumentar la frecuencia de onda se incrementa la sección transversal, mientras que para una frecuencia dada, al aumentar el radio se incrementa la sección transversal. Sin embargo, es conocido que las partículas que atraviesen los capilares pulmonares deben tener un tamaño menor a  $6 \mu m$ , este es el límite superior de tamaño [Bouakaz, et al., 1998; Jong, et al., 1992; Raisinghani, et al., 2002].

El termino de compresibilidad y el de densidad de la ecuación 4 demuestra que las propiedades físicas de la partícula comparadas con las propiedades del medio son de considerarse. De estos dos términos la diferencia de compresibilidad toma mayor relevancia. Por ejemplo, la compresibilidad del aire y el agua es  $2.3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{dina}$  y  $4.6 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{dina}$ , respectivamente. En comparación, la compresibilidad de una sustancia rígida como níquel es  $5.0 \times 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{dina}$ . Usando una partícula con radio de  $5 \mu m$  y una frecuencia de  $5 \text{ MHz}$  (el rango medico utilizado es  $3\text{-}10 \text{ MHz}$ ), la sección transversal de un líquido, sólido y gas pueden calcularse como aproximadamente  $0 \text{ m}^2$ ,  $6.65 \times 10^{-15} \text{ m}^2$  y  $0.38 \text{ m}^2$ , respectivamente.

Las microburbujas tienen una ventaja adicional al ser utilizadas como ACUS debido a que pueden actuar como osciladores armónicos y resonar cuando son insonificados a su respectiva frecuencia de resonancia. Este fenómeno incrementa la sección transversal en 3 veces el orden de magnitud. Una relación aproximada que entre la frecuencia de resonancia  $f \text{ (s}^{-1}\text{)}$  y el radio de la partícula  $r \text{ (m)}$ , pero, ignora la tensión superficial, efectos térmicos, y efectos debidos a la viscosidad, se da en la ecuación 5.

$$f_r = \frac{1}{2\pi r} \sqrt{\frac{3\gamma P}{\rho}} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 5}$$

Donde  $P$  es presión ( $N/m^2$ );  $\gamma$  es  $C_p / C_v$  (cociente de las capacidades caloríficas igual a 1.4 para un proceso adiabático en aire) y  $\rho$  densidad del medio ( $kg/m^3$ ). Usando valores para aire y presión ambiente se tiene que la ecuación 5 puede simplificarse a la expresión dada en la ecuación 6 donde la frecuencia de resonancia  $f_o$  es expresada en  $kHz$  y el diámetro  $d$  en  $\mu m$ .

$$f_o = \frac{6500}{d} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 6}$$

Esto indica que conforme el diámetro disminuye se ve aumentado el valor de frecuencia de resonancia [Phillips, et al., 1998; Jong, et al., 1994].

La respuesta de una burbuja de gas a la onda ultrasónica depende de la amplitud de la presión acústica y puede dividirse en tres regímenes. Para pequeñas amplitudes de la onda ultrasónica, la alternada expansión y compresión de la burbuja tiene la misma amplitud y, por tanto, el tamaño de la burbuja se relaciona linealmente con la presión acústica aplicada, esto puede apreciarse gráficamente en la figura 2.

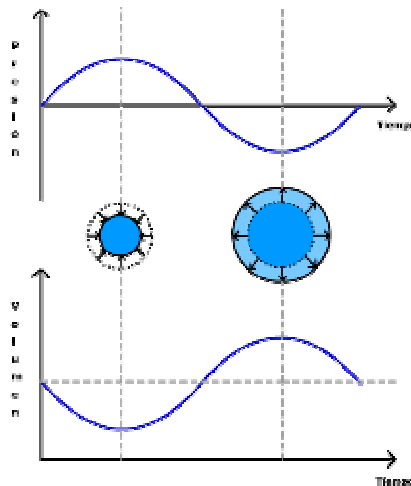
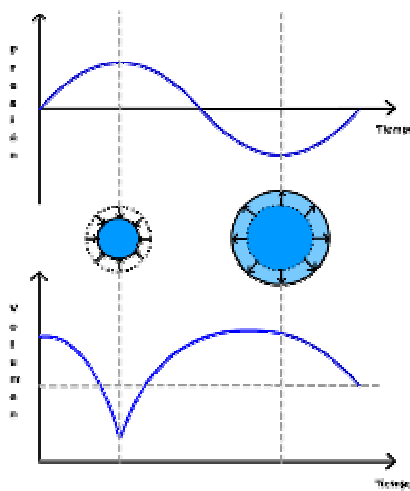


Figura 2. Oscilación lineal de las burbujas a presiones acústicas moderadas

Cuando la presión acústica aplicada a las burbujas es ligeramente alta llevan al punto en que la alternada expansión y contracción en el tamaño de las burbujas no sea igual en amplitud, como puede verse en la figura 3. Esta respuesta no lineal da origen a la generación de frecuencias armónicas las cuales son emitidas por las burbujas. Como se vio anteriormente este fenómeno es el fundamento de la modalidad ultrasónica armónica; debido a que los tejidos y paredes de los vasos no oscilan en esta modalidad, esto permite la obtención de imágenes con el contraste específico.



**Figura 3. Oscilación no lineal de las burbujas a presiones acústicas altas.**

Si la presión acústica aplicada es muy alta se ha visto que la burbuja tiende a la ruptura y liberación del gas atrapado, una vez libre el gas es disuelto en el líquido circundante donde la velocidad de disolución dependerá de las propiedades del gas como son: difusibilidad y solubilidad. [Hoff, 1996]. Los principios físicos que describen la estabilidad de las burbujas de gas de tamaño micrométrico en un líquido se discuten a continuación. La expresión para la diferencia de presión  $\Delta P$  entre el exterior y el interior de la burbuja de radio  $r$  en un líquido con tensión superficial y esta dada por la ecuación de Laplace (ecuación 7).

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \dots\dots\dots \text{Ecuación 7}$$

Por ejemplo, considerando como 0.1 mm el radio de una burbuja de champaña, la diferencia de presiones debería ser  $2(7.4 \times 10^{-2} \text{ Nm}^{-1})(1.0 \times 10^{-4} \text{ m}) = 1.5 \text{ kPa}$ . Sin embargo, para una burbuja de tamaño de 10  $\mu\text{m}$  la presión deberá ser 15 kPa, esto resultaría en el rápido colapso de cualquier burbuja que no se encuentre bien estabilizada. De hecho las burbujas libres de éste tamaño tienen tiempos de vida media extremadamente cortos.

Epstein y Plesset (1950) propusieron una relación de contracción (o alargamiento) de una burbuja en un medio líquido, la cual toma en cuenta el coeficiente de difusión del gas y su solubilidad en el medio en que se encuentra suspendido, la relación puede observarse en la ecuación 8.

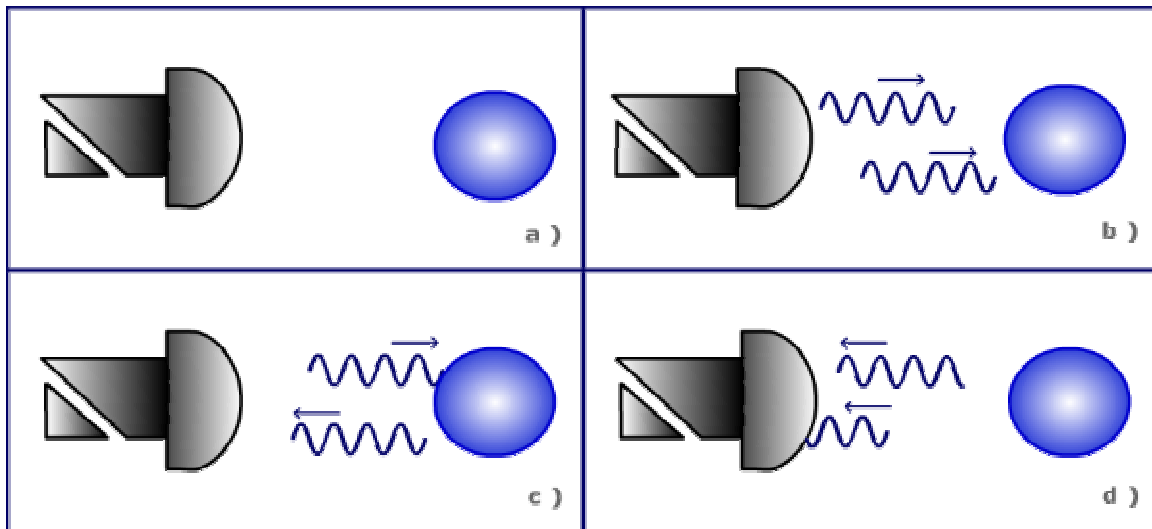
$$\frac{\partial r}{\partial t} = \frac{-Dy}{r} \left[ \frac{1 - \frac{C_i}{C_s} + \frac{2\gamma}{rP_h}}{1 + \frac{4\gamma}{3rP_h}} \right] \left( 1 + \frac{r}{\pi Dt} \right) \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 8}$$

donde  $r$  es el radio de la burbuja (m);  $D$  es el coeficiente de difusión (m/s);  $C_i/C_s$  es la razón de la concentración del gas disuelto  $C_i$  entre la concentración de saturación  $C_s$ ;  $\gamma$  es la tensión superficial (N/m);  $P_h$  es la presión hidrostática (N/m<sup>2</sup>);  $t$  es el tiempo (s);  $y$  es igual a  $(RTC_0)/P_hM$ ; donde  $M$  es el peso molecular;  $R$  es la constante de los gases y  $T$  la temperatura absoluta. Basado en la ecuación anterior Jong (1996) calculó el tiempo de vida media de una burbuja de gas libre en agua saturada con aire el cual fue de  $5 \times 10^{-3}$  s para una burbuja de 100  $\mu\text{m}$  y de solo 6.0 s para una burbuja 10  $\mu\text{m}$ . Considerando que toma 2 s para una burbuja que es inyectada intravenosamente atravesar al ventrículo derecho del corazón y de 10 – 27 s para viajar a por todo el órgano, las burbujas de aire libres son claramente inadecuadas.

Se ha visto que gases con baja solubilidad y elevados pesos moleculares tienen una mucha mayor persistencia. Actualmente los gases que han ganado preferencia en el desarrollo de ACUS son los perfluorocarbonos (PFC's) y hexafluoruro de azufre ( $SF_6$ ).

#### 4.3. Mecanismo de acción de los ACUS

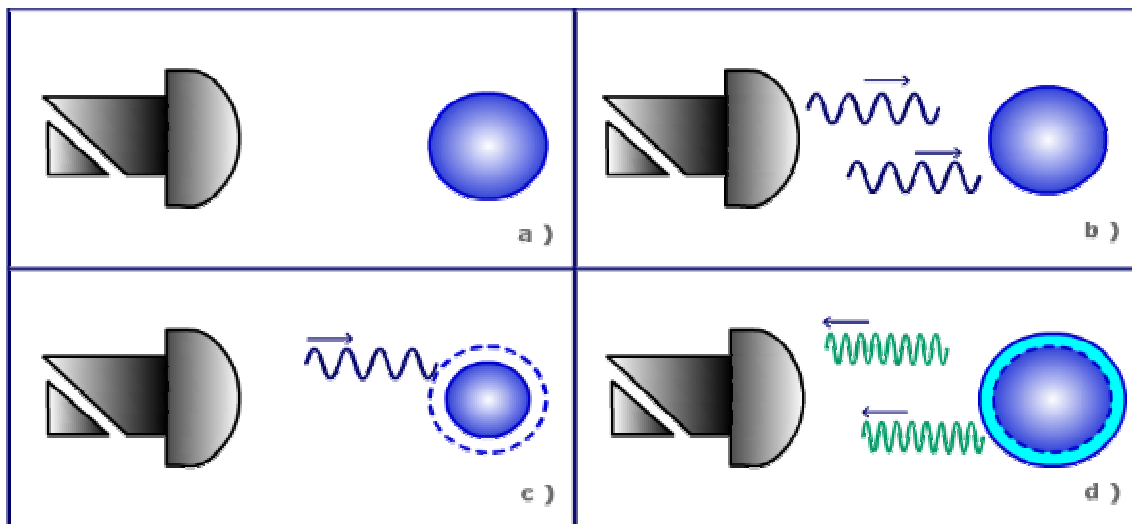
Cuando una burbuja de gas es insonificada por una onda ultrasónica, ésta genera dos posibles respuestas. Primero, la onda puede ser reflejada a partir de la superficie de la burbuja debido a la gran diferencia de impedancias entre el medio circundante y el gas dentro de la burbuja tal como se indica en la Figura 4.



**Figura 4. Mecanismo de acción de un ACUS basado en la reflexión de la onda acústica.**  
 a) A la izquierda un transductor y a la derecha un ACUS; b) El transductor emite una serie de ondas acústicas a cierta frecuencia; c) Parte de las ondas emitidas son reflejadas en la interfase ACUS/medio circundante; d) El transductor recibe las señales reflejadas a la misma frecuencia de emisión.

La segunda, la mas importante, cuando el tamaño de la burbuja es mucho menor que la longitud de onda de la onda ultrasónica; en esta situación la burbuja es forzada hacia la reducción-expansión de su volumen.

En la situación más simple, el tamaño de la burbuja disminuye en el medio ciclo positivo de la onda ultrasónica, y la burbuja se expande en el medio ciclo negativo (oscilación lineal) aunque también podría darse que la oscilación sea no lineal. En ambos casos la pulsación del volumen de la burbuja es dependiente de la frecuencia y muestra un claro máximo a una frecuencia específica, que es nombrada frecuencia de resonancia, y se relaciona de manera inversa con el tamaño. El fenómeno de resonancia es un efecto importante debido a que la burbuja en resonancia se comporta como una fuente de sonido, mejor dicho como un reflector pasivo y, por tanto, produce un aumento en la señal comparada con una burbuja que no se encuentra en resonancia [Frinking, et al., 2000]. Lo anterior puede verse esquematizado en la Figura 5.



**Figura 5. Mecanismo de acción de un ACUS basado en la resonancia de la partícula.**  
 a) A la izquierda un transductor y a la derecha un ACUS; b) El transductor emite una serie de ondas acústicas a cierta frecuencia; c) En el ciclo positivo de la onda el ACUS sufre una contracción d) En el ciclo negativo de la onda el ACUS sufre una expansión y emite una serie de ondas con una frecuencia diferente a la emitida por el transductor.

#### 4.4. Historia los ACUS

Los inicios del US de contraste comienzan con la publicación de Gramiak y Shah (1968) quienes al inyectar verde de indocianuro (un agente de contraste utilizado en Rayos X) dentro de la aorta ascendente observaron un aumento importante en el contraste durante la realización de una ecocardiografía, llegando a la conclusión que la mejora se debía a la producción de microburbujas *in situ* inducidas por cavitación. Pero no fue sino hasta los 80's que comenzó el desarrollo de los ACUS comerciales con las observaciones que condujeron hacia la estabilización y miniaturización de las microburbujas. Carroll et al. (1980) demostraron que las burbujas de nitrógeno encapsuladas con gelatina eran lo suficientemente estables para ser usados en US. Mientras que Feinstein et al. (1984) demostraron que las microburbujas sonicadas a partir de albúmina sérica humana originaban partículas pequeñas y estables capaces de atravesar la circulación pulmonar y opacificar el ventrículo izquierdo. Estos descubrimientos originaron un interés significativo en desarrollar ACUS que estuvieran disponibles comercialmente para un gran número de compañías farmacéuticas.

Diversos programas fueron iniciados para desarrollar un ACUS que fuera fácil de usar a nivel clínico. Shering AG (Berlín, Alemania) fue la primera compañía en lograr este objetivo. El primer AC fue Echovist® (1982), seguido por Levovist® (1985) nombrado así por ser capaz de opacificar el ventrículo izquierdo. Los agentes desarrollados por Shering fueron aprobados en Europa, Japón y Canadá. Molecular Biosystems Inc. (MBI; San Diego, CA) desarrollo Alburnex®, el primer AC aprobado por la FDA en 1994 para su distribución en los Estados Unidos. Este agente se basó en la tecnología de encapsular y estabilizar las microburbujas de aire. Esto resultó en una reducida longevidad *in vivo* y limitó el uso comercial de estos agentes [Miller, et al. ,2004].

El uso de varios tipos de PFC's incremento la persistencia de las primeras microburbujas introducidas a principios de los 1990's. Muchos agentes bajo desarrollo incorporaron la tecnología PFC's en sus formulaciones. Dentro de esos productos se incluyen la reformulación de Albunex<sup>®</sup> incorporando la novedosa tecnología. El producto final fue nombrado Optison<sup>®</sup> (MBI, USA), el cual fue aprobado por la FDA para su uso comercial en 1997. Han sido desarrollados agentes adicionales que utilizan como gas PFC's y una variedad de constituyentes en la pared que encapsula el gas. Dos de estos agentes actualmente aprobados por la FDA son Definity<sup>®</sup> (2001) distribuido por Bristol Myers Squibb (New York, NY) e Imagent<sup>®</sup> (2002), distribuida por IMCOR (IMCOR, San Diego, CA), una división de Photogen Technologies Inc. Otro agente, SonoVue<sup>®</sup> (Bracco Diagnostics Inc., Princenton, NJ) utiliza hexafluoruro de azufre, un gas fluorinado de baja solubilidad, el cual está aprobado solamente en Europa (2001) [Miller, et al., 2004; Harvey, et al. 2002].

La tabla 2 resume los ACUS mencionados anteriormente.

**Tabla 2. ACUS desarrollados y aprobados para su uso clínico.**

<b>Microburbujas</b>	<b>Año de introducción</b>	<b>Fabricante y/o comercializador</b>
Echovist <sup>®</sup>	1982	Schering AG, Alemania
Levovist <sup>®</sup>	1985	Schering AG, Alemania
Albunex <sup>®</sup>	1994	MBI, USA
Optison <sup>®</sup>	1997	Amersham Health, USA
Echogen <sup>®</sup>	1997	Sonus, USA
SonoVue <sup>®</sup>	2001	Bracco Italia
Definity <sup>®</sup>	2001	Bristol-Myers Squibb, USA
Imagent <sup>®</sup>	2002	IMCOR Inc., USA



De esta manera la evolución de los ACUS puede situarse como una serie de generaciones, las cuales se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3. Evolución generacional de los ACUS y algunas características de cada generación. (Modificado de Burns, 2000).**

Generación	Formulación	Características
0	Burbujas de gas libres	No pueden atravesar paso transpulmonar
1	Burbujas de aire encapsulado	Si atraviesan paso transpulmonar
2	Burbujas de gas de baja solubilidad encapsulado	Mejora estabilidad
3	Partículas poliméricas vacías "llenas de aire"	Es posible controlar propiedades acústicas

#### 4.5. Composición de los ACUS

Para comprender mejor la composición de este tipo de sistemas es conveniente clasificarlos de acuerdo a sus propiedades físicas estableciendo cinco tipos agentes [Frinking, et al., 2000; Wheatley, et al., 1999]:

- a) Soluciones acuosas.
- b) Burbujas de gas libres y/o estabilizado
- c) Burbujas de gas encapsulado
- d) Emulsiones
- e) Suspensiones coloidales

#### 4.5.1. Soluciones acuosas

Este tipo de preparaciones correspondieron a los primeros ACUS y consistían en soluciones acuosas de compuestos como: verde de indocianuro, solución salina, renografina, dextrosa 5%. Las burbujas producidas generalmente por cavitación tenían tiempos de vida muy cortos.

