



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SISTEMAS
NANOPARTICULADOS COMO AGENTES DE CONTRASTE PARA
ULTRASONIDO”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. NÉSTOR MENDOZA MUÑOZ

TUTOR:
DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

COMITÉ TUTOR
DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO, FACULTAD DE QUIMICA
DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS, UAM XOCHIMILCO

MEXICO D.F. MARZO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Andrés Navarrete Castro

Primer Vocal: Dra. María Josefa Bernad Bernad

Segundo Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis

Tercer Vocal: Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Secretario: Dra. Ana Leticia Fernández Osorio

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por la formación recibida durante estos años.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca recibida durante la realización de estos estudios de posgrado Ref. 177414.

Al **Dr. David Quintanar Guerrero** por permitirme realizar este proyecto y ser siempre guía en mis acciones.

A la **Dra. Adriana Ganem Rondero** por mostrar siempre disponibilidad cuando requerí su ayuda.

A los miembros de mi comité tutor, la **Dra. Luz María Melgoza Contreras** y el **Dr. Andrés Navarrete Castro** por sus valiosos aportes en la realización de este proyecto.

Al **Técnico Rodolfo Robles** de la FES Cuautitlán y al **Técnico Jesús Espinosa** de la FES Iztacala, por su asistencia en los estudios de microscopía electrónica de barrido y transmisión respectivamente.

A los **sinodales** por sus valiosas sugerencias vertidas en este documento.

DEDICATORIAS

Con profunda gratitud dedico este trabajo a mis padres Felipe y Eva; a mis hermanos Miriam, Óscar y Yolotzin; y a mis suegros Cuauhtémoc y María Luisa.

Con especial amor a mis hijos Leonardo, Zuriel y Damián.

Finalmente, dedico este trabajo a mi esposa Nayeli que incluye mi reconocimiento al apoyo incondicional que ha representado.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADOS DEL PROYECTO DOCTORAL

Publicaciones

1. Mendoza-Muñoz N., Noriega-Peláez E. K., Nava-Arzaluz M. G., Mendoza-Elvira S. E., Ganem-Quintanar A., Quintanar-Guerrero D. (2011). Preparation and *in vitro* evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imaging. *Ultrasonics*, 51 (7), 839-845.
2. Mendoza-Muñoz, N., Piñón-Segundo, E., Ganem-Quintanar, A. Quintanar-Guerrero, D. (2007). Preparación y evaluación *in vitro* de nanopartículas poliméricas biodegradables como agente de contraste para ultrasonido. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 10(1): p. 9-15.

Presentación en Congresos

1. I Reunión Iberoamericana de Estudiantes de Posgrado en Farmacia. Noviembre de 2011. Cd. de México, México. Modalidad: Cartel.
2. QUIMIUNAM 2011, Noviembre de 2011, Ciudad Universitaria, México D.F. Modalidad: Presentación Cartel.
3. 2nd Conference Innovation in Drug Delivery: "From preformulation to development through innovative evaluation process", Octubre de 2010, Aix, Francia. Modalidad: Cartel.
4. XLIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, Octubre de 2010, Puerto Vallarta, México. Modalidad: Cartel.
5. QUIMIUNAM 2010, Noviembre de 2010, Ciudad Universitaria, México D.F. Modalidad: Presentación Oral.

Lugar donde se realizó la tesis

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-323), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo1, UNAM

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTAS DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
1. General	3
2. Particulares	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3. Ultrasonido diagnóstico (USD)	4
3.1. Imaginología	4
3.2. El ultrasonido como herramienta de diagnóstico	5
3.3. Principios físicos del ultrasonido diagnóstico	7
3.3.1. El sonido	7
3.3.2. Generación de ondas ultrasónicas	9
3.3.3. Propiedades de la ondas ultrasónicas	9
4. Agentes de contraste para ultrasonido (ACUS)	15
4.1. Definición y características de los ACUS	15
4.2. Áreas de impacto de los agentes de ACUS	16
4.3. Fundamentos físicos del funcionamiento de los ACUS	17
4.4. ACUS disponibles en el mercado, características principales y limitaciones	21
4.4.1. Limitaciones de los agentes de contraste para ultrasonido (ACUS) que actualmente están en el mercado	24

5.	Nanotecnología en el ambito biomédico	26
5.1.	Estado actual en el desarrollo de ACUS a nanoescala	27
IV.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
1.	Diagrama de flujo experimental	32
2.	Métodos de preparación de los nanosistemas	33
2.1.	Método de obtención de nanocápsulas oleosas y nanoesferas	33
2.1.	Método de obtención de la nanoemulsión y nanocápsulas de perfluoropentano (PFP)	33
2.2.	Método de obtención de las nanocápsulas llenas de aire	34
2.2.1.	Método empleando un disolvente inmisible en agua	34
2.2.2.	Método empleando un disolvente parcialmente miscible en agua	35
3.	Caracterización de las nanoparticulas	37
3.1.	Análisis del tamaño y distribución de partícula	37
3.2.	Determinación de la densidad de las nanopartículas	37
3.3.	Potencial zeta	38
3.4.	Microscopía óptica	38
3.5.	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	38
3.6.	Microscopía electrónica de transmisión (MET)	39
4.	Medición de la ecogenicidad <i>in vitro</i>	39
4.1.	Elaboración de las curvas dosis-respuesta	40
4.2.	Seguimiento del aumento de señal con respecto al tiempo	41
4.3.	Determinación de la frecuencia de resonancia	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
1.	Preparación de nanoesferas y nanocápsulas oleosas	42
2.	Preparación de nanoemulsión y nanocápsulas de PFP	44

3.	Preparación de nanocápsulas “llenas” de aire	47
3.1.	Método empleando un disolvente parcialmente miscible en agua	47
3.1.1.	Efecto de la velocidad en el tamaño y morfología de la partícula.	49
3.2.	Método empleando un disolvente parcialmente miscible en agua	53
3.2.1.	Efecto de la velocidad y tiempo de agitación en la distribución del tamaño de partícula	59
4.	Evaluación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> de los sistemas nanoparticulados	60
4.1.	Diseño y construcción del sistema de ultrasonido en modo A	60
4.2.	Determinación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> de las nanoesferas, nanocápsulas oleosas, nanoemulsión de Captex® 200 y PFP	62
4.3.	Determinación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> de nanocápsulas llenas de aire	66
4.4.	Determinación del tiempo de máxima respuesta	69
4.5.	Determinación de la frecuencia de resonancia	70
VI.	CONCLUSIONES	73
VII.	REFERENCIAS	75
VIII.	ANEXOS	86
1.	Anexo 1. Tabla de las características brindadas por el proveedor de los transductores empleados para la determinación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> .	86
2.	Anexo 2. Diagrama del emisor-receptor y del osciloscopio y tablas de los parámetros de ajuste para la determinación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> .	87
2.1.	Diagrama del emisor receptor	87

2.2. Tabla de ajustes del emisor-receptor.	87
2.3. Diagrama del osciloscopio	88
2.4. Tabla de ajustes del osciloscopio	88
3. Anexo 3. Diseño del programa para la captura de datos para la determinación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> .	89
3.1. Diagrama de conexiones del programa diseñado en LabView para la captura de datos.	89
3.2. Salida de pantalla del programa diseñado en LabView para la captura de datos.	90
4. Anexo 4. Análisis Estadístico	91
4.1. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación del efecto de la velocidad y tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas “llenas” de aire preparadas con acetato de etilo. Resumen de las tablas dadas por el programa SigmaPlot 11.0	91
4.2. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación del efecto de la velocidad y tipo de agitación sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas “llenas” de aire preparadas con acetato de etilo. Resumen de las tablas dadas por el programa SigmaPlot 11.0	92
4.3. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> para las sistemas NEPLGA, NCO; NE y NEPFC a 5 MHz. Resumen de las tablas dadas por el programa SigmaPlot 11.0	93
4.4. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación de la ecogenicidad <i>in vitro</i> para las nanocápsulas llenas de aire a 5.0, 7.5 y 10.0 MHz. Resumen de las tablas obtenidas por el programa SigmaPlot 11.0	93