#### 4.5.2. Burbujas de gas libre

A este tipo de AC pertenece Echovist<sup>®</sup>, el cual consistió de cristales de galactosa que contenía numerosos sitios para atrapar gas. El gas era liberado como burbujas cuando las partículas eran disueltas en una solución saturada de galactosa esto previo a la inyección el tamaño promedio de las burbujas era de 3  $\mu\text{m}$  (pero un rango de tamaño superior a los 15  $\mu\text{m}$ )

Al igual que Echovist<sup>®</sup> su predecesor Levovist<sup>®</sup> consistió de partículas de galactosa, poseía mayor estabilidad y un rango de tamaño mas estrecho (90% < 8  $\mu\text{m}$ ), era capaz de atravesar los pulmones y podría ser usado en la obtención de imágenes del ventrículo izquierdo. Levovist<sup>®</sup> difería de Echovist<sup>®</sup> no solo por la vía en la que las partículas de galactosa producían las microburbujas sino que el primero contenía 0.1% de ácido palmítico, que estabilizaba las burbujas. [[Shering, 2000](#)]

#### 4.5.3. Burbujas de gas encapsulado

##### 4.5.3.1. *Microcápsulas proteínicas*

Albunex<sup>®</sup> consistió de esferas de albúmina llenas de aire con diámetro promedio de 3-5  $\mu\text{m}$ , producidas mediante sonicación de una solución 5% de albúmina sérica humana. El tiempo de vida media después de la inyección es de alrededor de 1 minuto, y después de 3 minutos mas del 80% del ACUS se encuentra en hígado, siendo estos cortos tiempos de vida media su principal desventaja. La segunda

generación de este ACUS fue nombrada Optison<sup>®</sup> con un tiempo de vida media mucho mas largo que su antecesor (10 minutos), consiste en microcápsulas estériles no pirogénicas de albúmina humana y perflutren (un PFC) de tamaño entre 3- 4.5  $\mu\text{m}$  [Amersham Health, 2003].

Por otro lado el producto Quantison<sup>®</sup> (Andaris Ltd., Nottingham, UK) consistente de microburbujas de pared compuesta de albúmina sérica humana (recombinante) y producidas por spray-drying resultaron ser considerablemente mas resistentes a la presión que Albunex<sup>®</sup> debido a que su pared presenta un mayor espesor [Jong, 1996].

Asimismo, en la Universidad de Nebraska se ha evaluado una mezcla consistente de 1 parte de dextrosa y 5 partes de albúmina sérica humana para estabilizar perfluoropropano. El agente en investigación denominado PESDA<sup>®</sup>, tiene un tamaño de partícula de 4.7  $\mu\text{m}$  y una concentración de  $6 \times 10^9$  partículas /mL [Porter, 1996].

#### 4.5.3.2. Liposomas

En esta categoría se haya el mayor número de ACUS desarrollados y que actualmente se encuentran en el mercado. Unger (1992) describió el uso de liposomas de dipalmitoilfosfatidil colina que contienen diferentes gases como nitrógeno, oxígeno, xenón y PFC originalmente nombrados Aerosomes<sup>®</sup>. El AC Definity<sup>®</sup> consiste de liposomas en cuyo interior es encapsulado octafluoropropano, después de su preparación el tamaño de partícula se encuentra en el rango de 1.1- 3.3  $\mu\text{m}$  con un 98% por debajo de los 10  $\mu\text{m}$  [Bristol-Myer-Squibb, 2004]. Por otra parte el ACUS de Bracco Research (SonoVue<sup>®</sup>) consistente de SF<sub>6</sub> estabilizado con una pared compuesta por PEG 4000 y los fosfolípidos distearoilfosfatidil colina y dipalmitoilfosfatidil glicerol. La reconstitución del liofilizado en 5 mL de agua estéril proporciona una suspensión lechosa de  $2 \times 10^8$  burbujas/mL con un diámetro promedio de 2.5  $\mu\text{m}$  con un 98% por debajo de los 8  $\mu\text{m}$  [Bracco, 2004a].

#### 4.5.3.3. *Microesferas poliméricas*

Un grupo de la Universidad de Rochester basado en el concepto de la estabilización de burbujas mediante partículas porosas, ha desarrollado microesferas de 1-2  $\mu\text{m}$  preparadas mediante precipitación de iodopamida etil ester (IDE) en dimetil sulfóxido/etanol por adición de una solución de poli (vinil pirrolidona), la enorme cantidad de cavidades creadas permite la estabilización de diminutas burbujas de gas lo que permite su uso como ACUS [*Parker et al., 1987*].

Shering AG (Alemania) tiene bajo desarrollo lo que será su nuevo ACUS Sonavist<sup>®</sup> el cual consiste en cápsulas de n- butil-2-cianoacrilato con un tamaño promedio de 1  $\mu\text{m}$  y de espesor de alrededor de 100 *nm*. La delgada pared permite que la cápsula entre en resonancia cuando es estimulada por el ultrasonido y produce una fuerte señal armónica. Son preparadas mediante emulsificación-polimerización del monómero [*Fritsch, et al., 1994*].

Wheatley et al. (2001) han logrado obtener un ACUS polimérico biodegradable compuesto de Ácido Poli (DL- Láctico-co-glicólico) (PLGA). Las microcápsulas son formadas mediante la encapsulación de un núcleo sólido propenso a ser volatilizado mediante liofilización después de que las cápsulas han sido endurecidas. Esta metodología de encapsular sólidos volátiles es muy utilizada en la preparación de micropartículas huecas, en la que dependiendo del método de encapsulación (coacervación, evaporación de solvente, etc.) se obtiene el tamaño de partícula correspondiente [*El-Sherif, et al., 2003*]. Mediante esta metodología Cui et al. (2005) han logrado preparar microcápsulas huecas no sólo a partir de la liofilización de materiales volátiles, sino que también a partir del agua encapsulada mediante doble emulsión (W/O/W). La utilización de PLGA como material de composición de la pared tiene la ventaja de que el polímero empleado es biocompatible y biodegradable.

Por otra parte Acusphere Inc. tiene bajo investigación un ACUS denominado AI-700 consistente de microcápsulas de PLGA preparadas mediante spray-drying con poros en su estructura formados a partir de la volatilización de bicarbonato de amonio, el tamaño promedio es de 2.3  $\mu\text{m}$ . [[Straub, et al., 2005](#); [Acusphere, 2006](#)].

#### 4.5.3.4. *Microburbujas estabilizadas con surfactantes*

Finalmente, se ha reportado la obtención de microburbujas de gas estabilizadas con surfactantes, lo que genera paredes mucho mas flexibles que las de los agentes poliméricos, sin embargo, son mucho menos resistentes a la presión. Este tipo de agentes son preparados a partir de surfactantes como Span<sup>®</sup>60 y Tween<sup>®</sup> 80, utilizando como gas PFC mediante sonicación el tamaño promedio es de 1.5  $\mu\text{m}$  [[Basude, et al., 2001](#)].

#### 4.5.4. Emulsiones

Sonus Corporation, tienen bajo desarrollo diferentes tipos de emulsiones de PFC. Uno de los primeros desarrollo de esta compañía fue Echogen<sup>®</sup> existe a temperatura ambiente como un emulsión de los isómeros dodecafluoro-n-pentano y dodecafluoroisopentano (ambos líquidos), con un diámetro promedio de 0.3  $\mu\text{m}$ . Después de la inyección, estos vaporizan a la temperatura corporal. Después de la rápida difusión de los gases en la sangre las microburbujas de PFC's incrementan su diámetro entre 2 – 5  $\mu\text{m}$  [[Sonus, 2006](#)].

#### 4.5.5. Dispersiones coloidales

Hasta ahora existen muy pocos ACUS diseñados para la obtención de imágenes gastrointestinales debido a que el gas presente genera diversos artefactos, Bracco Diagnostics (Princeton, NJ) introdujo al mercado SonoRx<sup>®</sup>, este agente consiste en una suspensión de partículas de celulosa de 22  $\mu\text{m}$  cubiertas con 0.25 % de simeticona además de la incorporación de un agente antiespumante [Bracco, 2004b].

### 4.6. Uso clínico de los ACUS

Desde las investigaciones iniciales, el uso de los ACUS se ha extendido a todas las áreas clínicas y modos del ultrasonido con la excepción del monitoreo fetal, a continuación se presentan las principales áreas de impacto.

#### 4.6.1. Cardiología y angiografía

El énfasis inicial en el desarrollo de los ACUS correspondió al área de la ecocardiografía, y actualmente aún se tiene un activo interés debido al número importante de aplicaciones de diagnóstico que proporcionan, entre las cuales están [Needleman, 2003]:

- a) Identificación de estructuras cardiacas (ejem. borde del endotelio)
- b) Detección de soplos cardiacos
- c) Visualización del flujo sanguíneo
- d) Detección de regurgitación valvular
- e) Determinación de enfermedad cardiaca congénita
- f) Determinación de gasto cardiaco
- g) Estudios de perfusión

#### 4.6.2. Hepatología

Como en Rayos X y RMN, la visualización del hígado es un área de un fuerte interés en relación al aumento en el contraste ya que la visualización de órganos parenquimatosos por los métodos convencionales de US resulta problemático. Sin embargo, con la investigación en el campo de los ACUS específicos para hígado como Sonavist<sup>®</sup> (Schering AG, Alemania), Sonazoid<sup>®</sup> (Amersham Health, U.K.) y BR14 (Bracco, Italia) se abren nuevas oportunidades de diagnóstico de tumoraciones malignas. Inclusive con los agentes actuales como SonoVue<sup>®</sup> es posible la detección temprana de tumores específicamente en la fase de vascularización [*Cosgrove, 2003; Nicolau, et al., 2003*].

#### 4.6.3. Oncología

Además de la detección de tumores en hígado, el uso de los ACUS ha logrado inmiscuirse en otras áreas de la oncología, tales como la detección de tumores en el sistema nervioso central (SNC), próstata, seno, etc. La detección de tumores se da principalmente mediante la caracterización de la velocidad del flujo sanguíneo y vascularización siendo importante el uso de ACUS para estos fines. Las diferentes modalidades Doppler son las que han sido usadas para intentar predecir que tan propenso es un tumor de generar metástasis [*Wheatley, et al., 1999*].

#### 4.6.4. Ginecología

Los ACUS han sido usados en estudios ginecológicos tales como sonohisterografía (examen transvaginal del endometrio) y sonosalpingografía (examen de obstrucción en trompas de Falopio) en este tipo de estudios los ACUS son infiltrados dentro de la cavidad uterina [*Blomley, et al., 2001*].

#### 4.6.5. Tracto Gastrointestinal

Los estudios ultrasónicos gastrointestinales están severamente limitados por la presencia natural de gas que actúa como reflector. ImaRx Pharmaceutical Corp. bajo licencia de Bracco Diagnostic ha desarrollado un agente oral a base de celulosa. La celulosa actúa para dispersar y desplazar las burbujas de gas, permitiendo imágenes de buena calidad. La combinación de SonoRx<sup>®</sup> junto con un ACUS intravenoso ha sido sugerido para la detección de tumores pancreáticos [FDA, 2006].

#### 4.7. Propiedades ideales de los ACUS

Las características básicas que deben de cumplir los ACUS que pretendan ser usados en la generación de imágenes médicas deben ser [Nayaran, 1999; Raisinghani, et al., 2002]:

- a) No tóxicos
- b) Ecogénicos
- c) Menores a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro
- d) Estables (capaces de resistir la presión)
- e) Biodegradables
- f) Bioadhesivos (en ciertos casos)

Estos agentes deben ser diseñados para funciones específicas en donde debe contemplarse las propiedades de los materiales y la estabilidad *in vivo*. Por ejemplo, en un ecocardiograma se requieren agentes que sean estables por solo 5 minutos. Sin embargo, los agentes de contraste que son perfundidos en órganos internos, como el hígado, se requiere que su estabilidad sea mayor que 5 minutos.



#### **4.8. Desventajas de los ACUS comercialmente disponibles**

A pesar del avance que ha representado la introducción de microburbujas para el diagnóstico ultrasónico, aún no es posible la detección eficiente de tumores; esta limitación esta relacionada en parte con el tamaño actual de los ACUS comercialmente disponibles se ha sugerido que la miniaturización de estos sistemas podría mejorar la capacidad de detectar tumores en una variedad de órganos, como hígado, riñón, páncreas, etc. [\[Goldberg, 2000\]](#).

Por otra parte, el tamaño relativamente grande representa serios problemas de efectos adversos, los ACUS aumentan en mucho la posibilidad de que se presenten bioefectos *in vitro* relacionados con la cavitación, como la lisis celular, activación plaquetaria, trombolisis, etc.

Un número importante de estudios indican que ACUS pueden inducir cavitación inercial *in vivo* y esos bioefectos mecánicos en la forma de petequias conllevan a la ruptura capilar y al daño de las células endoteliales. Una gran cantidad de evidencias indican que la producción de los bioefectos inducidos por el US es causado por la nucleación de los ACUS insonificados [\[Hwang, et al., 2005\]](#).

#### **4.9. Desarrollo de los ACUS de tamaño nanométrico**

##### **4.9.1. Ventajas de los ACUS de tamaño nanométrico**

El uso del diagnóstico ultrasónico en la detección de cáncer se ha limitado debido a la baja resolución de las estructuras. Para mejorar la resolución se hace necesario el incremento de la frecuencia de insonificación, incrementándose la atenuación, la cual limita su uso más profundo.

Si bien es cierto que los desarrollos recientes tales como tiempo-real, transductores de alta frecuencia así como técnicas Doppler, microburbujas, han mejorado la resolución y procesamiento de las imágenes, los resultados obtenidos aún no son los adecuados. En la última década se ha sugerido el uso de nanopartículas como acarreadores de fármacos anticancerígenos con el objetivo de reducir los efectos adversos e incrementar la eficacia. Este tipo de tecnologías pueden presentar varias ventajas también en imagenología [[Wheatley, et al., 2004](#)].

Se ha planteado que ACUS de tamaño cercana a la micra o submicrónicos pueden ser útiles en nuevas aplicaciones diagnósticas como la detección de tumores ya que pueden atravesar en endotelio linfático seguido de una inyección intersticial, y su tamaño es lo bastante pequeño para poder extravasar a través de los vasos sanguíneos con alta permeabilidad, como los que se encuentran en los tumores activos. Estas pueden ser algunas de las ventajas al utilizar ACUS submicrónicos comparado con los ACUS convencionales [[Bloch, et al., 2005](#)].

Un tumor no puede sobrevivir si no es nutrido por la cantidad de sangre apropiada. Debido a la rápida formación de nuevos vasos en los tumores por angiogénesis, la vasculatura es irregular y presenta poros. Diversos estudios han identificado tres diferentes tipos de capilares en un tejido normal y sano: continuo, fenestrado y discontinuo. Sin embargo, vasos con diámetros irregulares y ramificados caracterizan la angiogénesis de un tumor, y los vasos carecen de estructuras definidas de la vasculatura normal, como arteriolas, capilares o vénulas. El espesor de la pared de los vasos no es proporcional con el tamaño de los vasos. Una diferencia importante entre la vasculatura normal y aquella formada por la angiogénesis tumoral es la tendencia de esta última a "gotear". El grado de filtración o "goteo" incrementa con el grado histológico de malignidad del tumor. Bajo condiciones fisiológicas, partículas mayores de 10 *nm* no pueden penetrar el endotelio.

Sin embargo, esta barrera de permeabilidad puede incrementarse bajo condiciones patológicas como inflamación o infiltración debida a un tumor. Esta penetración puede llegar a incrementarse a tal grado de permitir el paso a partículas de 700 nm [Wheatley, et al., 2004; Neuberger, et al., 2005].

Por otro lado, se ha visto que estructuras de tamaño nanométrico, como micelas, tienden a penetrar a través del intersticio de un tumor, este efecto se conoce como EPR (*enhanced permeability and retention*).

La posibilidad de poder diferenciar tumores benignos de malignos podría darse, por ejemplo, en el lento flujo sanguíneo presente en hemangiomas el cual podría ser fácilmente detectado, además la diferenciación entre la vasculatura que la acompaña la tumoración podría detectarse con una variedad de técnicas armónicas pertenecientes a Doppler 3D y color. El US también sería capaz de determinar la capacidad del tumor a desplazarse midiendo el grado de vascularización tumoral [Goldberg, et al., 2000].

#### 4.9.2. Estudios actuales

Hasta la fecha, existen muy pocos trabajos encaminados al desarrollo de ACUS de tamaño nanométrico, los primeros trabajos fueron publicados en 2002 por Wisner et al. [Wisner, et al., 2002] y en 2004 por Wheatley et al. [Wheatley et al., 2004]. En ambos trabajos se han logrado preparar ACUS de tamaño submicrónico por diferentes métodos. La metodología desarrollada por Wisner y colaboradores consistió en una modificación de la técnica empleada y patentada por POINT Biomedical Inc. (USA) en la preparación de microburbujas de nitrógeno envuelto en una doble pared la exterior de naturaleza proteínica y la interior compuesta por un polímero biodegradable, este ACUS se denominó biSphere®.

Posteriormente en 2005 estos mismos autores publicaron un trabajo en donde reportan la obtención de ACUS de tamaño 740 nm y 940 nm; los resultados obtenidos muestran que este tipo de ACUS presentan un comportamiento diferente al de las microburbujas formadas por paredes lípidicas y que la respuesta ultrasónica no corresponde con las predicciones teóricas. Por otra parte, este trabajo resulta interesante debido a la incursión de las nanopartículas poliméricas en el diseño de ACUS [Bloch, et al., 2005; Ottoboni, et al., 2001].

Asimismo, Wheatley et al. (2004) lograron separar por centrifugación poblaciones de tamaño nanométrico (450-690 nm) de una suspensión de microburbujas obtenidas mediante sonicación de una solución de Span<sup>®</sup> 60 y Tween<sup>®</sup> 80 en presencia de octafluoropropano. Sin embargo, la principal desventaja de estas “nanoburbujas” es la poca estabilidad *in vitro*. Adicionalmente, un trabajo reciente de estos mismos autores complementó la información acerca de este tipo de sistemas, pero, sin poder solucionar el problema de estabilidad [Wheatley et al., 2006].

Además de los estudios anteriores Couture et. al (2005) desarrollaron una serie ACUS de tamaño submicrónico que van desde los 310-970 nm a diferencia de los anteriores, este ACUS consiste únicamente en una emulsión de PFC en agua, donde el tamaño de glóbulo corresponde a los tamaños antes mencionados. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios debido a su bajo poder de resonancia asociado a que no presenta una pared rígida que pueda soportar los cambios de volumen aunado a la pronta volatilización de PFC al contacto con el medio.

## **5. NANOTECNOLOGÍA**

### **5.1. Definición**

La nanotecnología es un área multidisciplinaria que consiste en la creación y utilización de materiales, dispositivos o sistemas de escala nanométrica. En la actualidad la nanotecnología no solo juega un papel importante en el desarrollo de sistemas acarreadores de fármacos, sino que también participa en la generación de varias aplicaciones biomédicas como son biomarcadores y biosensores que faciliten el diagnóstico de patologías [\[Klibanov, 1999\]](#).

### **5.2. Nanopartículas**

#### **5.2.1. Definición**

El término nanopartículas (NP's) es comúnmente usado para definir partículas coloidales sólidas, que tienen un tamaño de entre 10 a 1000 *nm.*; las cuales dependiendo del método de preparación, pueden ser nanocápsulas (NC's) o nanoesferas (NE's). Las NC's son sistemas vesiculares en los cuales el material a encapsular es confinado en la cavidad rodeada por una membrana polimérica, por otra parte las NE's están formadas por una matriz polimérica densa en la cual el material atrapado se encuentra disperso [\[Quintanar-Guerrero, et al., 1998a; Fesssi, et al., 1998\]](#).

### 5.2.2. Métodos de preparación

Los métodos de preparación de nanopartículas pueden ser clasificados en dos grandes categorías: polimerización y emulsificación de monómeros y dispersión de un polímero preformado. Los métodos de preparación de NP's a partir de polímeros preformados pueden ser clasificados en cuatro grupos:

- a) emulsificación – evaporación
- b) “*salting out*”
- c) desplazamiento de solvente
- d) emulsificación- difusión.

Estas técnicas son similares en el sentido que involucran una solución orgánica que contiene los componentes de las NP's y que funciona como una fase interna durante la preparación, y una solución acuosa que contiene un estabilizante y que constituye el medio de dispersión de las NP's [[Quintanar-Guerrero, et al., 1998b](#)].

### 5.2.3. Método de desplazamiento de solvente

El MDS es uno de los más difundidos para la preparación de NP's debido a que es fácil y simple de implementar. Esta técnica fue primeramente descrita y patentada por Fessi *et al.* (1998). En este proceso, polímero, fármaco, y opcionalmente un estabilizante lipofílico (ejem. fosfolípidos) son disueltos en un solvente semipolar miscible con el agua, como acetona o etanol. Esta solución es vertida o inyectada dentro de una solución acuosa que contiene un estabilizante (ejem. PVAL o Polaxamero 188) bajo agitación magnética. Las NP's son formadas instantáneamente por la rápida difusión del solvente, el cual es eliminado mediante presión reducida [[Quintanar-Guerrero, et al., 1998b](#)].

El mecanismo de formación de las NP's por esta técnica ha sido explicado por la turbulencia interfacial que se genera durante el desplazamiento del solvente. Seguida la difusión violenta del solvente que es debida a la miscibilidad mutua entre los solventes. Glóbulos de solvente, probablemente de tamaño nanométrico, son formadas en torno a la interfase. Estos glóbulos son rápidamente estabilizados por el agente estabilizante, hasta la difusión completa del solvente [[Quintanar-Guerrero, et al., 1998a](#)].

## **6. TENDENCIA ACTUAL**

El desarrollo tecnológico ha mejorado la capacidad diagnóstica del US por una parte se tiene un mayor detalle anatómico y por otra es posible detectar el flujo en vasos capilares cada vez más pequeños.

De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la utilización del US seguido de los Rayos X, en oposición a las más avanzadas técnicas imagenológicas como TC y RMN, debido a la extensa y completa accesibilidad alrededor del mundo de la primera.

Los nuevos avances tecnológicos en US, incluyendo la técnica de US armónico incrementan la capacidad de disponer de ACUS debido a sus características, pudiendo incrementar significativamente la resolución debido a la prolongación del tiempo de vida del agente durante su uso. Por otro lado, el US tridimensional en su modo escala de grises y color puede mejorar la habilidad de estos agentes a diferenciar entre tumores benignos y malignos debido a que se disponen de resultados similares a la angiografía por Rayos X. Estos y otros agentes necesarios para aplicaciones particulares no han sido del todo desarrollados, y se espera estén disponibles comercialmente en la década actual.

Como resultado, esto podría tener efectos dramáticos sobre la utilización del US en áreas extensas, algunas de las cuales aún no se han explorado.

Las predicciones con la revolución de los ACUS son que para el año 2010 el US con la utilización de una variedad de estos agentes deberá ser la técnica de elección para más del 50% de los estudios imagenológicos. Esto puede significar la reducción de la examinación radiológica para la detección del infarto a miocardio, y ser reemplazada por la ecocardiografía de contraste que podría ser capaz de diferenciar la viabilidad o no viabilidad del músculo cardiaco. Con el uso de una variedad de ACUS, se incrementa el contraste y por tanto la resolución y, mas específicamente, dichos agentes pueden distinguir el tejido normal del dañado, podría mejorarse la capacidad de detectar tumores en una variedad de órganos, como hígado, riñón y páncreas. Puede anticiparse que los agentes órgano-específicos podrán mejorar la detección de tumores en la próstata, siendo estos tumores unos de los cuales no es posible su identificación debido a la ecogenicidad similar con el tejido normal.

La necesidad de incrementar el conocimiento en el área de US debe resultar en el desarrollo de una extensa red mundial para el aprendizaje, que incremente el número de personas especializadas en imagenología. Desafortunadamente para los radiólogos, el énfasis en TC y RMN ha desdeñado la difusión del US en un buen número de especialidades médicas. Los especialistas clínicos podrán incrementar sus capacidades de diagnóstico a través del uso de una variedad de AC sin la necesidad de referir a sus pacientes hacia estudios imagenológicos de TC, RMN o Medicina Nuclear [[Goldberg, 2000](#); [Lathia, et al., 2004](#)].



### III. OBJETIVOS

#### 1. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Implementar un método para la preparación de nanopartículas huecas mediante el método de desplazamiento de solvente y su posterior evaluación como potencial agente de contraste para ultrasonido.

#### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Optimizar el método de desplazamiento de solvente para la elaboración de nanopartículas poliméricas potencialmente susceptibles a la formación de huecos en su estructura.
- ❖ Formar huecos en la matriz polimérica mediante la encapsulación y posterior sublimación de un material volátil (naftaleno).
- ❖ Determinar el efecto de la proporción polímero-naftaleno y volumen de fase orgánica sobre el tamaño de partícula.
- ❖ Caracterizar las nanopartículas formadas mediante el análisis de tamaño de partícula, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.
- ❖ Determinar la ecogenicidad *in vitro* de las nanopartículas formadas mediante su evaluación en un sistema de ultrasonido comercial.

## **IV. MATERIALES Y EQUIPOS**

### Polímeros y surfactantes

Alcohol Polivinílico (PVAL), Mowiol<sup>®</sup> 4-88; Glomarza, México.

Eudragit<sup>®</sup> RS; Röhm, Alemania

PLGA 50:50, Resomer<sup>®</sup> RG 502 H; Boehringer Ingelheim, Alemania.

### Reactivos

Naftaleno (NFT) GR, Merck, Alemania.

Hidróxido de Sodio GR; J.T. Baker, México.

Cloruro de Sodio GR, Productos Químicos Monterrey, México.

Percoll<sup>®</sup>; Fluka, Suiza.

Marcadores de Densidad; Pharmacia Biotech AB, Suecia.

### Solventes

Agua desionizada GA; Milli-Q<sup>®</sup>, Francia.

Acetona GA; Fermont, México.

Etanol GA; Fermont, México.

Equipos e instrumentos

Balanza Analítica; Boeco<sup>®</sup> BBC32, Alemania.

Balanza microanalítica; Mettler<sup>®</sup>, Suiza.

Ultrasonicador; Branson<sup>®</sup> Branson 3200, USA.

Microscopio electrónico de barrido; JEOL<sup>®</sup> JMS-25SII, Japón.

Microscopio electrónico de transmisión; JEOL<sup>®</sup> JEM -2010, Japón.

Contador submicrónico de partículas; Nanosizer<sup>®</sup> N4 Plus, Coulter, USA.

Parrilla electrica con agitación; Cimarec<sup>®</sup>, Thermoline, USA.

Rotaevaporador; Laborota<sup>®</sup> 4000, Heidolph, Alemania.

Ultracentrífuga; Optima<sup>®</sup> LE-80K, Beckman, USA.

Liofilizador; Labconco<sup>®</sup>, USA.

Espectrofotómetro UV/Vis; Cary<sup>®</sup> UV 500, Varian, Australia.

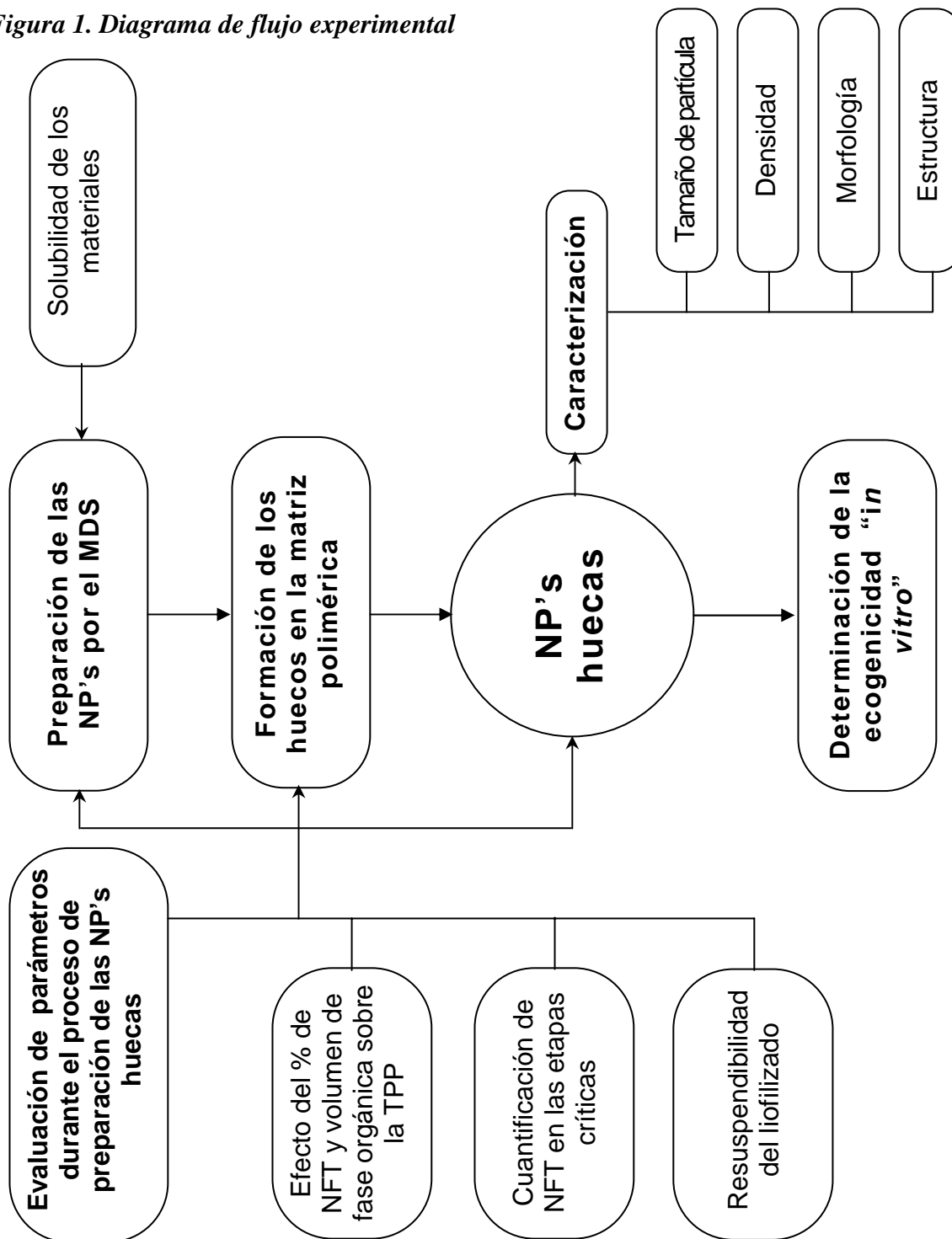
Agitador Vortex; Mixer<sup>®</sup> M16715, USA.

Vernier; Digitex, USA.

## I. METODOLOGÍA

La Figura 6 muestra el resumen de la metodología seguida en este trabajo.

Figura 1. Diagrama de flujo experimental



## **1. SOLUBILIDAD DE LOS DISTINTOS MATERIALES**

Para la realización de esta prueba se colocaron 100 mg del material (Eudragit<sup>®</sup> RS, NFT, PLGA o PVAL), en 5 ml del disolvente en cuestión (agua, etanol o acetona) y se agitó con una barra magnética a velocidad moderada durante 15 minutos. El ensayo se realizó a temperatura ambiente. La prueba fue de tipo cualitativo, sólo se determinó si la cantidad de material mencionada fue soluble o no lo fue.

## **2. PREPARACIÓN DE LAS NP's HUECAS**

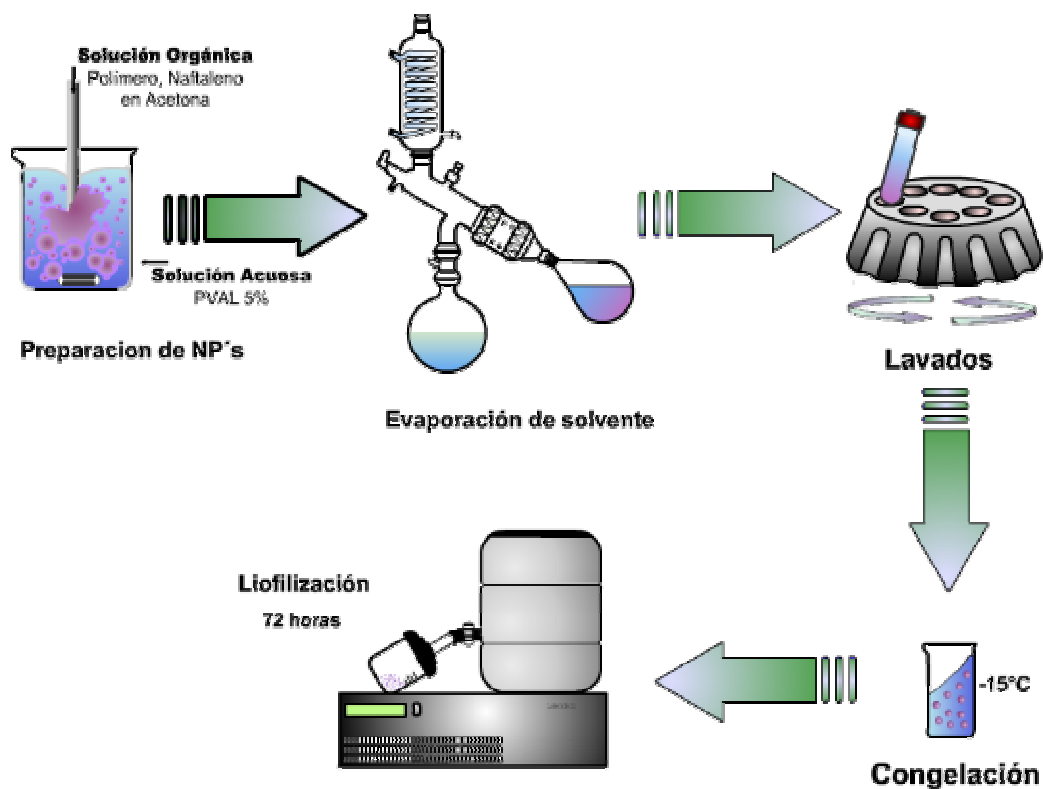
### **2.1. Procedimiento general para la preparación de NP's mediante MDS**

Las NP's se prepararon por el MDS, se disolvieron 300 mg del polímero (Eudragit<sup>®</sup> RS o PLGA) y la cantidad necesaria de NFT en 25 mL acetona, posteriormente esta solución se inyectó poco a poco en 50 mL una solución acuosa de PVAL al 5%, bajo agitación magnética moderada. Seguidos 5 minutos de agitación, se retiró el solvente y la dispersión se concentró hasta aproximadamente 25 mL bajo presión reducida, por medio del rotaevaporador.

### **2.2. Formación de los huecos en la matriz polimérica**

Las NP's fueron separadas mediante ultracentrifugación a 45000 rpm por 2 horas para el caso de las NP's compuestas de Eudragit<sup>®</sup> RS y a 30,000 rpm por 30 minutos para el caso de las NP compuestas por PLGA. El sobrenadante se desechó y la pastilla formada fue resuspendida en agua desionizada mediante agitación magnética durante toda la noche. Este procedimiento de lavado se llevo a cabo tres veces.

La pastilla formada finalmente después de los lavados se resuspendió en 5 ml de agua destilada y la dispersión fue colocada posteriormente en un vial, congelada a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y liofilizada durante 72 horas para asegurar la completa sublimación del NFT. El procedimiento de preparación de NP's y la formación de los huecos en la matriz se resume esquemáticamente en la Figura 7.



**Figura 2.** Procedimiento esquematizado de la preparación de NP's huecas mediante el MDS seguido de la sublimación del núcleo volátil.

### 3. EVALUACIONES DURANTE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LAS NP's HUECAS

#### 3.1. Determinación del efecto de la concentración de NFT y volumen de acetona en la preparación de las NP's sobre el tamaño de partícula promedio (TPP)

Para determinar el efecto de estos dos parámetros sobre el TPP se prepararon diferentes lotes de NP's compuestas por Eudragit® RS siguiendo el procedimiento descrito anteriormente únicamente variando el porcentaje de NFT (6 niveles) y el volumen de fase orgánica (3 niveles); la matriz de experimentos se presenta en la siguiente tabla:

**Tabla 1. Matriz de experimentos para la determinación del efecto de la concentración de NFT y volumen de acetona sobre la TPP.**

Vol. de Fase orgánica (mL)	% NFT (p/p) †					
	0	5	10	15	20	25
25	NPE1	NPE4	NPE7	NPE10	NPE13	NPE16
20	NPE2	NPE5	NPE8	NPE11	NPE14	NPE17
15	NPE3	NPE6	NPE9	NPE12	NPE15	NPE18

† Porcentaje de NFT con respecto a Eudragit® RS (p/p).

### 3.2. Cuantificación de NFT en el proceso

Esta determinación se llevó a cabo en las etapas consideradas como críticas en la preparación de las NP's así como en la formación de los huecos en las mismas. Para este caso se trabajó la preparación *NPE10* (correspondiente a 15 % de NFT). Esta prueba tuvo como objetivo determinar el porcentaje de pérdida de NFT en las diferentes etapas y se evaluó el contenido de las dispersiones obtenidas tanto en el sobrenadante como en la pastilla.

#### 3.2.1. Etapas del proceso

Las etapas del proceso que se consideraron para la cuantificación de NFT fueron las siguientes: I) Antes de evaporar el solvente; II) Después de evaporar el solvente; III) Después de los lavados; IV) Después de la liofilización.

#### 3.2.2. Método de cuantificación de NFT en el proceso

La cuantificación se llevó a cabo de la siguiente manera: para las etapas I-III las dispersiones obtenidas fueron llevadas a un volumen de aforo de 50 mL con agua desionizada a excepción de la dispersión de la etapa I, en seguida, se tomó una alícuota de 10 mL para todos los casos y a continuación se ultracentrifugó a 30,000 *rpm* durante 30 minutos. Una vez separadas, se recuperó el sobrenadante; la pastilla obtenida fue lavada 3 veces con 3 mL de agua deionizada; el producto de los lavados fue recolectado junto con sobrenadante.