4.5. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación del efecto de la concentración del BCA sobre la ecogenicidad <i>in vitro</i> para las nanocápsulas llenas de aire a 10.0 MHz. Resumen de las tablas obtenidas por el programa SigmaPlot 11.0	95
5. Anexo 5. Publicaciones	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de una onda sonora. a) Distribución uniforme de moléculas en un medio; b) Desplazamiento de un dispositivo generando una zona de compresión; c) Regreso del dispositivo a su posición original produciendo una zona de rarefacción; d) El movimiento alternado del dispositivo produce la propagación longitudinal de las ondas sonoras.....	8
Figura 2. Espectro de frecuencias sonoras indicando el rango de frecuencias para cada una de las regiones.	8
Figura 3. Características de una onda sonora.	10
Figura 4. Resumen de las diferentes interacciones de una onda ultrasónica y la interfase de un material.....	14
Figura 5. Comportamiento de un ACUS a muy bajas potencias acústicas. El ACUS reduce su tamaño en el pico positivo de presión y lo aumenta en el pico negativo de presión.	20
Figura 6. Comportamiento de un ACUS a potencias altas acústicas. El ACUS reduce su tamaño en el pico positivo de presión y lo aumenta en el pico negativo de presión, sin embargo, la oscilación no es lineal, la expansión del tamaño tiene mayor duración que la reducción.....	21
Figura 7. Diagrama de flujo experimental esquematizado	32
Figura 8. Distribución de tamaño de partícula de las nanoesferas de PLGA obtenidas mediante el método de emulsificación-difusión y medido mediante DLS.	43
Figura 9. Distribución de tamaño de partícula de las nanocápsulas con núcleo oleoso de Captex® 200 y membrana polimérica de PLGA obtenidas mediante el método de emulsificación-difusión y medido mediante DLS.	43

Figura 10. Distribución de tamaño de partícula de la emulsión de PFP obtenida mediante el método de desplazamiento de disolvente y medido mediante DLS.....	44
Figura 11. Imagen capturada mediante microscopia óptica en donde se muestran las microcápsulas de PFP elaboradas mediante el método de polimerización interfacial observadas a 100x.....	46
Figura 12. Micrografías obtenidas mediante MEB de las nanopartículas preparadas a partir de la metodología de doble emulsión empleando un disolvente inmiscible con agua. (Barra = 1µm)	48
Figura 13. Imágenes capturadas mediante microscopia óptica de las macropartículas preparadas a partir de la metodología de doble emulsión a partir de un disolvente inmiscible en agua, en donde la evaporación se logró mediante agitación a 500 rpm durante 3 horas. (Izquierda: 40x, derecha: 100x).....	48
Figura 14. Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula para los sistemas preparados mediante el uso de un disolvente inmiscible con el agua.....	50
Figura 15. Micrografías obtenidas mediante MEB de las partículas preparadas modificando la velocidad de agitación en donde se aprecia la disminución de la porosidad. A) 500, B) 1000 rpm, C) 3000 rpm, D) 5000 rpm y E) 11000 rpm, todas a un tiempo de 3 h. (Barra = 10 µm para A, B, C y D; Barra=1 µm para E).	52
Figura 16. Características de las partículas obtenidas a partir del método de doble emulsión con las modificación del empleo un disolvente parcialmente miscible. En la parte izquierda se muestra el tubo con agua utilizado con referencia y en la derecha se observa el tubo en donde se aprecia la presencia de dos tipos de partículas unas de baja densidad que flotan en la parte superior mientras que otras quedan formando parte de la pastilla.....	53
Figura 17. Distribución del tamaño de partícula analizado por DLS. En negro (distribución de la izquierda), las nanopartículas encontradas en la pastilla y en rojo (distribución de la derecha), las nanopartículas de baja densidad que flotaron.	54

Figura 18. Micrografías obtenidas mediante MEB de las nanopartículas preparadas mediante el método de doble emulsión cuando se empleó un disolvente parcialmente miscible con agua. A) Población de nanocápsulas “llenas” de aire y B) nanopartículas incompletas mostrando cavidades (Barra = 1 μm)	55
Figura 19. Micrografías obtenidas mediante MET de las nanopartículas preparadas mediante el método de doble emulsión empleando un disolvente orgánico parcialmente miscible con agua. A) Nanoesferas de PLGA y B) nanocápsulas llenas de aire (Barra = 1 μm).....	55
Figura 20. Mecanismo propuesto para la formación nanocápsulas “llenas de aire”. A) Formación de la emulsión primaria; B) Formación de la emulsión secundaria; C) Difusión del disolvente orgánico debido a su eliminación por presión reducida; D) Formación de una nanocápsula con núcleo hidrofílico; E) Generación y retención de gas dentro de la nanocápsula; F) Generación de una presión excesiva y rompimiento de la capsula generando nanocápsulas incompletas y G) Formación de nanoesferas desde las etapas A, B y C debido a la migración de la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa.....	57
Figura 21. Diseño del sistema para la evaluación <i>in vitro</i> de la ecogenicidad. A) Unidad de muestreo constituido por el portamuestras y el transductor inmerso en un tanque de acrílico; B) Emisor-receptor de pulsos ultrasónicos; C) Osciloscopio para el análisis de los pulsos adquiridos.....	61
Figura 22. Fotografía de la unidad de muestreo la cual fue diseñada y construida especialmente para esta investigación.	62
Figura 23. Ejemplos de capturas de pantalla obtenidas de la dispersión acústica de los nanosistemas. A) Línea base; b) NE 0.030 mg/mL; c) NE 0.0375 mg/mL d) NE 0.045 mg/mL.....	63
Figura 24. Curva dosis-respuesta para los diferentes sistemas a 5 MHz.	64

Figura 25. Curvas dosis- respuesta de las preparaciones elaboradas por el método de doble emulsión – evaporación del disolvente a diferentes frecuencias.....	67
Figura 26. Curvas dosis- respuesta de las nanocápsulas “llenas” de aire construidas para observar el efecto de la concentración del BCA en la ecogenicidad.....	68
Figura 27. Disminución de la señal con respecto al tiempo para las nanocápsulas preparadas con 3 % de BCA a una concentración de 0.045 mg/mL.....	69
Figura 28. Gráfico del coeficiente de atenuación contra la frecuencia para la dispersión de nanocápsulas “llenas” de aire, empleando los 3 transductores de 5, 7.5 y 10 MHz.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Velocidades aproximadas de las ondas sonoras en diferentes materiales	11
Tabla 2. ACUS desarrollados y aprobados para su uso clínico.	23
Tabla 3. Evolución generacional de los ACUS y algunas características de cada generación.	24
Tabla 4. Características durante los ACUS preparados a escala nanométrica	30
Tabla 5. Experimentos realizados en la preparación de nanocápsulas llenas de aire a partir del método de doble emulsión, empleando un disolvente inmiscible en agua.	35
Tabla 6. Experimentos realizados durante la preparación de nanocápsulas llenas de aire a partir del método de doble emulsión, empleando un disolvente parcialmente miscible en agua.	36
Tabla 7. Tabla de resultados del tamaño de partícula promedio obtenido bajo las diferentes condiciones de agitación, preparadas mediante el método de doble emulsión empleado un disolvente inmiscible en agua.	49
Tabla 8. Valores de densidad teórica y densidad isopícnica experimental	58
Tabla 9. Influencia de la velocidad, tiempo y tipo de agitación sobre el tamaño de partícula en la preparación de las nanocápsulas “llenas” de aire mediante el empleo de un disolvente parcialmente miscible con agua.	59
Tabla 10. Impedancias acústicas de los diferentes materiales utilizados en la preparación de las nanopartículas.	65

RESUMEN

El presente trabajo describe la preparación de diversos sistemas nanoparticulados biodegradables y/o biocompatibles tales como: nanoesferas, nanocápsulas líquidas, nanocápsulas gaseosas y nanoemulsiones y la evaluación *in vitro* de las mismas como agentes de contraste para ultrasonido. La metodología para la preparación de los sistemas nanoparticulados se basó en técnicas que emplean polímeros preformados y su desolvatación en medios no disolventes para inducir su agregación en forma de nanopartículas. Se utilizó el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), el cual es un polímero biodegradable para la formación de la matriz de los sistemas sólidos y para la pared en los sistemas capsulares. Además de la preparación de las dispersiones coloidales sólidas (nanoesferas), se intentó la encapsulación de líquidos como el perfluoropentano y el propilenglicol dicaprilato/dicaprato, este último, un aceite biocompatible. La preparación de nanocápsulas gaseosas se realizó mediante la modificación del método de doble emulsión-evaporación del disolvente, empleando bicarbonato de amonio (BCA) como generador de gas para obtener una vez evacuado el gas, nanocápsulas “llenas” de aire. Los sistemas nanoparticulados formados se caracterizaron fisicoquímicamente, evaluando parámetros como tamaño de partícula, densidad, morfología y potencial zeta (ζ). Se determinó el aumento *in vitro* de la señal del eco generado (ecogenicidad) en las preparaciones mediante un sistema de ultrasonido unidimensional. El sistema de evaluación estuvo constituido por, un emisor-receptor de ancho de banda de 35 MHz, tres transductores de 5, 7.5 y 10 MHz y un osciloscopio digital de un ancho de banda de 100 MHz. Los métodos de preparación permitieron obtener sistemas monodispersos con un tamaño promedio entre los 200-400 nm y mediante microscopía electrónica de transmisión se evidenció la presencia de una morfología capsular (núcleo-pared) al observar las nanocápsulas “llenas” de aire, mientras que para las nanoesferas se observó una densidad electrónica homogénea sugiriendo un sistema matricial. La densidad isopícnica de los sistemas fue regida por la naturaleza del núcleo, siguiendo el orden: nanoesferas >nanocápsulas líquidas>nanocápsulas “llenas” de aire.

Se encontró que el aumento en la ecogenicidad *in vitro* de las nanocápsulas “llenas” de aire fue de 15 dB a una concentración de 0.045 mg/mL a una frecuencia de 10 MHz, mientras que las nanoesferas y las nanocápsulas con núcleo líquido mostraron un aumento mínimo de 2 dB. A las frecuencias de 5 y 7.5 MHz todas las preparaciones tuvieron una ecogenicidad baja (2 dB). Se evaluó el efecto de la concentración del BCA durante la preparación de las nanocápsulas “llenas” de aire sobre la ecogenicidad. Se encontró que el aumento en la señal fue de 14.6 ± 1.41 dB, 15.3 ± 1.0 dB y 13.6 ± 2.0 dB cuando se utilizó BCA al 1%, 3% y 5%, respectivamente, a una concentración de nanopartículas de 0.0375 mg/mL. Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de las nanocápsulas “llenas” de aire a una concentración de 0.045 mg/mL, midiendo la pérdida de la señal con respecto al tiempo, la cual fue de solo 2 dB al cabo de 30 minutos, sugiriendo una elevada estabilidad a la ruptura. En conclusión, se logró preparar diferentes sistemas submicrónicos en los cuales se observó que sus características morfológicas y propiedades fisicoquímicas juegan un papel importante en su poder ecogénico. Las nanocápsulas “llenas” de aire fueron los sistemas con mayor potencial para ser empleados como agentes de contraste en ultrasonido ya que presentan ecogenicidad moderada, alta estabilidad y baja dosis de aplicación, además su tamaño submicrónico les permitiría poderse acumular en tumores y mejorar su detección.

ABSTRACT

This document describes the preparation of various biodegradable and / or biocompatible nanometric systems such as nanospheres, liquid nanocapsules, gaseous nanocapsules and nanoemulsions and their *in vitro* evaluation as ultrasound contrast agents. The methodology for the preparation of the nanoparticulate systems was based on techniques which employing preformed polymers and their subsequent desolvation into non solvent media to induce aggregation in nanoparticulate form. It was used poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), a biodegradable polymer for the formation of the solid matrix and capsular wall. It was attempted the preparation of solid colloidal dispersions (nanospheres) and liquid nanocapsules within perfluoropentane and propylene glycol dicaprylate / dicaprinate, the latter a biocompatible oil. The preparation of gas core nanocapsules was performed by modifying the method of double emulsion-solvent evaporation, using ammonium bicarbonate (ABC) as a gas generator, once the gas was evacuated; air- filled nanocapsules were obtained. The nanoparticulate systems were physicochemically characterized by evaluating parameters such as particle size, density, morphology and ζ potential. The *in vitro* echogenicity was determined for the preparations, through an A-mode ultrasound system. The evaluation system consisted of: a pulser-receiver with a bandwidth of 35 MHz, three transducers of center frequencies of 5, 7.5 and 10 MHz and a digital oscilloscope with a bandwidth of 100 MHz. The preparation methods allowed to obtain monodisperse systems with average size between 200-400 nm. The transmission electron microscopy showed the presence of a capsule morphology (core-wall) when air-filled nanocapsules were observed, whereas for nanospheres a homogeneous electron density matrix system was observed. The isopycnic density of the systems was governed by the nature of the core in the order: nanospheres > liquid nanocapsules > air-filled nanocapsules.

It was found that the increase in the *in vitro* echogenicity of air-filled nanocapsules was 15 dB at a concentration of 0.045 mg / mL and at the frequency of 10 MHz, while the nanospheres and nanocapsules showed a minimal increase of 2 dB. At the frequencies of 5 and 7.5 MHz all preparations had lower echogenicity (2 dB). The effect of the concentration of ABC during the preparation of air-filled nanocapsules on the echogenicity was evaluated. It was found that the increase in the signal at 1%, 3% and 5% of ABC (wt./vol.), at a concentration of 0.0375 mg agent / mL was 14.6 ± 1.41 dB, 15.3 dB and $13.6 \pm 1.0 \pm 2.0$ dB, respectively.

Additionally, the stability of air-filled nanocapsules was tested at a concentration of 0.045 mg / mL by measuring the loss of the signal with respect to the time. The signal reduction was only 2 dB after 30 minutes, suggesting a high stability to rupture. In conclusion, it was possible to prepare different submicron systems in which their morphological and physicochemical properties plays an important role in their echogenic power. The air-filled nanocapsules shows potential to be used as ultrasound contrast agents due to their moderate stability and low application dose, additionally its submicron size allows to be cumulated in tumors for improved detection.

I. INTRODUCCIÓN

El Ultrasonido (US) representa una invaluable herramienta médica para el diagnóstico de enfermedades, si se le compara con otras modalidades diagnósticas imaginológicas. El US tiene diversas ventajas entre ellas, que no es invasivo, la imagen es obtenida en tiempo real, es portátil, es seguro y barato (1-3), además se encuentra de manera extendida en todas las unidades médicas. Como se mencionó, a través del US es posible generar imágenes de manera segura y en tiempo real; sin embargo, el diagnóstico acertado depende de la calidad de la imagen obtenida y de la interpretación de la misma relacionada con el entrenamiento del radiólogo. Por lo tanto, es importante la adquisición de imágenes en donde se identifiquen tanto el tejido anormal y el saludable; no obstante, esto no es posible siempre ya que en ocasiones las propiedades acústicas de los tejidos anormal y normal son similares, dando como resultado que la diferencia de señales sea de baja intensidad y la imagen presente un bajo contraste (4). Para mejorar la resolución se hace necesario el incremento de la potencia o la frecuencia de sonicación, con lo cual se ve limitado su uso más profundo y puede traer consigo efectos adversos. Esta situación, ha llevado al desarrollo de los agentes de contraste que aumentan la señal acústica y por ende, mejoran la calidad de las imágenes obtenidas (5).

Los agentes de contraste para ultrasonido (ACUS) que actualmente se encuentran disponibles en el mercado son, en general, sistemas particulados de tamaño micrométrico, diseñados con el objetivo de aumentar la diferencia de señal entre el tejido de interés y sus alrededores. Los ACUS son utilizados cuando se desea visualizar estructuras que presentan un bajo contraste. Estas micropartículas están constituidas por burbujas de gas de entre 3 – 10 μm de diámetro estabilizadas por una pared de lípidos, por lo que reciben el nombre de microburbujas. La introducción de las microburbujas en imaginología ha permitido principalmente el desarrollo de áreas como la ecocardiografía y la angiografía, apoyadas principalmente con estudios de US en modo Doppler; sin embargo, las microburbujas tienen un uso limitado en la detección de tumores. La detección de tumores mediante US es uno de los retos desde la década pasada, ya que en la actualidad las técnicas imaginológicas de elección son la tomografía computarizada o

la resonancia magnética nuclear, las que son más costosas para los pacientes, el precio de los equipos es más elevado y son menos extendidas en las unidades médicas.