El sobrenadante se llevó a un volumen de aforo de 50 mL, posteriormente se colocó en un tubo de ensaye una alícuota de 1 mL y se le adicionó 7 mL de etanol, se agitó vigorosamente con una barra magnética durante 30 minutos, para favorecer la solubilización del Eudragit® RS y del NFT en seguida se filtró el sistema con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y el filtrado se aforo llevó al un volumen de aforo de 10 mL



A continuación se hicieron las diluciones correspondientes con una mezcla etanol-agua 1:9 para obtener la concentración adecuada. Se cuantificó mediante espectrofotometría UV leyéndose la absorbancia obtenida a una longitud de 275 nm. Para cuantificar el naftaleno, la pastilla fue reconstituida con 7 mL de la mezcla etanol- agua (1:9), posteriormente se llevó a un volumen de aforo de 10 mL y se procedió de manera similar que con el sobrenadante.

Para la etapa IV, la muestra a considerar fue el liofilizado, para su análisis se pesaron 25 mg de liofilizado y se disolvió con 7 mL de etanol-agua 1:9, posteriormente se aforo a un volumen de 10 mL con el mismo solvente y se determinó la concentración de NFT de la forma ya mencionada.

Las absorbancias obtenidas en los casos anteriores fueron interpoladas en una curva de calibración construida previamente (Anexo 1). Las determinaciones se hicieron por triplicado, utilizando como sistema blanco NP's constituidas únicamente por Eudragit® RS correspondiendo a la preparación *NPE1* sometida al mismo proceso. Para cada etapa se obtuvo su correspondiente blanco.

### **3.3. Resuspendibilidad del liofilizado**

Con la finalidad de determinar la necesidad del uso de crioprotector durante la liofilización se evaluó la resuspendibilidad de las NP's liofilizadas en función del aspecto físico de la suspensión así como la TPP. Para este estudio se liofilizaron 3 mL de la dispersión de NP's sin crioprotector y con crioprotector usando el manitol a dos diferentes concentraciones 3 y 5% (p/v). El liofilizado obtenido se reconstituyó con 5 mL de agua desionizada con agitación magnética moderada durante 3 minutos y posteriormente se hicieron las evaluaciones correspondientes. Para este ensayo se evaluó la preparación *NPE10* para el caso de NP's compuestas de Eudragit® RS y la preparación consistente de 12.5% de NFT (p/p) denominada *NPP12.5* para el caso de NP's compuestas de PLGA preparada de acuerdo al procedimiento general.

## **4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA**

### **4.1. Determinación del TPP**

El tamaño de las NP's se determinó empleando un contador submicrónico de dispersión de rayos láser (PCS, Photon Correlation Spectroscopy) a un ángulo de 90°. Todas las medidas se hicieron por triplicado para calcular el Tamaño de Partícula Promedio (TPP), y el índice de polidispersidad promedio (IP)

### **4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

Se observó la morfología después de la liofilización, para NP's de Eudragit® RS obtenidas de la preparación *NPE1* y *NPE10*; también se observaron NP's de PLGA formadas con 0 y 12.5 % (*p/p*) de NFT (preparaciones *NPP0* y *NPP12.5*, respectivamente).

Las dispersiones de Eudragit® RS se aplicaron directamente sobre una membrana Millipore LV de 0.100  $\mu m$ , posteriormente se dejó secar al aire y finalmente se recubrió una película fina de oro ( $\approx 20$  nm). Las dispersiones de PLGA se aplicaron sobre un cubreobjetos de vidrio, posteriormente se dejó secar al aire y finalmente se recubrió una película fina de oro ( $\approx 20$  nm). Todas las muestras fueron observadas a 12.5 kV

### 4.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

De igual manera, se observó la estructura de las NP's después la liofilización, para las preparaciones *NPE1* y *NPE10* compuestas de Eudragit® RS también se observaron las preparaciones *NPP0*, *NPP12.5* y *NPP25* (la última compuesta por PLGA y formada con 25 % (p/p) de NFT).

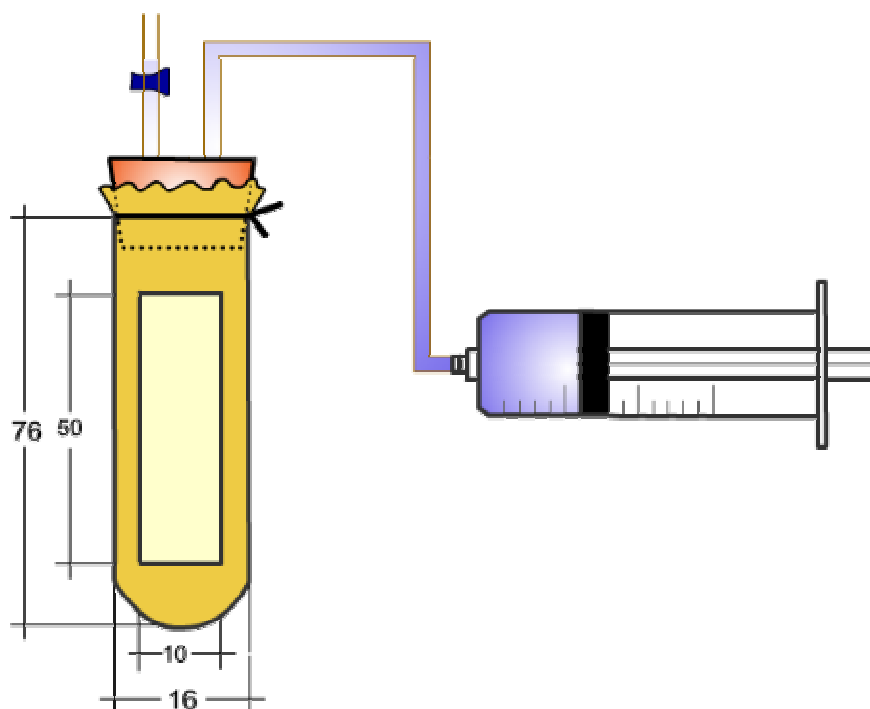
Las dispersiones de NP's de Eudragit® RS y de PLGA se montaron sobre una rejilla de cobre. Las muestras se observaron a 200kV sin ninguna tinción.

### 4.4. Densidad

La determinación de la densidad fue llevada a cabo mediante la separación de las NP's en un gradiente de silica coloidal formado *in situ* durante la ultracentrifugación en un rotor modelo 90Ti Beckman a 5°C y 10,000 rpm durante 3 horas. En el tubo de centrifuga fueron colocados 7.5 mL de Percoll™ al 45 % v/v en NaCl 0.15 M junto con 200 µL de la dispersión de NP's. En un tubo por separado fueron colocados, marcadores de densidad constituidos por micropartículas de diferentes densidades conocidas y proporcionadas por el proveedor las cuales fueron adicionados bajo las mismas condiciones que las muestras y usados para la calibración externa de las bandas formadas. La distancia entre la parte superior del menisco y la banda fue determinada mediante un Vernier. La densidad de las NP's fue situada gráficamente mediante interpolación en una curva obtenida de los datos obtenidos de distancia y de densidad de los marcadores. Las preparaciones utilizadas para tal efecto fueron para el caso de NP's de Eudragit® RS; *NPE1*, *NEP10* y *NE16* y para el caso de NP's de PLGA; *NPP0*, *NP12.5* y *NPP25*

## 5. DETERMINACIÓN DE LA ECOGENICIDAD *IN VITRO*.

Para la determinación de la ecogenicidad *in vitro* fue construido un dispositivo formado por un tubo de ultracentrífuga (16 x 76 mm) de Policarbonato el cual se perforo con la finalidad de formar dos ventanas centradas y opuestas de 10 x 50 mm. Posteriormente el tubo se forro con látex (obtenido de un guante quirúrgico) y fue sellado con un tapón de baquelita. El tapón de baquelita fue perforado de tal forma que se introdujo una manguera de 2 mm de diámetro la cual se conecto a una jeringa de 20 mL. El esquema se muestra en la figura 8.



**Figura 3.** Dispositivo para la determinación de la ecogenicidad *in vitro* de las NP's huecas elaboradas. (Unidades en mm)

En dicho dispositivo se inyectó 15 mL de la dispersión de NP's en este caso las preparaciones *NPE1*, *NPE10*, *NPP0* y *NPP25* en una concentración de aproximadamente  $5 \times 10^8$  partículas/ mL determinada por medio del contador submicrónico de partículas.

Posteriormente, el dispositivo se insonificó por el lado de la ventana utilizando como amplificador una bolsa de acoplamiento colocada debajo del dispositivo, el estudio se realizó con un equipo de US comercial Modo-B marca Mitsubishi equipado, con un transductor cóncavo trabajando a una frecuencia de 3.5 MHz, la imagen obtenida fue impresa directamente del equipo.

La imagen obtenida fue digitalizada y convertida en escala de grises a 8 bits utilizando un *scanner* Hewlett Packard Modelo 5100C a una resolución de 600 dpi. La imagen digitalizada fue analizada mediante el software Image v.1.35p (National Institutes of Health, USA) para ello se definió la región de interés (RDI) correspondiendo en lo posible a la ventana del dispositivo y se obtuvo valor promedio de la escala de grises (VPEG) así como el histograma correspondiente.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. SOLUBILIDAD

Se realizó la prueba de solubilidad de los materiales utilizados con la finalidad de determinar el mejor solvente a utilizar en la preparación de las NP's así como en la cuantificación de NFT. Los resultados se resumen en la tabla 5:

*Tabla 1. Resultados de la prueba cualitativa de solubilidad de los distintos materiales en acetona, agua y etanol.*

Material	acetona	agua	etanol
Eudragit <sup>®</sup> RS	Si	No	Si
NFT	Si	No	Si
PLGA	Si	No	Si
PVAL	No	Si	No

De manera general, se observó que tanto los materiales: Eudragit<sup>®</sup> RS, NFT y PLGA fueron solubles en solventes orgánicos, mientras que el PVAL fue insoluble en este tipo de solventes. Es importante señalar que en el MDS las fases orgánicas más comúnmente utilizadas son: acetona y etanol; por otra parte se requiere que el polímero y el material a encapsular se encuentren solubles en la fase orgánica, pero, insolubles en la fase continua (acuosa).

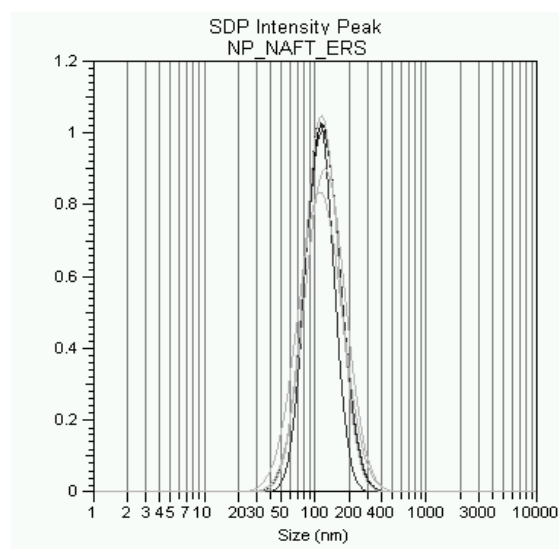
## 2. PREPARACIÓN DE NP'S POR EL MDS

En lo que respecta a la preparación de las NP's mediante MDS, con ambos polímeros fue posible la obtención de NP's con un rango de tamaño de partícula de 50- 500 nm.

De manera particular, para las NP's compuestas por Eudragit® RS los resultados de TPP y distribución de tamaño de partícula de la preparación *NPE12*, se muestran en la Tabla 6 y Figura 9.

**Tabla 2. TPP correspondiente a NP's de la preparación *NPE12*.**

	<b>TPP (nm)</b>	<b>I. P.</b>
	116.2	0.187
	116.6	0.380
	114.9	0.412
<b>Promedio</b>	<b>115.9</b>	<b>0.326</b>
<b>D.E.</b>	<b>0.9</b>	<b>0.122</b>

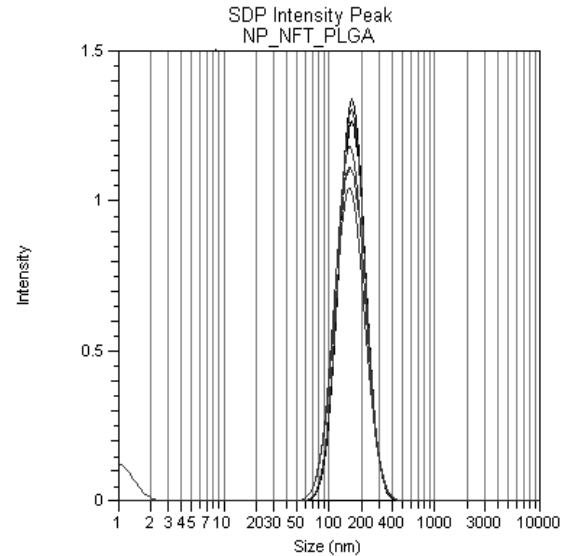


**Figura 1. Distribución de tamaño de partícula para la preparación *NPE12*.**

Por otra parte, para las NP's compuestas por PLGA se presentan la TPP y distribución de tamaño de partícula de la preparación *NPE10*, los resultados se muestran en la Tabla 7 y Figura 10.

**Tabla 3. TPP correspondiente a NP's de la preparación *NPE12*.**

	<b>TPP (nm)</b>	<b>I.P.</b>
	149.3	0.193
	157.3	0.295
	160.4	0.159
<b>Promedio</b>	<b>155.6</b>	<b>0.215</b>
<b>D.E.</b>	<b>5.7</b>	<b>0.071</b>



**Figura 2. Distribución de tamaño de partícula para la preparación *NPE10* correspondiente a NP's de PLGA**

De ambos gráficos puede observarse claramente distribuciones monodispersas lo cual puede corroborarse con el IP, el cual es un parámetro que indica la homogeneidad de la muestra, para considerar que una población es monodispersa su IP debe encontrarse en un rango de 0 a 0.5.



### 3. EVALUACIONES DURANTE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LAS NP'S HUECAS

#### 3.1. Determinación del efecto de la concentración de NFT y volumen de acetona en la preparación de NP's sobre la TPP

La determinación del efecto de la concentración de NFT y volumen de acetona en la preparación de NP's sobre la TPP se llevo a cabo únicamente con las NP's formadas a partir de Eudragit® RS. La Tabla 8 muestra los resultados de TPP de la matriz de experimentos:

**Tabla 4.** TPP (nm  $\pm$   $\sigma$ ) para cada uno de los lotes preparados de acuerdo a la matriz de experimentos.

Fase orgánica (mL)	% Naftaleno (p/p) <sup>†</sup>					
	0	5	10	15	20	25
25	99.4 $\pm$ 1.2	99.1 $\pm$ 1.9	109.2 $\pm$ 1.5	111.9 $\pm$ 3.8	100.3 $\pm$ 2.1	106.0 $\pm$ 4.1
20	109.1 $\pm$ 6.5	114.4 $\pm$ 5.0	99.7 $\pm$ 2.7	126.3 $\pm$ 4.3	113.7 $\pm$ 2.1	111.1 $\pm$ 3.7
15	127.6 $\pm$ 2.6	103.5 $\pm$ 3.4	111.1 $\pm$ 5.6	120.5 $\pm$ 9.3	118.6 $\pm$ 4.1	140.4 <sup>‡</sup> $\pm$ 22.3 609.6 $\pm$ 71.2

<sup>†</sup> Porcentaje con respecto al polímero

<sup>‡</sup> En esta presentación se presento una distribución bimodal el valor presentado corresponde a cada una de las modas

De los resultados anteriores es importante señalar que en la preparación *NPE18* se presento una distribución bimodal en donde la población de mayor tamaño presentó un TPP de  $\approx$  600 nm. Lo anterior sugiere que bajo estas condiciones de preparación y muy seguramente a porcentajes mayores de NFT este compuesto rige el tamaño de partícula debido probablemente a la precipitación de NFT en nanocristales y la formación de agregados de los mismos.

Los datos obtenidos y mostrados en la tabla anterior fueron analizados mediante un ANADEVVA de dos factores, los parámetros del análisis se presentan en la Tabla 9.

**Tabla 5. ANADEVVA de dos factores para la determinación del efecto del porcentaje de NFT y volumen de fase orgánica sobre la TPP ( $\alpha=0.05$ )**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F calculada</b>	<b>F tablas</b>
<b>% de Naftaleno</b>	5	1140.6	228.119	2.64	2.42
<b>Fase acuosa</b>	2	2108.17	1054.08	12.19	3.20
<b>Error</b>	46	39977.87	86.475		
<b>Total</b>	53	7226.63			

De acuerdo con el ANADEVVA ambos factores presentan diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos de TPP; gráficamente puede observarse el comportamiento de ambos factores (figura 11 y 12).

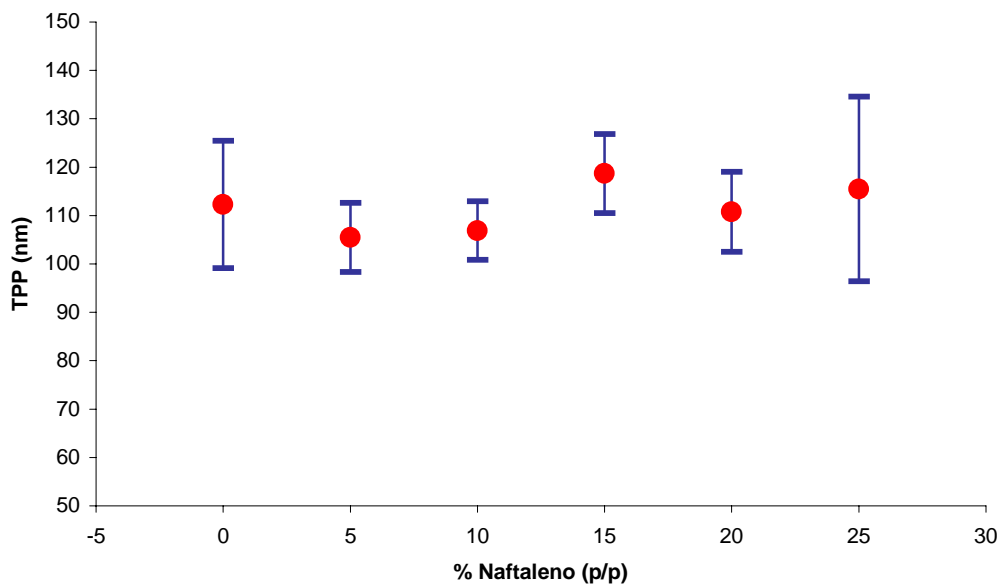


Figura 3. Efecto del porcentaje de NFT sobre la TPP

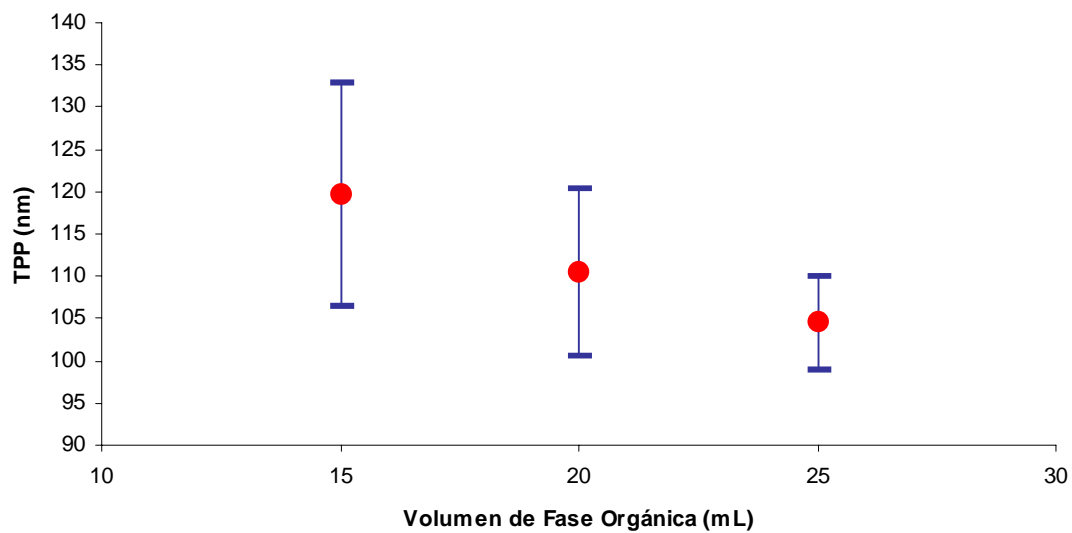


Figura 4. Efecto del volumen de fase orgánica sobre la TPP

Si bien el ANADEVA y las gráficas demuestran diferencias estadísticamente significativas para el valor de TPP al modificar la concentración de NFT y el volumen de fase orgánica estas diferencias en la práctica deben tomarse con cierta reserva, ya que las diferencias son de menos de 20 nm que en términos de magnitud puede considerarse no significativas en este tipo de sistemas. Además debe considerarse que el TPP solo es el valor medio de todos los tamaños presentes en la dispersión.

### 3.2. Cuantificación de NFT en el proceso

Como se mencionó en la sección de la metodología, se determinó el porcentaje de pérdida de NFT en cada una de las etapas críticas de elaboración de las NP's huecas involucradas, únicamente para aquellas formadas de Eudragit® RS, principalmente por la razón de costo y porque se considera que el comportamiento observado será extendible a los otros procesos. La cuantificación se llevó a cabo según el procedimiento descrito reportando como resultado el porcentaje de NFT presente en la muestra tomando en cuenta que el 100% teórico corresponde a la cantidad pesada ( $\approx 45$  mg) necesarios para la preparación NPE10. La tabla 10 enlista los porcentajes encontrados en cada una de las etapas y partes de la muestra.

**Tabla 6. Porcentajes de NFT presentes en cada una de las etapas y partes de la muestra ( $\mu \pm \sigma$ )**

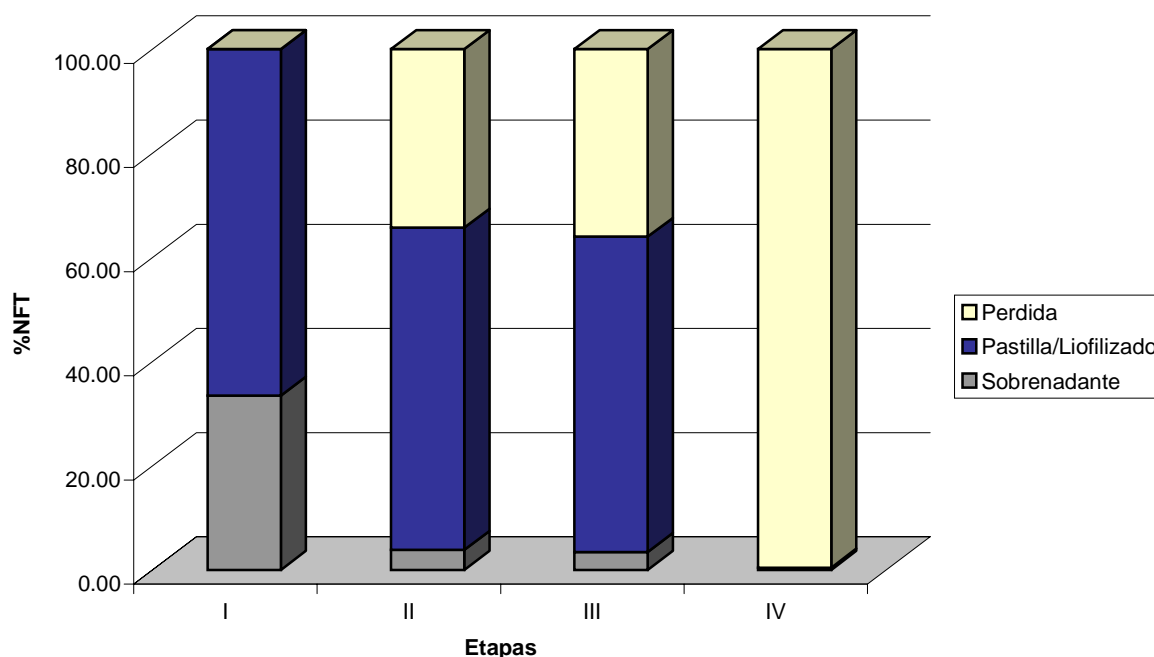
<b>Etapas</b>	<b>Sobrenadante</b>	<b>Pastilla o Liofilizado</b>
I	$33.45 \pm 5.02$ †	$66.55 \pm 5.02$
II	$3.86 \pm 0.27$	$61.88 \pm 4.53$
III	$3.45 \pm 0.65$	$60.53 \pm 6.20$
IV	n.d.	$1.43 \pm 0.13$

† determinado por diferencia con respecto al 100%

n.d. no determinado

Es importante señalar que la cantidad determinada en el sobrenadante de la etapa I fue determinada por diferencia de la cantidad cuantificada en la pastilla y el

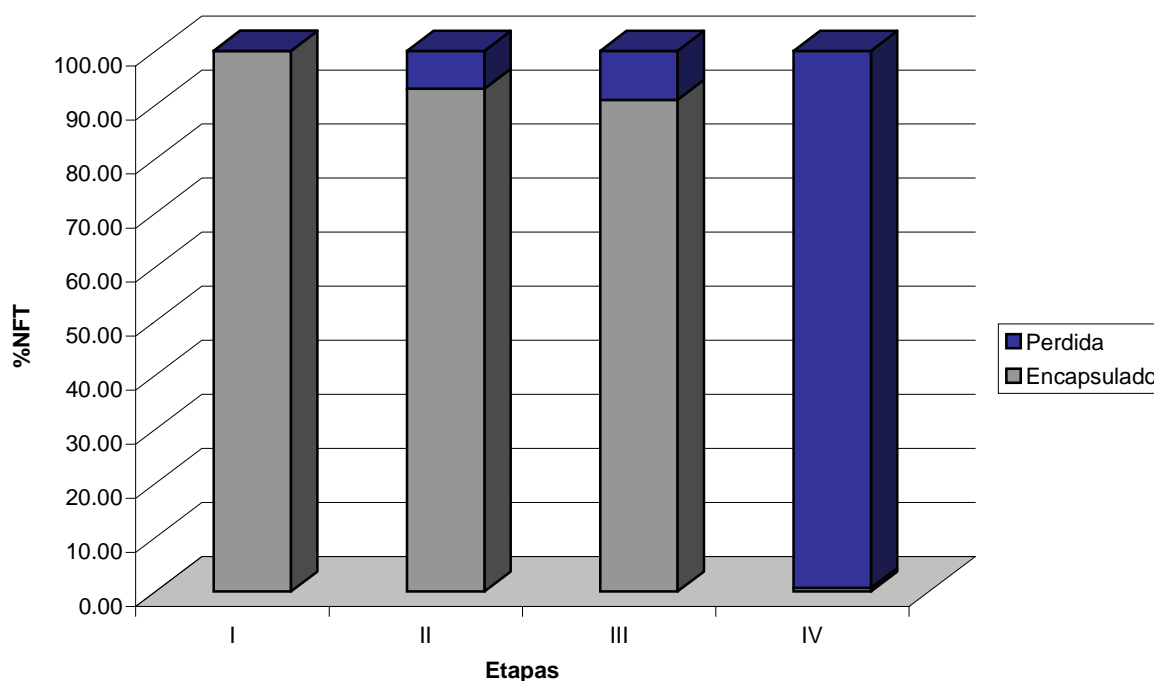
porcentaje teórico de 100%, esto debido a que la cuantificación en el sobrenadante no fue posible a consecuencia de la presencia de acetona la cual interfería a la longitud de onda de cuantificación. La información de la cuantificación de NFT se resume gráficamente en la figura 13.



**Figura 5. Gráfico que muestra el porcentaje de NFT cuantificado en cada uno de las etapas y partes de la muestra durante el proceso de elaboración.**

El gráfico anterior muestra la distribución de la cantidad de NFT en cada una de las etapas y partes de la muestra. Se observa claramente que en la etapa I el mayor porcentaje se encuentra en la pastilla que puede ser un estimado de la eficiencia de encapsulación. En la etapa II un porcentaje importante de NFT se pierde en la evaporación del solvente esto debido a que se las condiciones de temperatura y presión reducida favorecen la sublimación del NFT. Entre las etapas II y III no existe diferencia ya que la operación efectuada es el lavado de la pastilla. Finalmente en la etapa IV se hace evidente que la liofilización retira un alto porcentaje de NFT dejando

únicamente NFT residual menor al 2%. En la figura 13 se observa la pérdida de NFT tanto en la pastilla como en el sobrenadante, pero es interesante también verlo únicamente desde el punto de vista de la pastilla ya que podría reflejar la pérdida de NFT en las NP's suponiendo que todo el porcentaje de NFT presente en la pastilla se encuentra encapsulado. La figura 14 muestra los porcentajes de NFT encapsulado y perdido en cada una de las etapas.



**Figura 6. Porcentaje encapsulado y perdido de NFT relativo, en cada una de las etapas.**

El porcentaje expresado es relativo ya que considera como 100% la cantidad total cuantificada en la pastilla, de esta manera se observa que aproximadamente un 10% del total encapsulado se pierde durante la evaporación de solvente con esto queda claro que la mayor parte del NFT perdido en la etapa II corresponde a la parte del sobrenadante, esto es obvio ya que el NFT se encuentra libre probablemente en forma de nanocristales. Además la figura 14 deja ver que cerca del 90 % del NFT encapsulado es retirado mediante la liofilización.

Lo anterior pudiera dejar ver que el procedimiento seguido para encapsular compuestos volátiles y su posterior sublimación mediante liofilización proporciona una manera de generar huecos una vez que el material es retirado. Este tipo de proceder ya ha sido utilizado por otros autores [El-Sherif, et al., 2003; Cui, et al., 2005] dando como resultado microcápsulas huecas. Sin embargo, es probable también que el NFT encapsulado se encuentre disperso molecularmente, es decir, que no forme un núcleo central por lo que al momento de retirarlo mediante la liofilización una de las posibilidades es que el polímero se reacomode y de esta manera no se generen huecos en la estructura de la nanopartícula.

### 3.3. Resuspendibilidad del liofilizado

La prueba de resuspendibilidad del liofilizado se realizó con la finalidad de evaluar la necesidad de incluir un crioprotector en la liofilización, ésto encaminado a asegurar una dispersión homogénea después de la reconstitución del liofilizado. Los resultados de TPP e IP para el caso de NP's compuestas de Eudragit<sup>®</sup> RS particularmente la preparación *NPE10* se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 7. Resultados de la prueba de resuspendibilidad para el caso de NP's compuestas de Eudragit<sup>®</sup> RS ( $\mu \pm \sigma$ )**

Sistema	TPP	IP
Antes de Liofilizar	111.3 $\pm$ 4.42	0.163 $\pm$ 0.029
Sin Crioprotector	944.1 $\pm$ 44.3	0.910 $\pm$ 0.032
Manitol 3%	258.2 $\pm$ 13.2	0.360 $\pm$ 0.095
Manitol 5%	139.9 $\pm$ 6.0	0.353 $\pm$ 0.136

En la figura 15 se presentan las distribuciones de tamaño de partícula para cada uno de los sistemas de NP's compuestas de Eudragit<sup>®</sup> RS.

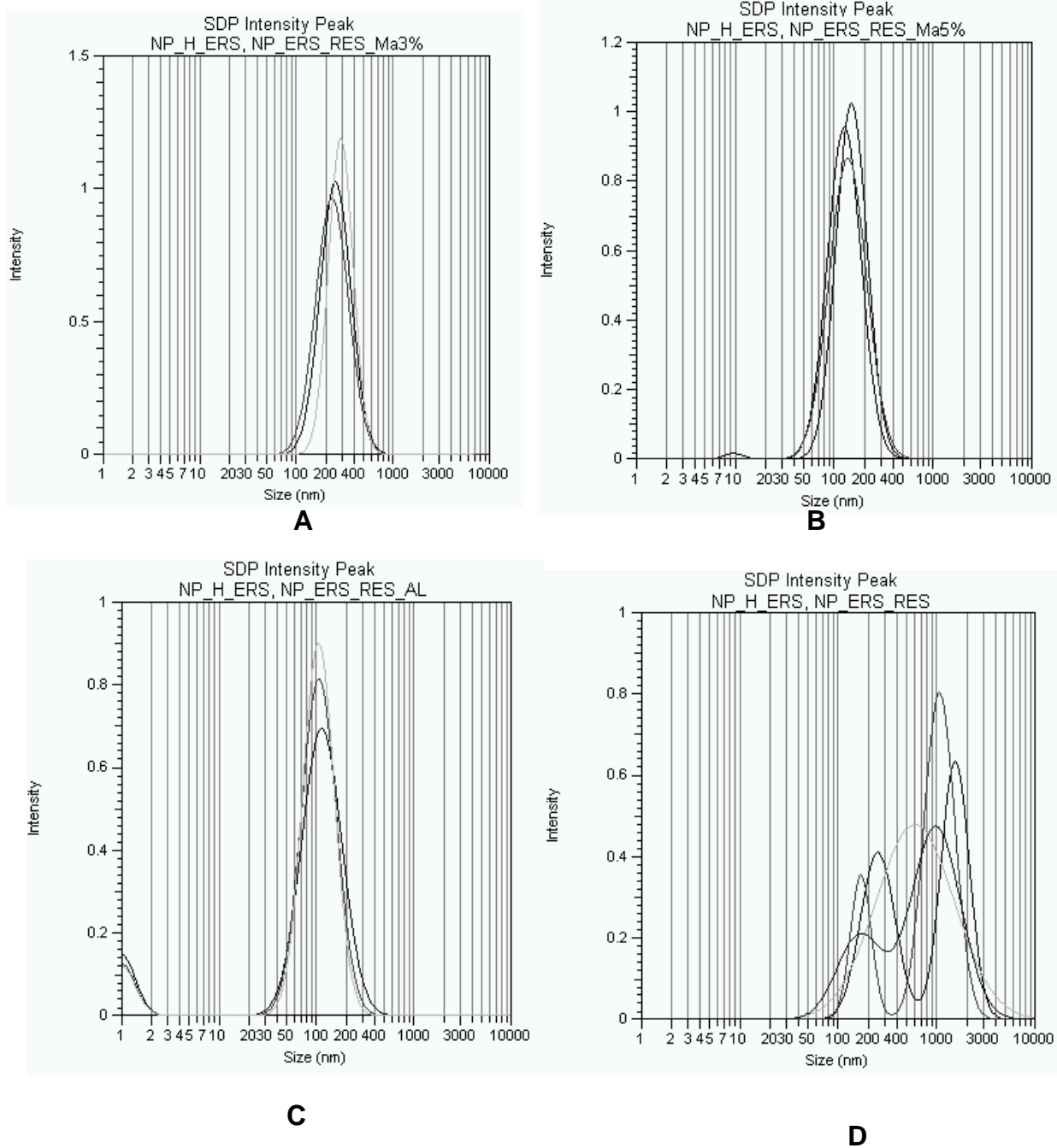


Figura 7. Distribución de tamaño de partícula para cada una de los sistemas. Para el caso de NP's compuestas de Eudragit® RS. A) antes de liofilizar; B) sin crioprotector; C) con 3% de manitol; D) con 5% de manitol.



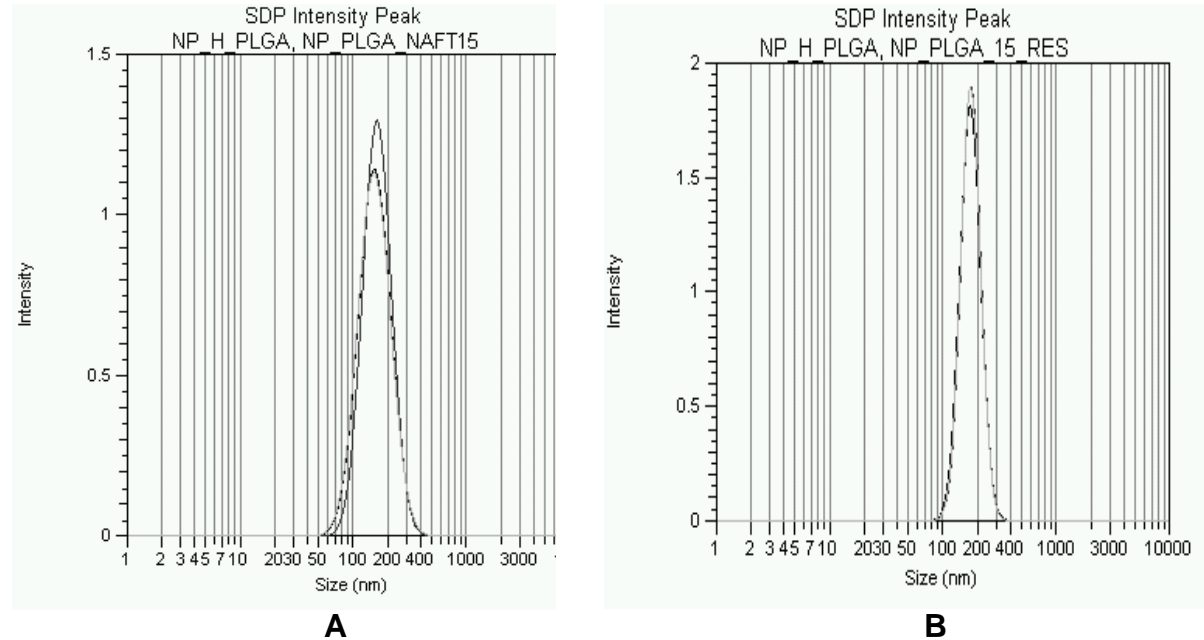
De los resultados anteriores se aprecia que al no utilizar crioprotector la resuspendibilidad no es adecuada ya que se obtiene un sistema polidisperso cuya TPP es muy superior a la presente antes de liofilizar. Por otra parte la adición de manitol permite una mejor resuspendibilidad en donde de acuerdo con la figura 16 se obtiene un sistema monodisperso, sin embargo, a concentraciones de manitol de 3% se tiene un TPP ligeramente superiores al TPP antes de liofilizar, esto debido posiblemente a la presencia de agregados, finalmente el porcentaje de manitol que pareció mas adecuado fue de 5% ya que proporciona un sistema monodisperso con TPP cercano al encontrado antes de liofilizar.

De igual manera se realizo la prueba de resuspendibilidad a las NP's compuestas de PLGA particularmente la preparación *NPP12.5*. En este caso no fue necesario el uso de crioprotector ya que se tenia el antecedente de que la resuspendibilidad de liofilizados de NP's compuestas de PLGA proporcionaban TPP cercanos a los obtenidos antes de liofilizar cuando se utiliza PVAL como estabilizante [Piñón, 2000].

Las TPP e IP de los sistemas de NP's compuestas de PLGA así como las distribuciones de tamaño de partícula se presentan en la tabla 12 y figura 16 respectivamente.