En la última década se ha propuesto el uso de nanopartículas como acarreadores de fármacos con el objetivo de reducir los efectos adversos e incrementar la eficacia en el tratamiento de cáncer. Este tipo de tecnologías pueden presentar varias ventajas también en imaginología, se ha planteado que ACUS 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 de los vasos sanguíneos con alta permeabilidad, como los que se encuentran en los tumores activos (6). En la actualidad existen pocos trabajos publicados acerca de ACUS de tamaño submicrónico y en los sistemas reportados, el principal problema es que tienen un tiempo de vida muy corto debido a que no poseen una pared rígida que soporte los cambios de presión (7). En ese sentido, el presente proyecto tuvo como finalidad el desarrollo de un ACUS de escala nanométrica que debido a su pared polimérica y a la naturaleza del material encapsulado en su interior, fuera capaz de ser ecogénico y tuviera una estabilidad mayor que los reportados actualmente.

II. OBJETIVOS

1. General

Preparar diferentes sistemas nanoparticulados (nanoesferas, nanocápsulas líquidas, nanocápsulas gaseosas y nanoemulsiones), mediante técnicas que empleen polímeros preformados para posteriormente evaluar su ecogenidad *in vitro* a través de un sistema de ultrasonido en modo A.

2. Particulares

1. Preparar nanoesferas de PLGA, nanocápsulas y nanoemulsiones de un aceite biocompatible, mediante la adaptación del método de emulsificación-difusión para su evaluación *in vitro* como agente de contraste en ultrasonido.
2. Preparar nanocápsulas y nanoemulsiones de perfluoropentano mediante la adaptación del método de emulsificación-difusión para su evaluación *in vitro* como agente de contraste en ultrasonido.
3. Desarrollar un método para la preparación de nanocápsulas con núcleo gaseoso y pared polimérica para su evaluación *in vitro* como agente de contraste en ultrasonido.
4. Evaluar el tamaño y distribución de partícula, densidad, potencial ζ y morfología de los sistemas nanoparticulados preparados mediante diversas técnicas para caracterizarlos fisicoquímicamente.
5. Diseñar y construir un sistema de ultrasonido unidimensional (modo A) para determinar la ecogenidad *in vitro* de los diferentes sistemas nanoparticulados.
6. Evaluar la ecogenidad *in vitro* de las preparaciones mediante un sistema de ultrasonido unidimensional (modo A) a través de la construcción de una curva dosis-respuesta.
7. Determinar el tiempo máximo en que se mantiene la ecogenidad *in vitro* para determinar la estabilidad física del agente de contraste.

III. MARCO DE REFERENCIA

3. Ultrasonido diagnóstico (USD)

3.1. Imaginología

Hoy en día, uno de los mayores retos en el ámbito clínico es el cómo adquirir, procesar y mostrar grandes cantidades de información acerca del cuerpo humano; sabiendo que su estructura y función es demasiado compleja. La información recabada debe ser además asimilada, interpretada y utilizada de manera fidedigna y eficiente para poder tener un diagnóstico acertado; siendo que el diagnóstico es un prerrequisito antes de iniciar un tratamiento terapéutico o quirúrgico para el abatimiento de una enfermedad. En la mayoría de los casos, el diagnóstico se basa en una combinación de elementos como: la historia clínica del paciente, estudios de laboratorio y la examinación médica con y sin el uso de diagnóstico asistido por imágenes. El uso de imágenes es una de las vías más comunes para la adquisición de información del estado general de salud o enfermedad del cuerpo.

En las últimas décadas, se ha denominado imaginología (término aceptado por la Real Academia Española de la Lengua, <http://ema.rae.es/drae/>) a la rama 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 (8). Las imágenes obtenidas por las diferentes modalidades tienen en común el hecho de requerir que el objeto (*i.e.* tejido) en estudio interactúe con alguna fuente de energía externa, pudiendo ser radiación ionizante o de otras fuentes de energía que no lo sean. Entre las fuentes de energía más comunes están los rayos X, los rayos gamma, la luz visible, la luz ultravioleta, el infrarrojo, el campo magnético, el campo eléctrico, el US, etc. La interacción de la energía con el tejido en estudio debe revelar diversas características del objeto mismo, como su transmisión, absorción, emisión, reflexión, conducción, magnetización, entre otras; así como sus cambios con respecto al tiempo. Finalmente, estas características nos indicarán propiedades del tejido como: su densidad de masa, densidad electrónica, densidad protónica, número de átomos, velocidad, localización, flujo, relajación, temperatura, etc. (9). En la actualidad se pueden reconocer al menos 5 modalidades principales para la obtención de imágenes con fines diagnósticos, éstas son: a) los rayos X, en esta modalidad se incluye tanto los tradicionales

como los asistidos por computadora llamado Tomografía Computarizada (TC); la medicina nuclear, incluyendo técnicas como la cintigrafía, b) la tomografía por emisión de positrones (TEP) y la tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU); c) la resonancia magnética nuclear diagnóstica (RMN), d) la óptica y e) el US (10, 11). En la práctica, aproximadamente el 80%- 90% de los problemas médicos que requieren del diagnóstico por imágenes pueden ser resueltos empleando las modalidades básicas de rayos X y/o el US (12).

3.2. El ultrasonido como herramienta de diagnóstico

Al igual que muchas de las otras modalidades imaginológicas, la introducción del US diagnóstico en medicina se originó como resultado del avance tecnológico propiciado en los sectores de defensa militar durante la Primera y Segunda Guerra Mundial. En el caso particular del ultrasonido diagnóstico (USD), su origen se remonta al desarrollo del SONAR (*sound navigation and ranging*) empleado en los submarinos, este principio fue aplicado por primera vez en 1962 por Donald (9) para el desarrollo del US obstétrico permitiendo al US ser la primera técnica que empleaba energía no ionizante.

El USD o ultrasonografía consiste en una modalidad que busca explorar el interior del cuerpo humano por medio de ondas ultrasónicas que atraviesan la piel e interaccionan con los órganos y/o estructuras que se encuentran en su trayectoria. Esta interacción genera ecos cuyas características son el resultado de las propiedades mecánicas o elásticas de los objetos. Los ecos generados en conjunto son adquiridos y analizados para formar una imagen.

En la actualidad, el USD es una de las modalidades imaginológicas más extendidas y empleadas a nivel mundial, esto es debido a las diversas ventajas que posee y que se ven aumentadas cuando se les compara con otras modalidades. Entre las principales ventajas que presenta el USD están que es:

- a) No invasivo
- b) En tiempo real
- c) Portátil
- d) Seguro
- e) Barato

El USD ha sido aplicado en un amplio número de áreas de la medicina, sin duda entre las más conocidas está el área ginecológica y obstétrica principalmente para el monitoreo del feto durante el embarazo, sin embargo, también tiene aplicación en la detección de tumores en ovario y otras alteraciones relacionadas. Una segunda área de importancia similar es la cardiovascular, principalmente la ecocardiografía cuyos estudios permiten el diagnóstico de anomalías estructurales en el corazón y también problemas relacionados con el flujo sanguíneo, los cuales pueden ser detectados a través de la medición directa de la velocidad del flujo sanguíneo mediante sub-modalidades como el US Doppler, otras aplicaciones son en la detección de tumores en la cavidad abdominal (*i.e.* hígado, páncreas, bazo, etc.) y en otras estructuras como los senos. El USD también tiene otras áreas de aplicación como son la oftálmica y la dermatológica.

La instrumentación mínima de un equipo de USD consta de tres elementos básicos: la unidad de emisión-recepción de los pulsos eléctricos, el transductor y el sistema de visualización, un cuarto elemento virtual consiste en la unidad de procesamiento de las señales recibidas, las cuales requieren ser analizadas y filtradas para dar paso a la imagen. El USD puede ser clasificado de acuerdo al modo por el cual el eco recibido es representado, distinguiéndose 3 modos: el modo A o unidimensional, el modo B, el modo M y el modo Doppler (9, 13).

El modo A: Es también llamado modo unidimensional o modo de amplitud, ya que en este caso, el eco generado por un obstáculo es representado como un pico en donde la intensidad del pulso corresponde con el valor de la amplitud del pico representado, de igual manera el tiempo de retraso del pulso corresponde a la distancia a la cual se encuentra este objeto. Es ampliamente utilizado en sistemas *in vitro*.

El modo B: Es también llamado modo bidimensional o de luminosidad, en él la imagen es representada en dos dimensiones donde la luminosidad de una zona es más alta en lugares en los que el retorno del eco es más fuerte. Los valores de luminosidad pueden ser representados en una escala de grises.

El modo M: Está basado en el Modo B pero es usado para rastrear movimiento, la posición de cada eco es presentado como una función del tiempo.

El modo Doppler: recibe su nombre porque su funcionamiento se basa en el efecto que produce una fuente emisora de sonido cuando se encuentra en movimiento o en general cuando la distancia entre el emisor y el receptor cambia como resultado del movimiento. Existen a su vez, diferentes sub-modos como lo es el Doppler pulsado y el continuo.

Por otra parte, debido a la introducción de los agentes de contraste se han desarrollado nuevas modalidades para explotar al máximo sus propiedades acústicas, como ejemplo de las modalidades desarrolladas están el US armónico, el US de pulso invertido, el US de alta frecuencia y el power Doppler (13, 14).

3.3. Principios físicos del ultrasonido diagnóstico

3.3.1. El sonido

El sonido es una vibración mecánica producida por un cuerpo elástico, éste viaja a través de un medio con una velocidad definida y en forma de una onda. Las ondas generadas por el cuerpo elástico son transferidas a las moléculas del medio propagador provocando oscilaciones alternas de compresión y rarefacción (*Figura 1*). Como podrá inferirse, las ondas del sonido son un disturbio mecánico del medio mediante el cual se transporta la energía del sonido; por lo tanto, a diferencia de las ondas electromagnéticas, el sonido requiere un medio elástico deformable para su propagación, por lo que, no se propaga en la ausencia de materia.

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 y los infrasonidos se encuentran por debajo de los 15 Hz (*Figura 2*).

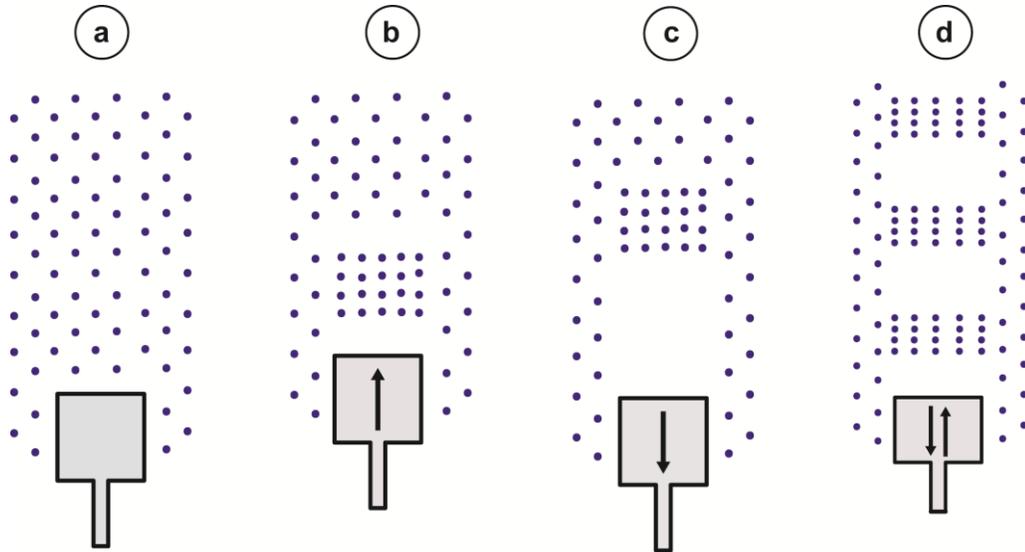


Figura 1. Producción de una onda sonora. a) Distribución uniforme de moléculas en un medio; b) Desplazamiento de un dispositivo generando una zona de compresión; c) Regreso del dispositivo a su posición original produciendo una zona de rarefacción; d) El movimiento alternado del dispositivo produce la propagación longitudinal de las ondas sonoras.

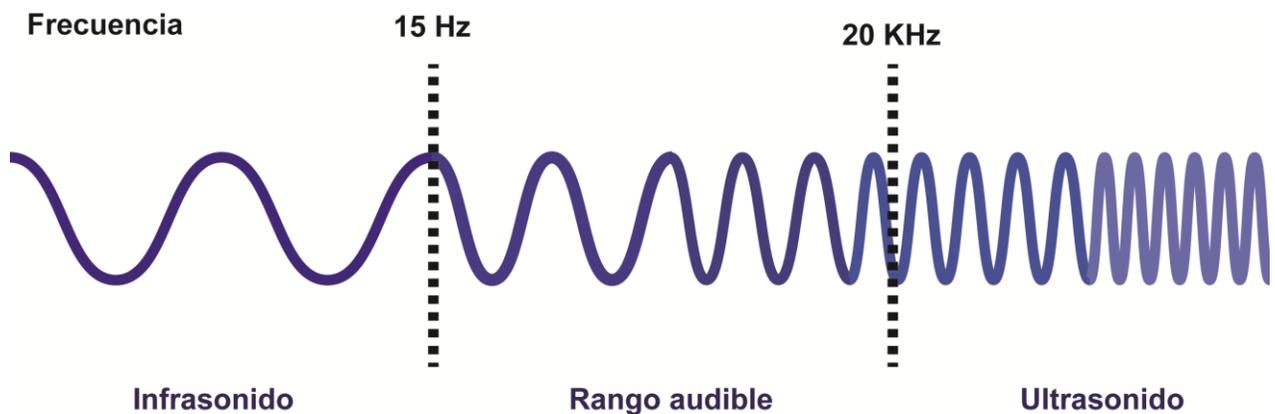


Figura 2. Espectro de frecuencias sonoras indicando el rango de frecuencias para cada una de las regiones.

El USD, como se mencionó anteriormente, es una técnica exploratoria que utiliza para el caso clínico sonidos de frecuencias generalmente 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 interactúan con los materiales biológicos que atraviesan, especialmente con las estructuras de los tejidos blandos del cuerpo humano.

3.3.2. Generación de ondas ultrasónicas

El desarrollo de dispositivos para la generación de ondas ultrasónicas tiene su origen a partir del descubrimiento del efecto piezoeléctrico por los científicos franceses Pierre and Jacques Curie en 1888; posteriormente Paul Langevin, se dedicó a desarrollar materiales piezoeléctricos que actuaran como emisores y receptores de ondas sonoras de alta frecuencia (9). El efecto piezoeléctrico es presentado por algunos cristales que, en respuesta a una presión aplicada, desarrollan una diferencia de potencial en la cara opuesta de donde fue ejercida la presión, generalmente este efecto es reversible por lo que el cristal recupera su forma una vez que la presión cede. Esta diferencia de potencial genera una señal eléctrica, en donde su magnitud es directamente proporcional a la presión aplicada. La mayoría de los cristales piezoeléctricos sufren el efecto contrario, es decir, la aplicación de un voltaje a través del cristal produce una deformación ya sea una compresión o extensión dependiendo de la polaridad del voltaje. En el ámbito del ultrasonido, se suele denominar transductores a los dispositivos emisores y receptores de ultrasonidos debido a que son capaces de transformar la energía mecánica en eléctrica y viceversa.