**Tabla 8. Resultados de la prueba de resuspendibilidad para el caso de NP's compuestas de PLGA ( $\mu \pm \sigma$ )**

<b>Sistema</b>	<b>TPP</b>	<b>I.P.</b>
Antes de Liofilizar	154.7 $\pm$ 2.38	0.090 $\pm$ 0.031
Sin Crioprotector	170.1 $\pm$ 1.5	0.095 $\pm$ 0.007



**Figura 8.** Distribución de tamaño de partícula para cada una de los sistemas. Para el caso de NP's compuestas de PLGA. A) antes de liofilizar; B) sin crioprotector.

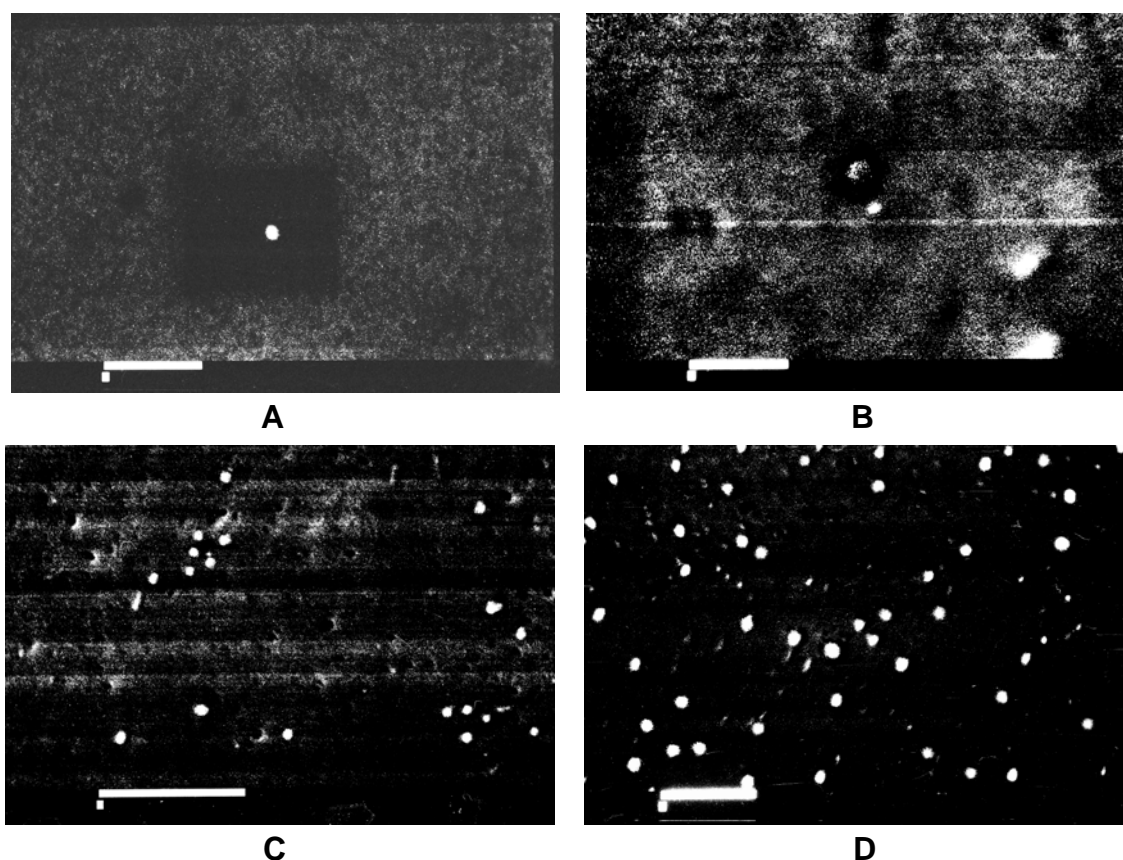
Los resultados permiten ver que para el caso particular de NP's compuestas por PLGA no es necesario el uso de crioprotector esto debido a que aun sin el se obtienen TPP cercanas a las encontradas antes de liofilizar y con una distribución de tamaño de partícula monodispersa.

#### 4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NP'S FORMADAS

Algunos aspectos importantes de la caracterización de las Np's formadas ya fueron abordados en secciones anteriores tales como la distribución y tamaño de partícula, por lo que en esta parte solo se discutirá lo relacionado con la morfología, estructura y densidad.

#### 4.1. Microscopía Electrónica de Barrido

En la figura 17 se muestran las micrografías de algunas preparaciones representativas NPE1, NPE10 y NPP0, NPP12.5 correspondientes a las NP's compuestas de Eudragit® RS y PLGA respectivamente.



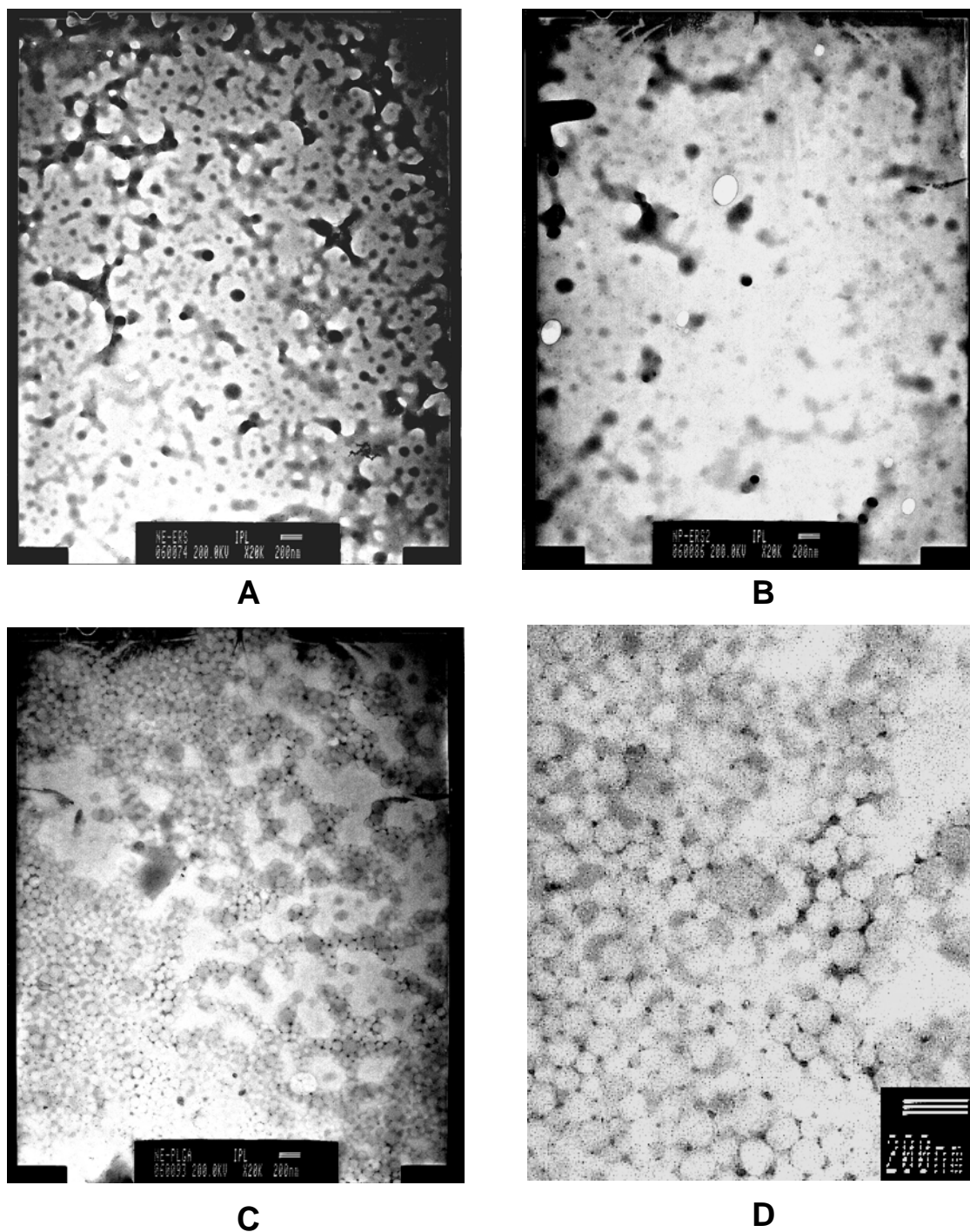
*Figura 9. Micrografías obtenidas mediante MEB para preparaciones de NP's compuestas de Eudragit® RS y PLGA. A) Preparación NPE1 (15, 000x); B) Preparación NPE10 (15, 000x); C) Preparación NPP0 (15, 000x); D) Preparación NPP12.5 (15, 000x). Barra = 1μm (Agradecimientos al Tec. Rodolfo Robles por su asistencia técnica en la obtención de las micrografías)*

El objetivo principal de observar las NP's mediante MEB era poder elucidar la presencia de poros o algún tipo de estructura semejante que nos indicara la presencia de NP's huecas, sin embargo, debido a la resolución del microscopio esto no fue posible, aunque si pudo corroborarse el tamaño de partícula que corresponde al determinado mediante PCS. Es importante señalar que las partículas no se ven perfectamente esféricas debido a problemas técnicos en el microscopio al momento de capturar la imagen, pero en tiempo real las partículas se apreciaban totalmente esféricas.

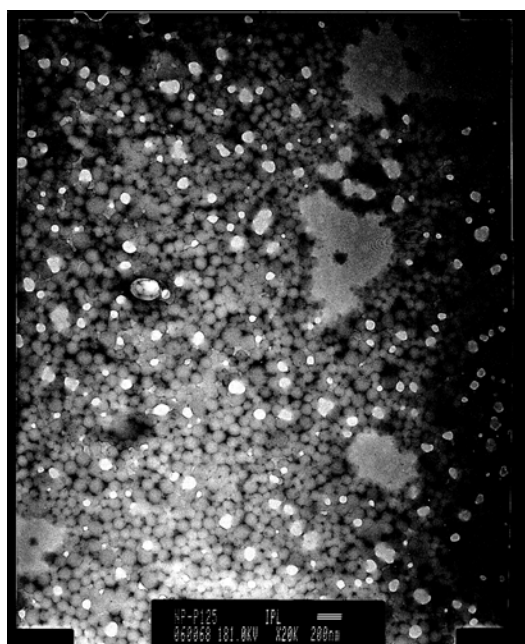
Otro aspecto interesante es que la razón por la cual las partículas de Eudragit® RS fueron montadas sobre una membrana y solo logran apreciarse de manera aislada en las micrografías. Considerando que las NP's de Eudragit® RS tienden a formar una película, no fue posible montarlas sobre vidrio, siendo necesario el uso de la membrana que permitió que en algunos lugares no se formara una película continua y se lograran apreciar las NP's.

#### **4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión**

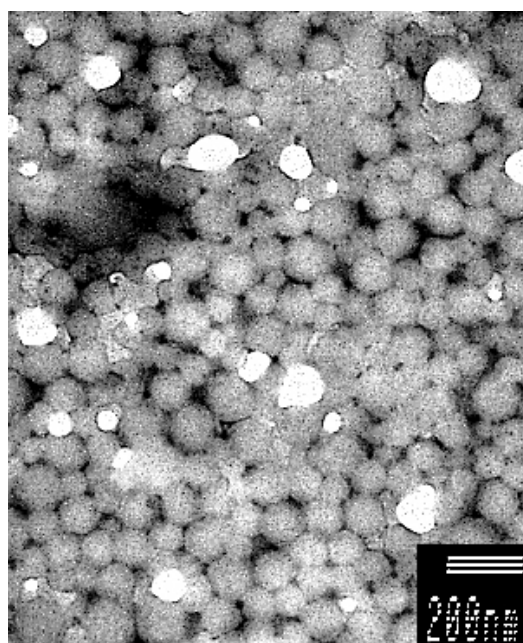
Al no poder observar estructuras huecas mediante MEB las muestras de NP's fueron observadas mediante MET, para este caso se observaron preparaciones representativas de NP's, *NPE1* y *NPE10* compuestas de Eudragit® RS y *NPP0*, *NPP12.5* y *NPP25* compuestas de PLGA. Las micrografías obtenidas de la MET se presentan en la figura 18.



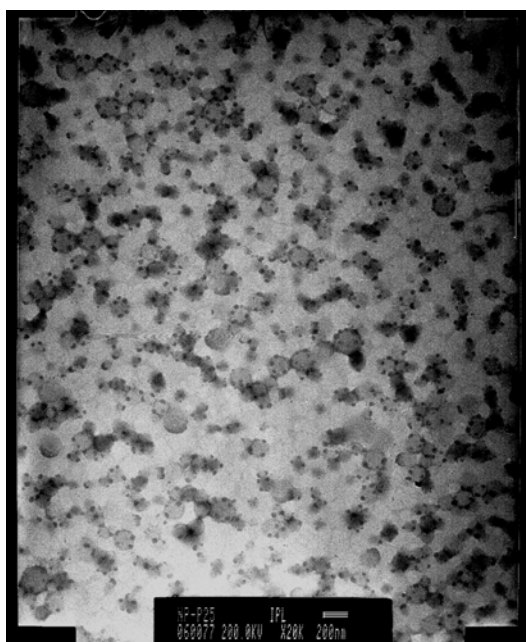
**Figura 10.** Micrografías obtenidas mediante MET para preparaciones de NP's compuestas de Eudragit<sup>®</sup> RS y PLGA. A) Preparación NPE1; B) Preparación NPE10; C) Preparación NPP0; D)Detalle de preparación NPP0. Continua....



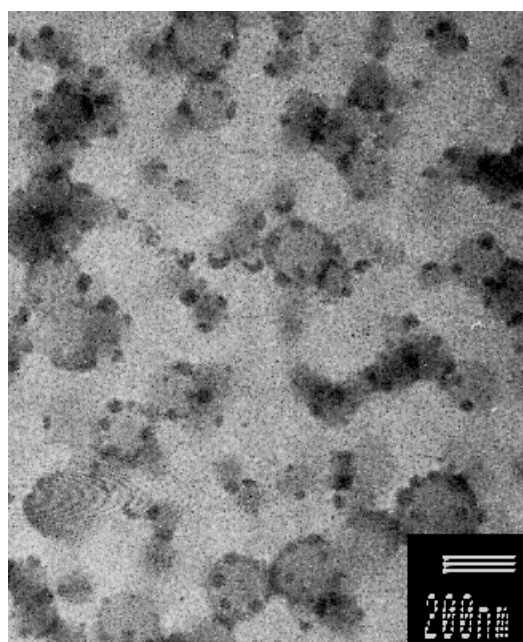
E



F



G



H

**Figura 18 (Continuación).** E) Preparación NPP12.5; F) Detalle de la preparación NPP12.5; G) Preparación NPP25; H) Detalle de la preparación NPP25

Para las preparaciones compuestas de Eudragit® RS la formación de una película continua no permitió la observación detallada de las estructuras, ni siquiera se pueden observar NP's aisladas y bien definidas. Para las preparaciones compuestas por PLGA en general pueden observarse partículas circulares que pueden considerarse esféricas de distribución homogénea y con diámetros menores a los 200 nm esto confirmando una vez más lo encontrado mediante PCS.

Para la preparación NPP0 de PLGA que corresponde a NE's del polímero se observan estructuras sólidas en donde no existe variación en el brillo de la partícula, de igual manera se observa el mismo comportamiento para el caso de la preparación NPP12.5 recordando que esta preparación corresponde a NP's elaboradas con un 12.5% de NFT por lo que en teoría deberían presentar huecos en su estructura, sin embargo, esto no se observa en las micrografías tomadas.

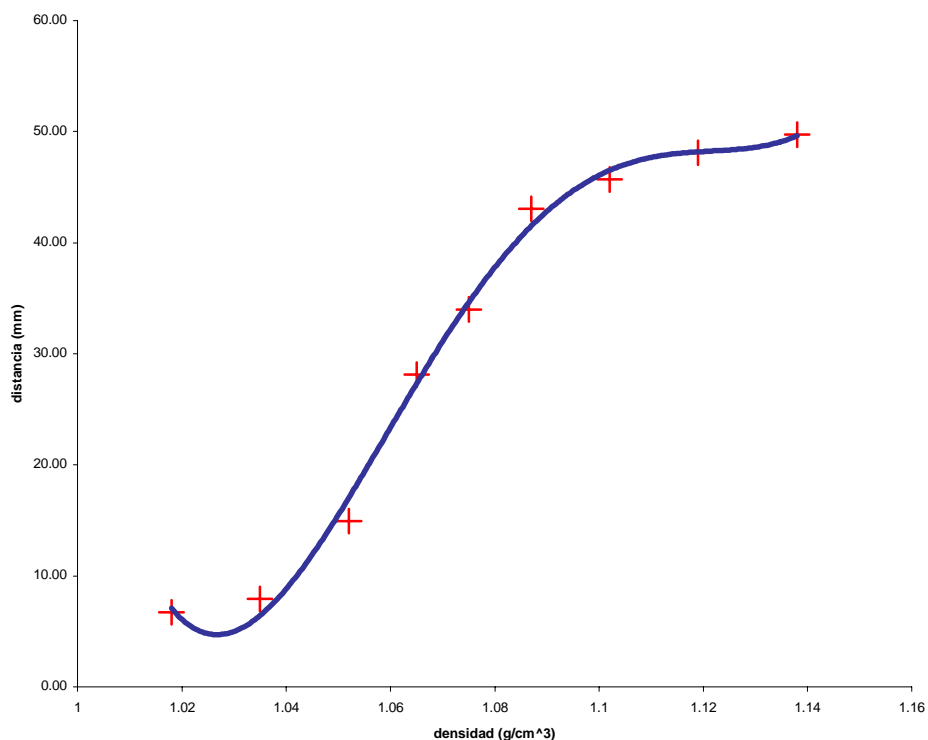
Por otro lado para la preparación NPP25 no fue posible la observación del mismo tipo de estructuras observadas en las preparaciones NPP0 y NPP12.5, debido a la formación de una película, sin embargo no es posible apreciar estructuras que puedan sugerir la presencia de "huecos" en la matriz polimérica de las NP's.

Lo anterior pudiera confirmar como se mencionó anteriormente que el naftaleno se encuentra atrapado molecularmente entre las cadenas del polímero por lo que después de su sublimación el polímero se reacomoda por lo que sólo se observan estructuras sólidas en las micrografías.

### 4.3. Densidad

La determinación de la densidad se realizó con el fin de detectar si se estaban formando huecos en la matriz polimérica de las NP's ya que una disminución en la densidad podría traducirse como la generación de huecos debido al desplazamiento de NFT con una densidad superior al aire o bien al líquido en la que se encontraban suspendidos, considerando que los posibles huecos estarían en todo caso llenos del líquido circundante.

Para tal fin, se construyó una curva de calibración a partir de los estándares externos constituidos por micropartículas de densidad conocida y proporcionada por el proveedor. La curva de calibración correspondiente se muestra en la Figura 19.



**Figura 11.** Curva de calibración para la determinación de la densidad a través de la formación de gradiente in situ mediante ultra centrifugación



El gráfico obtenido de densidad contra distancia fue ajustado a la ecuación polinomial de cuarto orden, cuyo coeficiente de determinación fue de  $r^2 = 0.996$ :

$$\text{Distancia} = 1549647.089 \rho^4 - 6757276.435 \rho^3 + 11040261.686 \rho^2 - 8009746.756 \rho + 2177147.492$$

Con la ecuación anterior se determinó la densidad en base a la distancia entre la banda formada y la parte superior del menisco, encontrando para ello las raíces de la ecuación. Las densidades para cada uno de los sistemas se enlistan en la tabla 13.