3.3.3. Propiedades de la ondas ultrasónicas

El sonido se propaga a través de zonas de compresión y rarefacción, el cual constituye un ciclo de la onda sónica, dicho ciclo puede ser representado en una gráfica de densidad de partículas versus distancia en la dirección de propagación de la onda ultrasónica. La distancia que abarca un ciclo es conocida como la longitud de onda, mientras que el número de ciclos por unidad de tiempo es conocido como la frecuencia, la cual se expresa generalmente en una unidad denominada Hertz (Hz). Por otra parte, la amplitud hace referencia a la máxima altura o respuesta de la onda durante el ciclo y finalmente el producto de la frecuencia (ν) y la longitud (λ) es la velocidad de la onda (c), es decir, $c = \nu \lambda$.

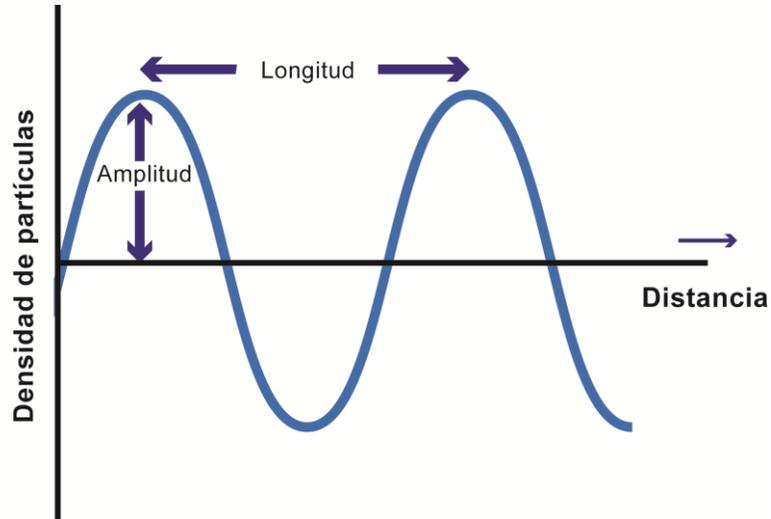


Figura 3. Características de una onda sonora.

3.3.3.1. La velocidad del sonido

La velocidad del sonido esta en función de las propiedades del medio en el que se propaga. En medios con baja densidad de materia como el aire y otros gases, las moléculas tienen que viajar distancias relativamente grandes antes de interactuar con sus moléculas vecinas, como resultado la velocidad de propagación será baja. En contraste, en los sólidos la velocidad de propagación es alta debido a la cercanía de las moléculas que los componen. En los líquidos el valor de la velocidad es intermedio entre los gases y los sólidos. En la mayoría de los tejidos y estructuras biológicas, la velocidad del sonido es similar a la encontrada en el agua la cual presenta un valor de aproximadamente 1540 m/s, salvo algunas excepciones como las encontradas en pulmones y huesos, en donde el valor se asemeja más al que se halla en gases y sólidos, respectivamente. Adicionalmente, la velocidad del sonido está determinada también por la compresibilidad del medio, un medio con alta compresibilidad deriva en una baja velocidad de propagación y viceversa.

Tabla 1. Velocidades aproximadas de las ondas sonoras en diferentes materiales (9, 15)

Material	Velocidad (m/s)	Material biológico	Velocidad (m/s)
Acetona	1174	Grasa	1475
Aire	331	Cerebro	1560
Aluminio	6420	Hígado	1570
Acero inoxidable	5740	Riñón	1560
Etanol	1207	Bazo	1570
Vidrio (Pyrex)	5640	Sangre	1570
Plástico (Acrílico)	2680	Musculo	1580
Mercurio	1450	Lente del ojo	1620
Nylon (6-6)	2560	Hueso	3360
Polietileno	1950	Tejido blando (promedio)	1540
Agua destilada (25°C)	1498		
Agua destilada (50°C)	1540		

3.3.3.2. La intensidad del sonido

Una onda ultrasónica para poder atravesar un medio requiere de energía, la cantidad de energía transportada por unidad de tiempo es conocida como potencia (P), mientras que la intensidad (I) es la potencia por unidad de área, es otras palabras es la energía que incide en un área por unidad de tiempo. La intensidad es usualmente expresada en términos comparativos con una intensidad de referencia. Por ejemplo, la intensidad de las ondas ultrasónicas enviadas a un cuerpo se compara con la intensidad de las ondas enviadas de regreso por el cuerpo. En términos numéricos, es preferible emplear una escala logarítmica para determinar las diferencias en órdenes de magnitud al momento de comparar la intensidad de ondas acústicas, para ello se ha desarrollado una unidad denominada decibel (dB) definida en la ecuación 1, donde I_0 es la intensidad de referencia.

$$dB = 10 \log \frac{I}{I_0}$$

..... Ecuación 1

La intensidad es función de la presión acústica máxima generada en el medio (P_m), de la densidad del medio (ρ) y de la velocidad de propagación del sonido (c) en ese medio, la ecuación 2 muestra la relación entre dichas variables.

$$I = \frac{P_m^2}{2\rho c} \quad \dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Sustituyendo la ecuación 2 en la 1, tenemos lo siguiente.

$$dB = 10 \log \frac{P_m^2 / 2\rho c}{(P_m)_0^2 / 2\rho c} \quad \dots\dots \text{Ecuación 2}$$

$$dB = 10 \log \left(\frac{P_m}{P_{m0}} \right)^2 \quad \dots\dots \text{Ecuación 3}$$

$$dB = 20 \log \frac{P_m}{P_{m0}} \quad \dots\dots \text{Ecuación 4}$$

Debido a que un transductor convierte la amplitud de la presión de la onda acústica a una señal eléctrica, es posible emplear la amplitud de voltaje al comparar la intensidad de dos ondas ultrasónicas, debido a que la amplitud de la presión es directamente proporcional a la amplitud del voltaje recibido por el transductor.

3.3.3.3. La atenuación del sonido

Cuando el sonido viaja a través de un medio es de esperarse que pierda energía conforme aumenta la distancia de penetración, a este fenómeno se le denomina atenuación. La atenuación hace referencia al mecanismo mediante el cual se pierde dicha energía, la pérdida de energía será dependiente de las interacciones entre la onda acústica y el medio, entre las interacciones que contribuyen a la atenuación están: la absorción, la reflexión, la dispersión, la refracción, la difracción, la interferencia y la divergencia de la onda acústica, sin embargo, la

perdida de energía también puede ser resultado de la transformación de la energía acústica a otras formas de energía como la calorífica.

La atenuación de una onda ultrasónica en un material se representa mediante el coeficiente de atenuación (α), el cual tiene unidades de dB/cm. El coeficiente de atenuación es la suma de los coeficientes individuales de cada uno de los fenómenos que contribuyen a la atenuación. El valor de la intensidad acústica inicial tiene un decaimiento exponencial conforme aumenta la distancia de propagación.

3.3.3.4. Reflexión e impedancia acústica

El comportamiento de una onda acústica cuando se encuentra un obstáculo dependerá de que tan grande sea éste con respecto a la longitud de onda. Si el obstáculo es grande y liso, la onda será reflejada. Si se habla de un haz, una parte de éste será reflejado y la parte remanente será transmitido, a través del objeto, el resultado es la reflexión especular de la energía a la fuente original. Por otro lado, si el objeto es más pequeño o comparable con la longitud de onda, el obstáculo dispersará la energía en varias direcciones, parte de la energía regresará a la fuente original resultando en una reflexión no especular. En el USD, la reflexión especular permite la visualización de los límites entre órganos; mientras que, la reflexión no especular permite la visualización del tejido.

Como se mencionó anteriormente, cuando una onda acústica encuentra un objeto más grande que su longitud de onda se produce la reflexión especular de la misma, la fracción de la energía reflejada por la interfase depende de la diferencia de impedancias acústicas entre el medio y el objeto. La impedancia acústica (Z) de un medio es el producto de la densidad (ρ) y la velocidad del sonido (c) del medio, es decir, $Z = \rho c$.

Para una onda acústica que incide perpendicularmente sobre una interfase, la fracción de la energía incidente que es reflejada (α_R) o coeficiente de reflexión está determinado por la ecuación 5, donde Z_1 y Z_2 son las impedancias de los medios.

$$\alpha_R = \left(\frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right)^2 \quad \text{.....Ecuación 5}$$

Algo importante a notar es que, entre mayor sea la diferencia de impedancias, mayor será la energía reflejada y solo una pequeña cantidad será transmitida, por lo tanto, las interfases aire-tejido y aire-agua generan fuertes reflexiones acústicas. La *Figura 4* muestra un resumen de las interacciones que pueden darse cuando una onda sónica se encuentra con un obstáculo en su trayectoria.