***Tabla 9. Densidades para cada uno de los sistemas evaluados determinadas mediante formación de gradiente in situ de Percoll™ mediante centrifugación de acuerdo a la curva de calibración.***

<b>SISTEMA</b>	<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>
NPE1	1.096
NPE10	1.084
NPE16	1.089
NPP0	1.082
NPP12.5	1.078
NPP25	1.076

La representación esquemática de las bandas formadas *in situ* y su respectiva densidad puede verse en la figura 20.

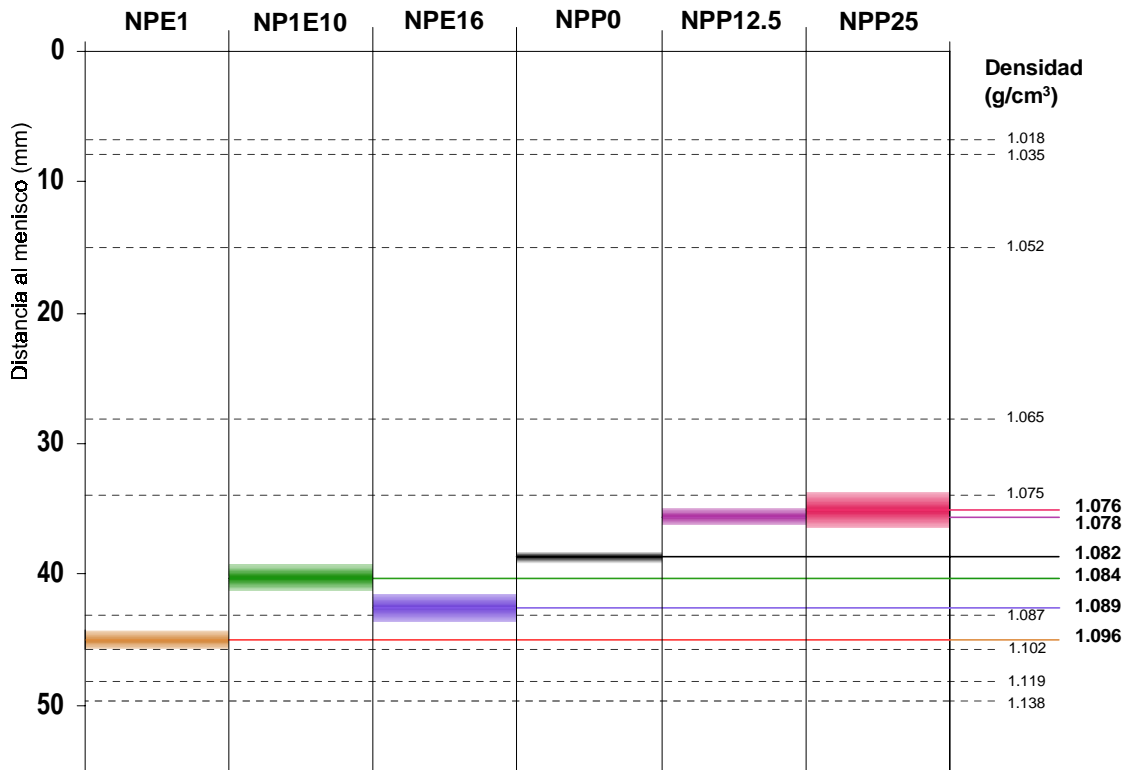


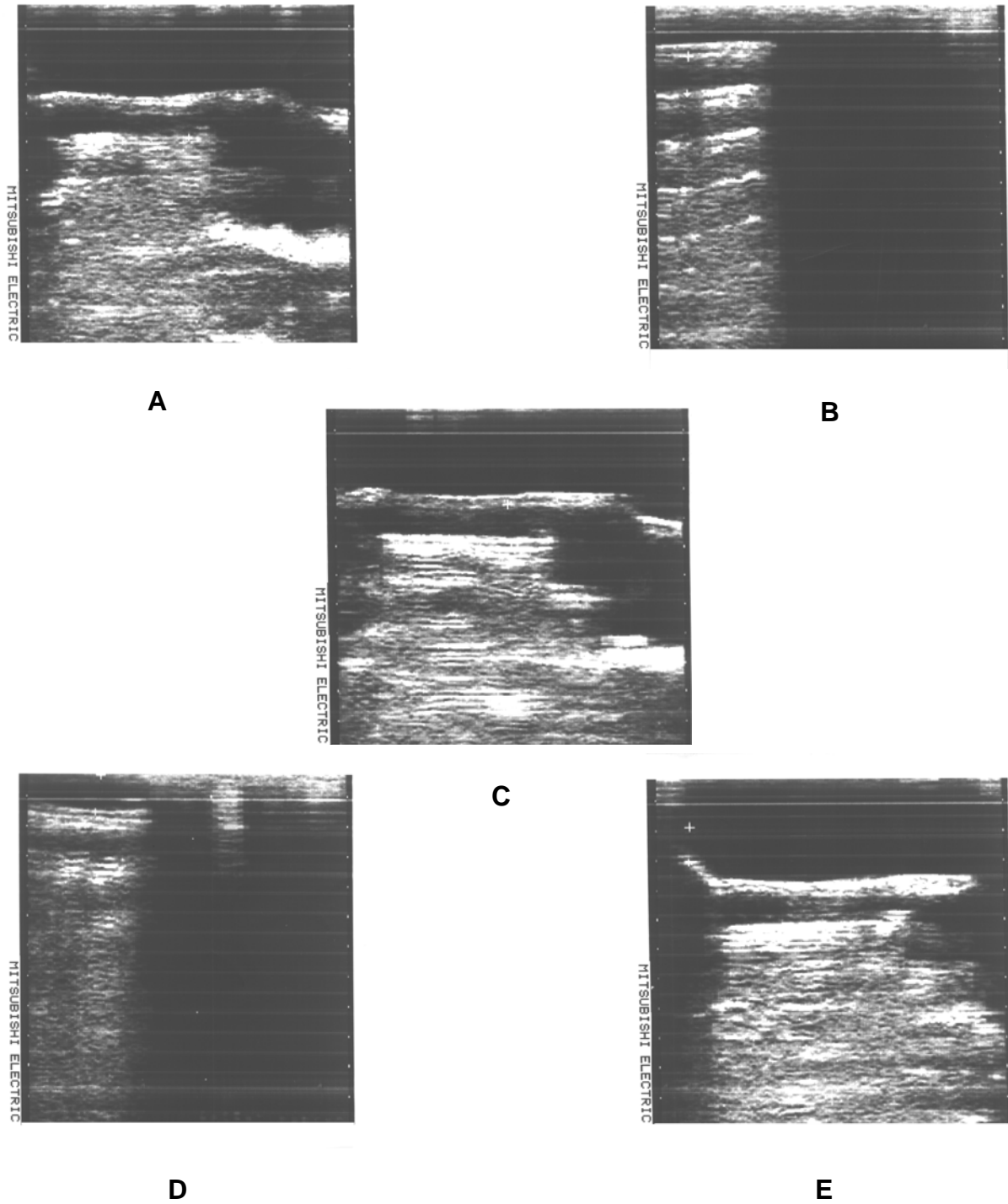
Figura 12. Bandas de cada uno de los sistemas generadas en gradiente de Percoll™ mediante centrifugación, las líneas punteadas representan los estándares externos

Los resultados indican que para el caso de NP's compuestas de Eudragit® RS la preparación *NPE1* consistente de NE's del polímero presentó la mayor densidad lo que era de esperarse ya que corresponde a una estructura compacta formada únicamente de polímero esto en comparación con las preparaciones que incluyeron NFT, las cuales debido posiblemente a la formación de huecos en la estructura del polímero disminuyeron su densidad. Sin embargo, no se observó una relación entre la cantidad de NFT ocupado para su preparación y la densidad, ya que se encontró una mayor densidad para la preparación *NPE16*.

Para el caso de NP's compuestas de PLGA de igual manera se obtuvo que las NE's del polímero presentaron la mayor densidad mientras que las preparaciones *NPP12.5* y *NPP25* presentaron densidades semejantes, estos resultados tampoco muestran alguna relación entre cantidad de NFT cargada con respecto a la densidad.

## **5. DETERMINACIÓN DE LA ECOGENICIDAD *IN VITRO***

Las imágenes digitalizadas de los US tomados y sus respectivas RDI se muestran en la figura 21.

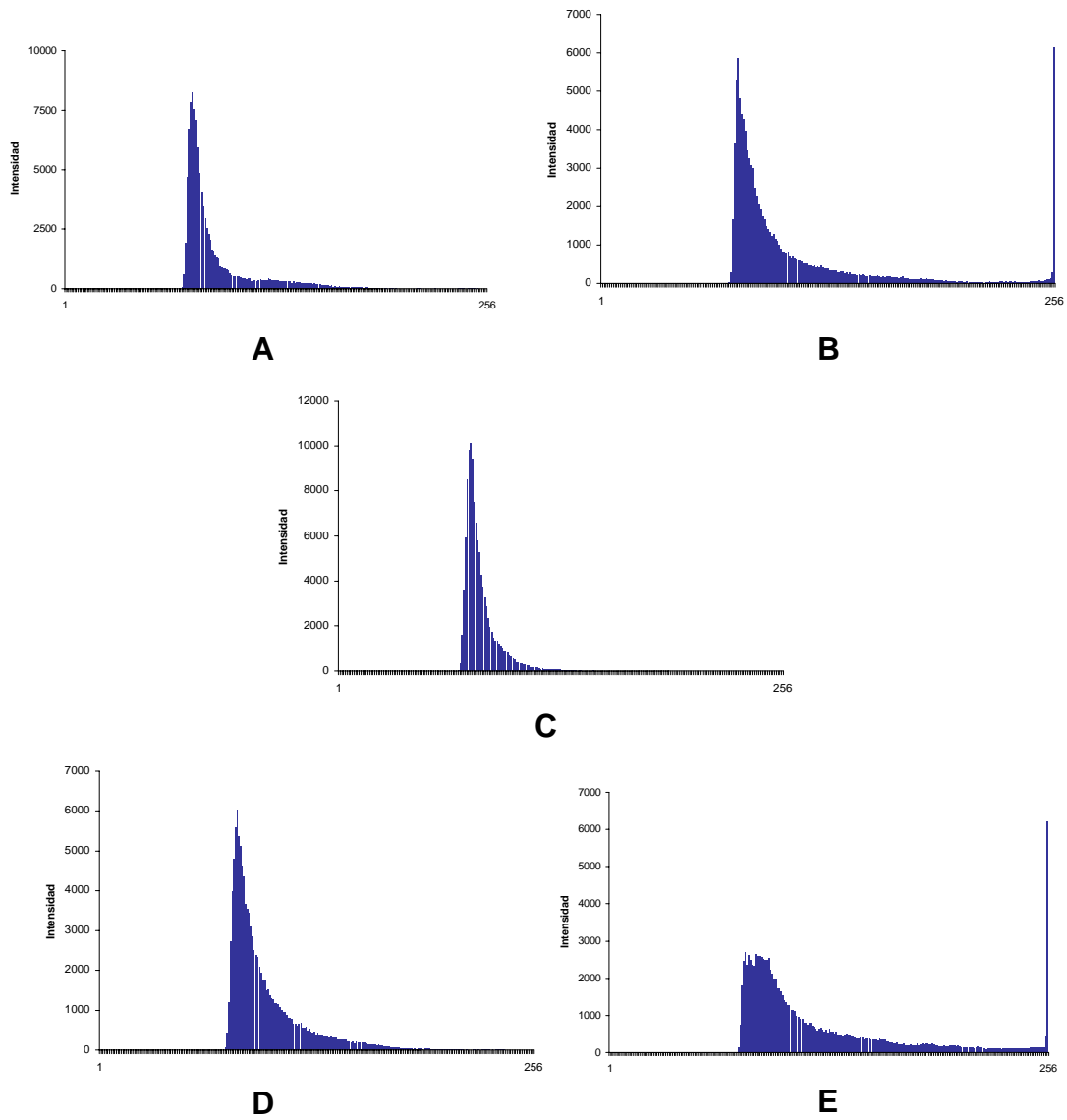


**Figura 13.** Imágenes de US de los diferentes sistemas probados donde se muestra la RDI. A) Preparación NPE1; B) Preparación NPE10; C) Preparación Blanco consistente de Agua dseionizada; D) Preparación NPP0; E) Preparación NPP25.

Con respecto al dispositivo podemos afirmar que éste cumplió con el objetivo planteado al permitir que las ondas ultrasónicas atravesaran la ventana creada y permitiera observar el líquido inyectado en su interior. En general, en las imágenes se observa el dispositivo bien definido debido a que las ondas ultrasónicas rebotan principalmente en la región rígida del tubo y entre las dos paredes que delimitan al tubo se observa una región de menor brillo la cual esta constituida por el líquido inyectado, en ésta sección es donde fue delimitada la RDI. La zona de alto brillo por debajo del dispositivo esta dada por la bolsa de acoplamiento que es un sistema constituido por una bolsa de plástico la cual en su interior tiene agua, ésta sirve para amplificar estructuras que tienen bajo contraste o que son muy pequeñas.

Las imágenes adquiridas y digitalizadas fueron analizadas mediante el software Image v.1.35p (National Institute of Health, USA) el cual es un programa utilizado principalmente para el análisis de imágenes médicas utilizado en áreas como son: US, RMN, TEP, entre otras. El análisis se basó en obtener el valor promedio de escala de grises (VPEG) de la RDI. El VPEG es determinado asignándole a la imagen (la cual deberá estar en formato de escala de grises) valores desde 0 hasta 255, en donde 0 corresponde al negro puro y 255 al blanco puro; de esta manera el VPEG es el tono promedio de los píxeles analizados.

El VPEG es equivalente a un índice que proporciona un estimado de la cantidad de color blanco o negro presente en la imagen. Por lo tanto, en este caso si el sistema es capaz de aumentar el contraste éste se verá traducido en un aumento en el brillo por ende en una mayor cantidad de tonos blancos, por lo que el VPEG deberá desplazarse a la derecha en comparación con un sistema de menor contraste. Este tipo de análisis ya ha sido utilizado en la determinación de la ecogenicidad de algunos ACUS como SonoVue y algunos otros en investigación [Goddi, et al., 2004; Bekeredjian, et al., 2002]. La figura 22 muestra los histogramas de frecuencia de la escala de grises para cada uno de los sistemas.



**Figura 14.** Histograma de distribución del valor asignado en la escala de grises para la RDI de cada uno de los ultrasonogramas analizados. A) Preparación NPE1; B) Preparación NPE10; C) Preparación Blanco consistente de Agua desionizada; D) Preparación NPP0; E) Preparación NPP25.

Las gráficas anteriores muestran la intensidad relativa en la distribución del valor asignado en la escala de grises de la RDI. De manera general las tendencias de los sistemas analizados se puede observar en todos los casos distribuciones sesgadas hacia la izquierda; además un a característica importante es que las preparaciones *NPE10* y *NPP25* consideradas como NP's huecas presentan una distribución bimodal en donde una de estas modas corresponde al valor para el blanco puro. Esta información puede verse mas claramente en la Tabla 14 donde se presentan los datos obtenidos del análisis de los ultrasonogramas.

**Tabla 10.** *VPEG para cada uno de los sistemas analizados mostrando también el área de la RDI.*

<b>Sistema</b>	<b>Área de RDI (píxeles<sup>2</sup>)</b>	<b>VPEG</b>
Blanco	111496	81.364
NPE1	113444	90.758
NPE10	111356	106.587
NPP0	112047	96.998
NPP25	116960	123.686

De la tabla anterior se puede comprobar que el área de la RDI es similar para todas las preparaciones, esto con la finalidad de mantener constante este parámetro. Por otra parte se observa que el VPEG del sistema blanco presenta el menor valor numérico, sin embargo, éste valor puede considerarse alto teniendo en cuenta que se trata de únicamente agua esto nos indica la presencia de artefactos siendo el principal el asociado con la impresión de las imágenes de US las cuales presentaron una serie de líneas blancas causadas por la impresora, sin embargo, esto fue constante para todas las impresiones. Considerando lo anterior se observa que las preparaciones formadas únicamente del polímero, es decir, las NE's presentan un ligero grado de ecogenicidad que es indicado por el aumento de el VPEG en comparación con el sistema blanco, esto puede considerarse normal ya que las NE's también pueden comportarse como dispersores acústicos.

De igual manera se observa una ecogenicidad superior al de las NE's para el caso de las preparaciones consideradas como NP's huecas, inclusive se observa un mayor valor de VPEG para la preparación *NPP25*.

Si bien los datos indican que tanto las NE's como las NP's huecas presentan un mayor grado de ecogenicidad comparados con el sistema blanco, es importante señalar que el método empleado para su evaluación tiene ciertas deficiencias y deja lugar a dudas.

De acuerdo con la aproximación de Born (ver Ec. 3) se puede ver que  $\sigma$  se relaciona a la sexta potencia del radio y a la cuarta potencia de la frecuencia. Por otro lado la frecuencia de resonancia es inversamente proporcional al diámetro (ver Ec. 6) en ese sentido, considerando que las NP's obtenidas son de 200 nm la frecuencia de resonancia calculada corresponde a 35 MHz la cual es una frecuencia fuera del rango médico, por lo que hay que considerar que el utilizado en este trabajo fue de 5 MHz, esto indica que la frecuencia de insonificación no fue lo suficiente para que el sistema entrara en resonancia. Este tipo de situaciones en donde se sugiere que las ACUS de tamaño submicrónico siguen estas ecuaciones ya ha sido reportado para el caso de ACUS de tamaño submicrónico [*Wheatley, et al., 2004; Couture, et al. 2005*].

Sin embargo, otros autores consideran que la relación entre la repuesta ultrasónica generada y el tamaño de partícula submicrónico de este tipo de ACUS no están del todo comprendida, inclusive *Wheatley et al. (2006)* ha encontrado que los valores experimentales de frecuencia de resonancia corresponden a la mitad de los valores teóricos calculados.



Bloch et al. (2005) ha sugerido que se requiere de presiones acústicas elevadas para poder obtener una respuesta adecuada para el caso de ACUS de tamaño submicrónico las cuales solo podrían ser alcanzadas mediante transductores de alta frecuencia. El US de alta frecuencia también es conocido como biomicroscopia y alcanza resoluciones cercanas a la de un microscopio óptico. Se ha planteado la posibilidad de utilizar ACUS de tamaño submicrónico en este tipo de US [Couture, et al. 2005].

Como podrá observarse el uso de los ACUS de tamaño submicrónico aun esta en desarrollo además de que falta la comprensión de los fenómenos que permitan entender la relación entre la respuesta generada y el tamaño de partícula, además de los parámetros asociados a la composición de los ACUS. Sin embargo, el avance en la obtención de transductores de alta frecuencia podría plantear el uso de este tipo de agentes como medios para mejorar la resolución en biomicroscopia.

## VII. CONCLUSIONES

- ❖ Se prepararon nanopartículas poliméricas con tamaño promedio de  $\approx 200$  nm mediante el método de desplazamiento de solvente logrando encapsular aproximadamente un 66.5% naftaleno.
- ❖ Mediante las técnicas de microscopia electrónica de barrido y de transmisión no se evidencia la presencia de huecos en la matriz polimérica de las nanopartículas elaboradas.
- ❖ No existe una relación entre la densidad de las nanopartículas y la cantidad de naftaleno cargada.
- ❖ Se determinó que la concentración de naftaleno y el volumen de fase orgánica no tiene un efecto relevante sobre el tamaño de partícula promedio en la preparación de nanopartículas mediante el método de desplazamiento de solvente.
- ❖ El incremento en el VPEG de los ultrasonogramas obtenidos mediante un equipo de ultrasonido comercial evidencia un ligero aumento en la ecogenicidad *in vitro* debido a la presencia de nanopartículas.
- ❖ El presente trabajo aporta conocimientos útiles para el desarrollo de sistemas nanoparticulados orientados al diagnóstico de enfermedades mediante ultrasonido considerando que en México no se tiene antecedente alguno de este tipo de sistemas.

## VIII. REFERENCIAS

Amersham Health (USA), Información técnica: Optison<sup>®</sup>, 2003.

Basude R., Wheatley M.A., Generation of ultraharmonics in surfactant based ultrasound contrast agents: use and advantages, *Ultrasonics*, 39 (2001) 437-444

Bekeredjian R., Behrens S., Ruef J., Dinjus E., Unger E., Baum M., Kuecherer H.F., Potential of gold-bound microtubules as a new ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.*, 28 (2002) 691–695

Bloch S.H., Short R.E., Ferrara K.W., Wisner E.R., The effect of size on the acoustic response of polymer-shelled contrast agents, *Ultrasound Med. Biol.*, 31 (2005) 439-444.

Blomley M.J.K., Cooke J.C., Unger E.C., Monaghan M.J., Cosgrove D.O., Science, medicine, and the future: Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *BMJ*, 322 (2001) 1222- 1225.

Bouakaz A., N. de Jong, C. Cachard, Jouini K., On the effect of lung filtering and cardiac pressure on the standard properties of ultrasound contrast agent. *Ultrasonics*, 36 (1998) 703-708.

Bracco Diagnostic (USA), Información técnica: SonoRx<sup>®</sup>, 2004.

Bracco Internacional (Holanda), Información técnica: Sonovue<sup>®</sup>, 2004.

Bristol Myers-Squibb (USA), Información técnica: Definity<sup>®</sup>, 2004.

Burns B.P., Handbook of Contrast Echocardiography. e-book, 2000, 2-5.

Caroll B.A., Turner R.J., Tickner E.G., Boyle D.B., Young S.W., Gelatin encapsulated nitrogen microbubbles as ultrasonic contrast agent. *Invest. Radiol.* 3 (1980) 260-266.

Chatterjee D., Sarkar K., Jain P., Schreppler N.E., On the suitability of broadband attenuation measurement for characterizing contrast microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.*, 31 (2005) 781-786.

Chen W.S., Brayman A.A., Matula T.J., Crum L.A., Inertial cavitation dose and hemolysis produced in vitro with or without Optison<sup>®</sup>, *Ultrasound Med. Biol.*, 29 (2003) 725-73.

Cosgrove D., Contrast agents in the liver: new opportunities, *Ultrasound Med. Biol.*, 29 (2003), S4

Couture O., Bevan P.D., Cherin E., Cheung K., Burns P.N., Foster F.S., Investigating perfluorohexane particles with highfrequency ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 32 (2006), 73–82.

Cui W., Bei J., Wang S., Zhi G., Zhao Y., Zhou X., Zhang H, Xu Y., Preparation and evaluation of poly(l-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* , 73B (2005) 171–178.

Elliott A., *Medical Imaging. Nucl. Instr. and Meth. A*, 546 (2005) 1–13.

EI-Sherif D., Development of novel PLGA contrast agents for use as ultrasound targeted drug delivery vehicles. Ph.D. Thesis, Drexel University, (2003a).

El-Sherif D., Wheatley W.A., Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J. Biomed. Mater. Res.*, 66A (2003b) 347-355.

Epstein P.S., Plesset K.J., On the Stability of Gas Bubbles in Liquid-Gas Solutions. *J. Chem. Phys.* 18 (1950) 1505-1509.

Feinstein S.B, Shah P.M., Bing R.J., Meerbaum S., Corday E., Chang B., Santillan G., Fujibashi Y., Microbubble dynamics visualized in the intact capillary circulation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 4 (1984) 595-600.

Fessi H., Devissaguet J .P., Puisieux F., Procéde de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d' une substance, sous forme de nanocapsules. *Eur. Patent EP 274 961*, (1998).

Frinking P.J.A., Bouakaz A., Cate F.J.T., de Jong N., Ultrasound contrast imaging: current and new potential methods. *Ultrasound Med. Biol.*, 26 (2000) 965–975.

Fritsch T., Hautt P., Heldmann F., Preliminary results with a new liver specific ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.*, 20 (1994) 137-141.

Georgiou G., Cohen F.S., Is early detection of liver and breast cancers from ultrasound scans possible?, *Pattern Recognition Lett.* 24 (2003) 729-739.

Goddi A., Novario R., Tanzi F., Di Liberto R., Nucci F., *Radiol. Med.* (2004), 569-579.

Goldberg B., Contrast agents, *Ultrasound Med. Biol.*, 26 (2000) S33-S34.

Gramiak P.M., Shah P.M., Echocardiographic of the aortic root. Invest. Radiol. 3 (1968) 356-366.

Harvey C.J., Pilcher J.M., Eckersley R.J., Blomley M.J.K., Advanced in Ultrasound. Clinical Radiology. 57 (2002) 157- 177.

Hoff L., Acoustic properties of ultrasonic contrast agents, Ultrasonics, 34 (1996), 591-593.

<http://www.acusphere.com/700.html> (2006)

[http://www.fda.gov/cder/foi/nds/98/20773\\_SONORX\\_prntlbl.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/nds/98/20773_SONORX_prntlbl.pdf) (2006)

<http://www.sonuspharma.com> (2006)

Hwang J., Brayman A.A., Reidy M.A., Matula T.J., Kimmey M.B., Crum L.A., Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments in vivo, Ultrasound Med. Biol., 31 (2005) 553-564.

Jong N., Hoff L., Skotland T., Born N., Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: Theoretical considerations and some measurements. Ultrasonics, 30 (1992) 95-103.

Jong N., Cornet R., Lancée C.T., Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres. Part one: simulations. Ultrasonics, 32 (1994) 447-453.

Jong N., IEEE Eng. Med. Biol. (1996) 72-82.

Jong N., Frinking P.J.A., Bouakaz A. Cate F.J.T., Detection procedures of ultrasound contrast agents. Ultrasonics, 38 (2000) 87-92.

Klibanov A.L., Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agent for ultrasound imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 37 (1999) 139- 157.

Lathia J.D., Leodore L., Wheatley M.A., Polymeric contrast agent with targeting potential. *Ultrasonics* 42 (2004) 763-768.

Lewin P.A., Quo vadis medical ultrasound?. *Ultrasonics*, 42 (2004) 1-7.

Licha K., Olbrich C., Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57 (2005) 1087– 1108.

Miller A.P., Nanda N.C., Contrast echocardiography: new agents, *Ultrasound Med. Biol.*, 30 (2004) 425-434.

Morawski A.M, Lanza G.A., Wickline S.A., Targeted contrast agent for a magnetic resonance imaging and ultrasound. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16 (2005) 1-4.

Morse P.M., Ingard K.V., *Theoretical Acoustics*, Mc Graw Hill, New York, 1978.

Mosby Diccionario. *Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud*. Vol. 1. 5ª edición. Elsevier Science., USA, 2003, 843.

Nayaran P., Development and characterization of hollow polymeric microcapsules for use as contrast agent for diagnostic ultrasound., Ph.D. Thesis, Drexel University (1999).

Nayaran P., Marchant D., Wheatley W.A., Optimization of spray drying by factorial design for production of hollow microspheres for ultrasound imaging. *J. Biomed. Mater. Res.* 56 (2001) 331- 341.

Needleman L., Vascular applications of ultrasound contrast agents, *Ultrasound Med. Biol.*, 29 (2003), S45.

Neuberger T., Scho B., Hofmann H., Hofmann M., Rechenberg B., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mat.*, 293 (2005) 483–496.

Nicolau C., Catala V., Vilana R., Gilibert R., Bianchi L., Pages M., Bru C., Characterization of hepatocellular carcinoma using SonoVue<sup>®</sup>, a second-generation ultrasound contrast agent, *Ultrasound Med. Biol.*, 29 (2003) S192–S193.

Ophir J., Parker K.V., Contrast Agents in Diagnostic Ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 15 (1989) 319-333.

Ottoboni T.B., Short R.E., Yamamoto R.K.. Microparticles useful as ultrasonic contrast agents. US Patent 6,193,951 (2001).

Parker K.J., Tuthill T.A., Lerner R.M., Violante T.A., A particulate contrast agent with potencial for ultrasound imaging of liver. *Ultrasound Med. Biol.* 13 (1987) 555-560.

Piñon, S.E., Diseño de un sistema terapéutico nanopartículado destinado al tratamientote la gingivitis y la periodontitis. Tesis: Licenciatura. UNAM (2000).

Porter T.R.. Ultrasound contrast agents and methods for their manufacture and use. US Patent 5,567,415 (1996)

Quintanar-Guerrero D., Alléman E., Fessi H., Doeckler E., Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process



based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* 15 (1998a)1056-1062.

Quintanar-Guerrero D., Alléman E., Fessi H., Doeckler E., Preparation and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 24 (1998b) 1113- 1117.

Raisinghani A., DeMaria A.N., Physical Principles of Microbubble Ultrasound Contrast Agents. *Am. J. Cardiol.* 90(suppl) (2002) 3J—7J.

Sahoo S.K., Labhastewar V., Nanotech approaches drug delivery and imaging. *DDT.* 8 (2003) 1112- 1120.

Shering (Alemania), Información técnica: Levovist<sup>®</sup>, 2000.

Straub J.A., Chickering D.E., Church C.C., Shah B., Hanlon T., Bernstein H., Porous PLGA microparticles: AI-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography. *J. Control. Release* 108 (2005) 21–32

Simpson D.H., Detecting and imaging microbubble contrast agents with ultrasound. Ph.D. Thesis , University of Toronto (2000).

Unger E.C., Liposomes as contrast agents for ultrasonic imaging and methods for preparing the same, US Patent 5,088,499 (1992).

Wheatley M.A., Forsberg F., Dube N., Patel M., Oeffinger B.E., Surfactant-stabilized contrast agent on the nanoscale for diagnostic ultrasound imaging. *Ultrasound Med. Biol.*, 32 (2006) 83–93.

Wheatley M.A., Nayaran P., Diagnostic use of microspheres. En: Mathiotwitz, E. Editor. Encyclopedia of controlled drug delivery, 1<sup>st</sup> edition. New York. Wiley; 1999, 325- 340.

Wheatley M.A., Oeffinger B.E., Development and characterization of a nano-scale contrast agent. Ultrasonics 42 (2004) ,343–347.

Wilson J.D., Buffa A.J., Lou B., Física. 5<sup>a</sup> ed., Pearson Education, México. 2003, 479-480.

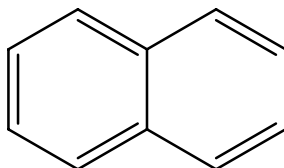
Wisner E.R., Ferrara K., Gabe J.D., Contrast enhanced intermittent power Doppler ultrasound with sub-micron bubbles for sentinel node detection. Acad Radiol, 9 (2002) S389–S391.

---

## IX. ANEXOS

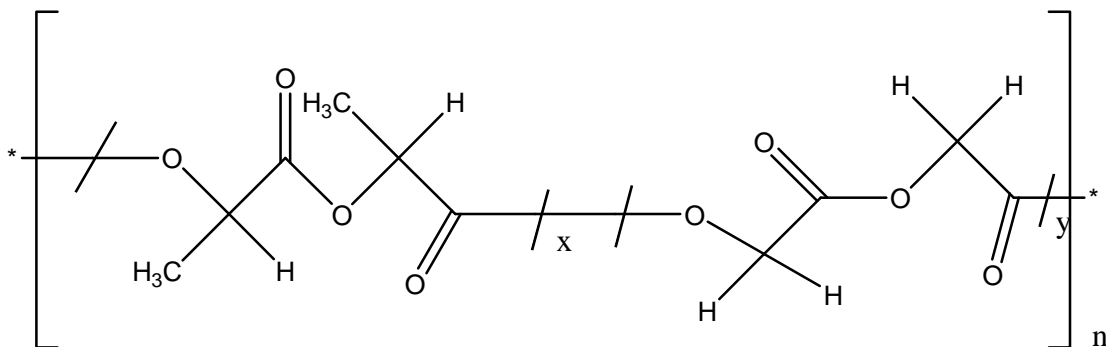
### *Anexo 1. Estructuras químicas y generalidades de los materiales utilizados*

#### 1. Naftaleno



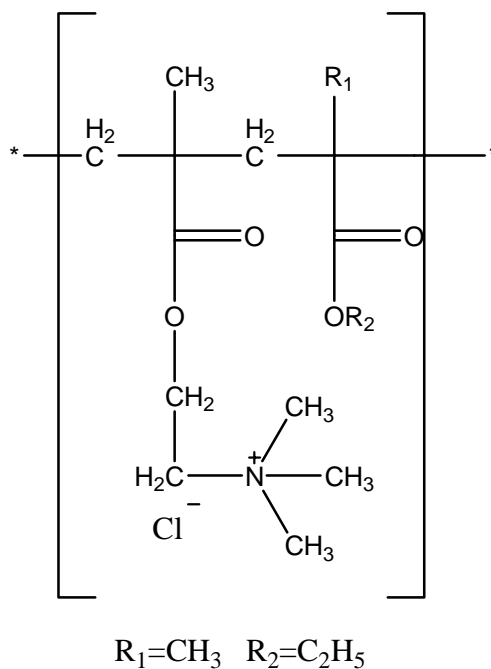
- ❖ Fórmula condensada:  $C_{10}H_8$
- ❖ Peso molecular: 128.18 g/mol
- ❖ Descripción: Cristales de transparentes a ligeramente amarillos de olor característico.
- ❖ Punto de ebullición: 218°C
- ❖ Punto de fusión: 80°C
- ❖ Densidad: 1.16 g/cm<sup>3</sup>
- ❖ Solubilidad en agua, g/100 ml a 25°C: ninguna
- ❖ Presión de vapor, Pa a 25°C: 11
- ❖ Coeficiente de reparto octanol/agua como log  $P_{o/w}$ : 3.3
- ❖ Límites de exposición: TLV: 10 ppm (como TWA); 15 ppm (como STEL); (piel) A4 (ACGIH 2003). MAK: H (absorción dérmica); Cancerígeno categoría 2; Mutágeno categoría 3B (DFG 2003).

## 2. Resomer<sup>®</sup> RG 502 H



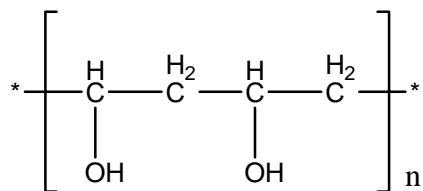
- ❖ Nombre químico: Ácido Poli (D, L-láctico-co-glicólico)
- ❖ Descripción: polvo blanco
- ❖ Olor: inodoro
- ❖ Composición: 48:52 a 52:48 fracción mol (D,L-láctico : glicólico)
- ❖ Monómero residual: max. 0.5 % D,L-láctico ; max. 0.5 % glicólico
- ❖ Solvente residual: max. 0.1 % acetona; max. 0.089 % tolueno; max. 0.1 % total
- ❖ Índice de acidez: min. 6 mg KOH/g

### 3. Eudragit® RS



- ❖ Composición química: Copolímero de ácido acrílico y ácido metacrílico con un bajo contenido de sales cuaternarias de amonio.
- ❖ Peso molecular: aprox. 150, 000 g/mol
- ❖ Descripción: Polvo blanco con un ligero olor a aminas.
- ❖ Solubilidad: 1 g de la sustancia se disuelve en 7 g de metanol, etanol y alcohol isopropílico, se disuelve bien en acetona, acetato de etilo y cloruro de metileno. Prácticamente insoluble en éter de petróleo, hidróxido de sodio 1N y agua.
- ❖ Índice de refracción:  $n_D^{20}$  1.380 - 1.385.
- ❖ Densidad relativa:  $d_{20}^{20}$  : 0.816 - 0.836.

#### 4. Mowiol<sup>®</sup> 4-88

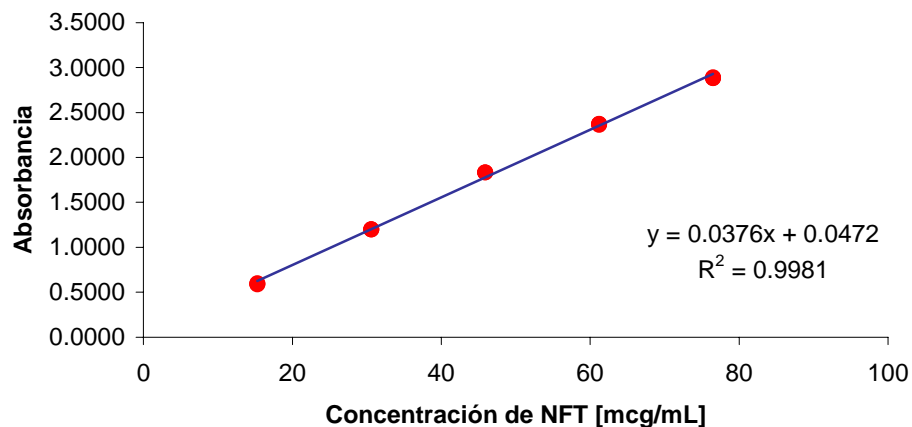


- ❖ Nombre químico: Alcohol polivinílico
- ❖ Peso molecular: 26, 000 g/mol
- ❖ Descripción: polvo blanco inodoro.
- ❖ Solubilidad: soluble en agua.
- ❖ Densidad: 1.25-1.31 g/cm<sup>3</sup>
- ❖ Usos: fabricación de adhesivos y surfactante.

## 5. Acetona

- ❖ Nombre químico: Propan-2-ona
- ❖ Formula condensada:  $C_3H_6O$
- ❖ Peso molecular: 58.1 g/mol
- ❖ Descripción: Líquido incoloro, de olor característico.
  
- ❖ Punto de ebullición: 56°C
- ❖  
Punto de fusión: -95°C
- ❖  
Densidad relativa (agua = 1): 0.8
- ❖  
Solubilidad en agua: Miscible
- ❖  
Presión de vapor, kPa a 20°C: 24
- ❖  
Coeficiente de reparto octanol/agua como  $\log P_{o/w}$ : -0.24
  
- ❖ Límites de exposición: TLV (como TWA): 750 ppm; 1780 mg/m<sup>3</sup> (ACGIH 1993-1994).

### Anexo 2. Curva de calibración de NFT en etanol: agua (1:9)



#### Resumen del análisis estadístico

Tabla 1. Resultados obtenidos de la regresión

Regresión	
$R^2$	0.99807281
$R^2$ ajustada	0.99792456
C.V.	1.9873%
Observaciones	15

Tabla 2. ANADEVVA

ANADEVVA					
	g.l.	SC	CM	F	P-value
Regresión	1	9.95028503	9.95028503	6732.56035	4.8865E-19
Residual	13	0.01921315	0.00147793		
Total	14	9.96949818			

Tabla 3. Pruebas estadísticas a los coeficientes

	Coefficientes	t	P-value
Intercepto	0.04720667	2.02786942	0.06358025
pendiente	0.03764139	82.0521806	4.8865E-19