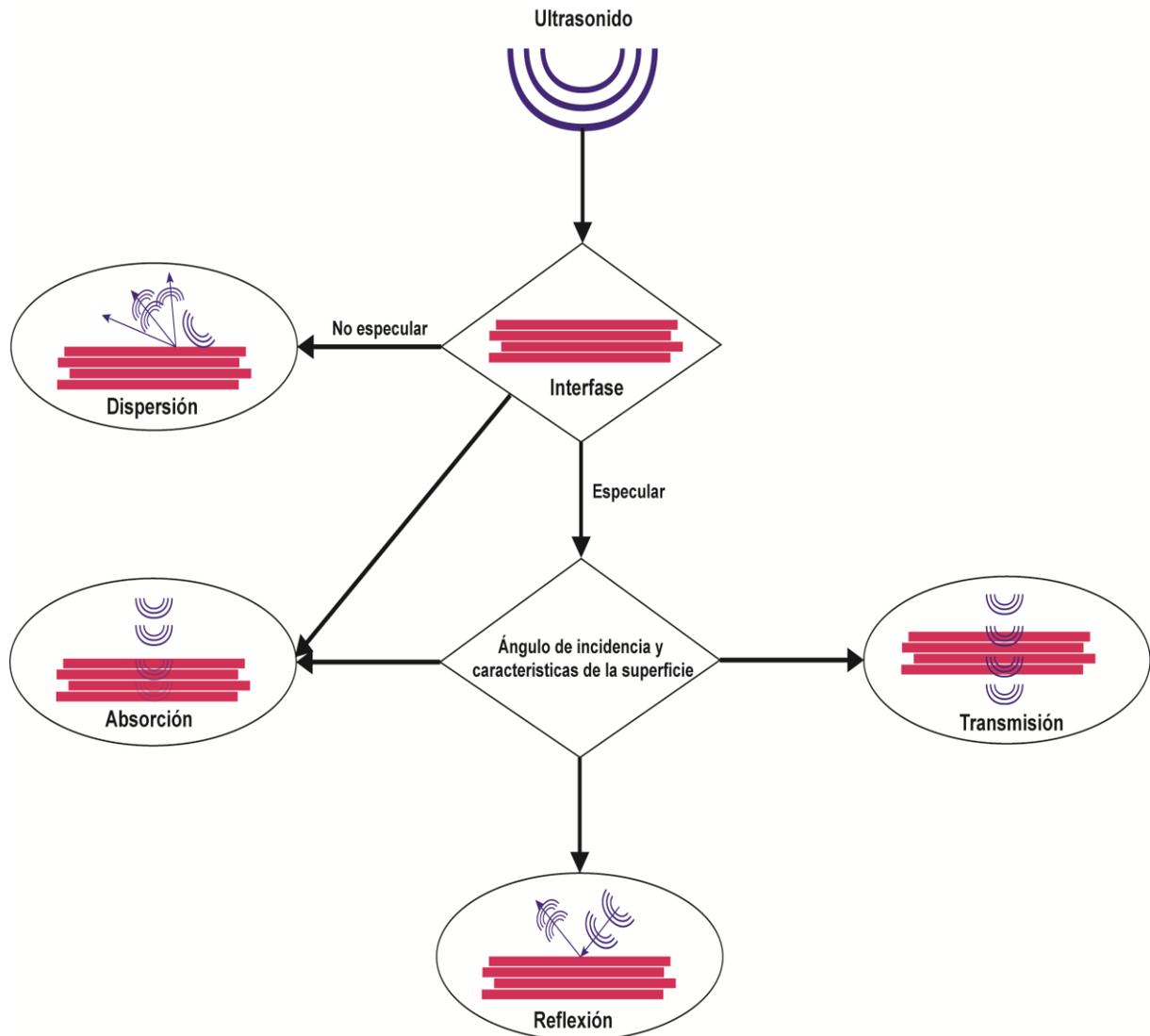


Figura 4. Resumen de las diferentes interacciones de una onda ultrasónica y la interfase de un material.

4. Agentes de contraste para ultrasonido (ACUS)

4.1. Definición y características de los ACUS

Si bien no existe una definición consensada, podría decirse que un 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 (16, 17). Sin embargo, el término ACUS en ocasiones 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 μm , en donde estos huecos o poros son “llenados” con algún tipo de gas (18).

Las características básicas que deben de cumplir los ACUS que pretendan ser usados en la generación de imágenes médicas son (19, 20).

- a) No tóxicos
- b) Inyectables intravenosamente, por bolo o infusión
- c) Ecogénicos
- d) Menores a 7 μm de diámetro
- e) Estables durante el paso cardiaco y pulmonar (capaces de resistir la presión)
- f) Biodegradables
- g) 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, requieren una estabilidad mayor a 5 minutos.

4.2. Áreas de impacto de los agentes de ACUS

La introducción y uso de los agentes de contraste permitió el desarrollo de una nueva modalidad del US, el ultrasonido diagnóstico contrastado. Las áreas médicas de incidencia de esta modalidad son muy diversas, una de las principales es en ecocardiografía, y actualmente aún se tiene un activo interés debido al número importante de aplicaciones de diagnóstico, principalmente para la identificación de estructuras cardíacas, detección de soplos, visualización del flujo sanguíneo, detección de regurgitación valvular, entre otras (21).

Por otra parte, la visualización del hígado con la ayuda de agentes de contraste es un área de un fuerte interés debido a que la visualización de órganos parenquimatosos por los métodos convencionales de US resulta problemático. Esto fue solucionado en parte, con la investigación e introducción en el mercado de ACUS específicos para hígado los cuales serán mencionados en secciones posteriores (22-24). No solo el uso de ACUS ha mejorado la detección de tumores en hígado, sino también en la detección de tumores en el sistema nervioso central (SNC), próstata, seno, etc. (25-29).

El uso de ACUS en la detección de lesiones en la zona abdominal está fuertemente limitado por la presencia natural de aire que actúa como reflector. Bajo este concepto se han desarrollado algunos ACUS administrados por vía oral, los cuales incorporan aditivos para dispersar y desplazar las burbujas de gas, permitiendo imágenes de buena calidad; por ejemplo, se sugirió el uso de un ACUS por vía oral y un ACUS intravenoso para la detección de tumores pancreáticos (30-32).

Finalmente, los ACUS fueron 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 fueron infiltrados dentro de la cavidad uterina (33).

Un detalle importante que se debe considerar durante el diseño de un ACUS es si la intención del agente será aumentar el contraste a un órgano, tejido o únicamente caracterizar el flujo sanguíneo. Si lo que se requiere es la mejora en la visualización de los bordes que delimitan un órgano o caracterizar el flujo sanguíneo, como en el caso de la ecografía, el agente de contraste deberá permanecer distribuido y en una concentración suficiente en sangre, pero sin llegar a perfundir a través del tejido. Mientras que, si lo que se requiere es lograr diferenciar entre un tejido normal y uno anormal inclusive dentro de un mismo órgano, el agente deberá perfundir el

órgano, esto último es más difícil debido a que el tamaño de los vasos sanguíneos es más pequeño y la concentración del agente será también menor. En ambos casos el contraste se logrará por la generación de un eco debido a las partículas presentes en sangre, pero en el segundo caso la relación de la señal tejido-agente será muy similar; es por ello, que la detección de tumores se da principalmente mediante la caracterización de la velocidad del flujo sanguíneo y el nivel de vascularización (16).

4.3. Fundamentos físicos del funcionamiento de los ACUS

Como se mencionó en secciones anteriores, los ACUS deberán de presentar un tamaño menor al diámetro de los capilares sanguíneos; por lo tanto deberán ser menores a 10 μm . Debido a esta restricción de tamaño y considerando que en el ámbito clínico el rango de frecuencias empleadas durante un estudio imaginológico mediante ultrasonidos es de 1 MHz-10 MHz, el aumento de señal que pudiera generar un agente de contraste deberá ser producto del aumento de la reflexión no especular, esto a razón de que el tamaño del agente será por mucho menor a la longitud de onda ultrasónica, la cual será mayor a 154 μm si se considera como 1540 m/s la velocidad del sonido.

Ante este escenario, la capacidad del agente de contraste para generar un eco, a la cual denominaremos *ecogenicidad*, será el resultado de las capacidades dispersoras de la partícula en cuestión. La capacidad dispersora de una partícula puede ser medida a partir de una propiedad llamada intensidad de dispersión (I_d), la cual se define de acuerdo con la ecuación 6 como:

$$I_d = \frac{I_0 \bar{\sigma}}{4 \pi d^2} \quad \dots\dots \text{Ecuación 6}$$

donde, I_0 es la intensidad incidente, d la distancia entre el transductor y la partícula dispersora y $\bar{\sigma}$ es la sección transversal de dispersión (34).

La sección transversal de dispersión es el área efectiva de la partícula que interactúa con las ondas ultrasónicas. La sección transversal $\bar{\sigma}$ (m^2) puede calcularse mediante la aproximación de Born (9) mostrada en la ecuación 7:

$$\bar{\sigma} = \frac{4\pi}{9} k^4 r^6 \left[\left(\frac{\kappa_s - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3(\rho_s - \rho)^2}{2\rho_s + \rho} \right) \right] \quad \text{.....Ecuación 7}$$

Donde k es el número de ondas = $2\pi/\lambda$ (m^{-1}); λ es la longitud de onda (m); r es el radio de la partícula; κ_s es la compresibilidad de la partícula dispersora; κ es la compresibilidad del medio; ρ_s es la densidad de la partícula dispersora (kg/m^3); ρ es la densidad del medio (kg/m^3).

Si agrupamos la ecuación 8 en términos de amplitud (A), compresibilidad (B) y densidad (C), tenemos lo siguiente:

$$\bar{\sigma} = A + \left(B^2 + \frac{C^2}{3} \right) \quad \text{..... Ecuación 8}$$

De las ecuaciones anteriores se deduce que para un radio dado, al aumentar la frecuencia de onda se incrementa la sección transversal de dispersión, mientras que para una frecuencia dada al disminuir el tamaño de partícula se da el caso inverso y por lo tanto la reflexión acústica se verá disminuida. Otros parámetros que tienen importancia primordial son las diferencias en la compresibilidad y la densidad de la partícula comparadas con las propiedades del medio. De estos dos términos la diferencia de compresibilidades toma mayor relevancia, se sabe que los sólidos y líquidos tienen una baja compresibilidad en comparación con los gases. Si consideramos que la sangre tiene una compresibilidad similar a la del agua y que un ACUS estaría constituido principalmente por gas, la diferencia en compresibilidades, y por lo tanto también en impedancias, resultará en una alta ecogenicidad (16, 34). Por ejemplo, la compresibilidad del aire y el agua es $2.3 \times 10^{-4} cm^2/dina$ y $4.6 \times 10^{-11} cm^2/dina$, respectivamente. En comparación, la compresibilidad de una sustancia rígida como níquel es $5.0 \times 10^{-13} cm^2/dina$. Usando una partícula con radio de $5 \mu m$ y una frecuencia de 5 MHz (el rango médico utilizado es 1- 10 MHz), la sección transversal de un líquido, sólido y gas pueden calcularse como aproximadamente $0 m^2$, $6.65 \times 10^{-15} m^2$ y $0.38 m^2$, respectivamente.

Los ACUS en función de la naturaleza y propiedades tanto del gas encapsulado, como de la pared que conforma la cápsula pueden actuar como osciladores armónicos y resonar cuando son sonicados a la frecuencia adecuada, conocida como frecuencia de resonancia. Este fenómeno incrementa la sección transversal de dispersión en 3 veces el orden de magnitud. La

frecuencia de resonancia (f_0) de un ACUS puede determinarse aproximadamente mediante la Ecuación 9 (35).

$$f_0 \approx \frac{1}{2\pi d} \sqrt{\frac{3\gamma}{\rho} \left(P_0 + \frac{\pi S_0}{3\gamma r} \right)} \quad \dots\dots \text{Ecuación 9}$$

Donde d es el diámetro de la partícula dispersora; γ es la constante adiabática de un gas ideal; ρ es la densidad del medio circundante; P_0 es la presión del fluido y S_0 es la elasticidad de la pared. Usando valores para aire y presión atmosférica se tiene que la ecuación 9 puede simplificarse a la expresión dada en la ecuación 10, donde la frecuencia de resonancia f_0 es expresada en kHz y el diámetro d en μm .

$$f_0 = \frac{6500}{d} \quad \dots\dots \text{Ecuación 10}$$

Esto indica que conforme el diámetro disminuye se ve aumentado el valor de frecuencia de resonancia (36).

Para producir una mayor ecogenicidad los ACUS deberán ser sonicados a su frecuencia de resonancia característica, esto tendrá como efecto una expansión y contracción en el diámetro del ACUS, por lo tanto el ACUS actuará como una fuente de emisión del US. El comportamiento que tendrá el ACUS, estará en función de la potencia acústica a la cual estará sometido, la potencia acústica (P_a) se define como el producto de la intensidad (I) por el área (A), es decir $P_a = IA$. A potencias acústicas bajas el ACUS sufrirá una expansión y compresión alternada de la misma amplitud, en donde el tamaño del ACUS crecerá en el pico negativo y reducirá en el pico positivo el cambio será proporcional con la presión acústica aplicada, esto puede apreciarse gráficamente en la Figura 5. Además el ACUS producirá una señal acústica de la misma frecuencia a la cual está siendo sonificado, producto de la oscilación (34).

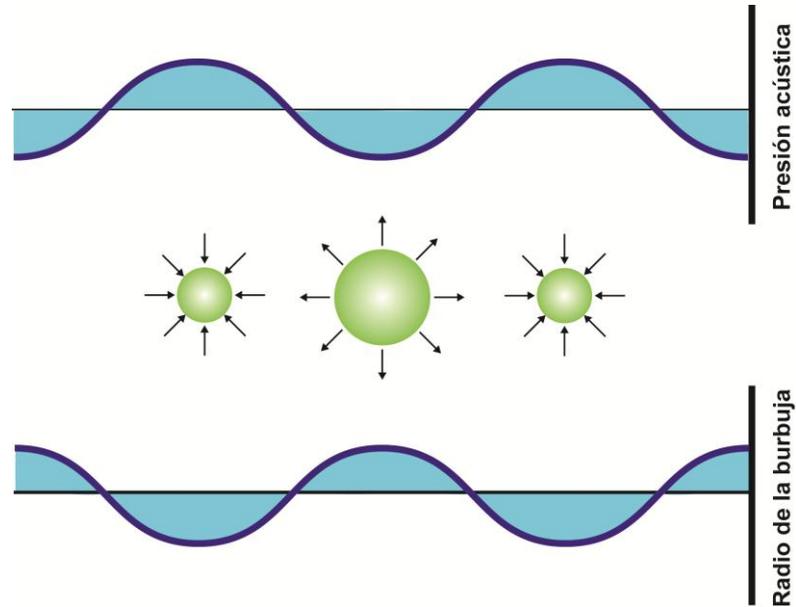


Figura 5. Comportamiento de un ACUS a muy bajas potencias acústicas. El ACUS reduce su tamaño en el pico positivo de presión y lo aumenta en el pico negativo de presión.

Cuando la potencia acústica aplicada a los ACUS es ligeramente alta lleva al punto en donde la expansión y la contracción del tamaño de las burbujas no son igual en amplitud, como puede verse en la *Figura 6*. Esta respuesta no lineal, da origen a la generación de frecuencias armónicas ($2f_0$, $3f_0$, $4f_0$, etc.) y de subarmónicas ($f_0/2$, $f_0/3$, $f_0/4$, etc.). Este fenómeno es el fundamento de la modalidad ultrasónica armónica que fue mencionada en secciones anteriores; la cual se fundamenta en que los tejidos y paredes de los vasos no presentan la generación de frecuencias armónicas mientras que los ACUS si lo presentan permitiendo la obtención de imágenes con el contraste específico (13).

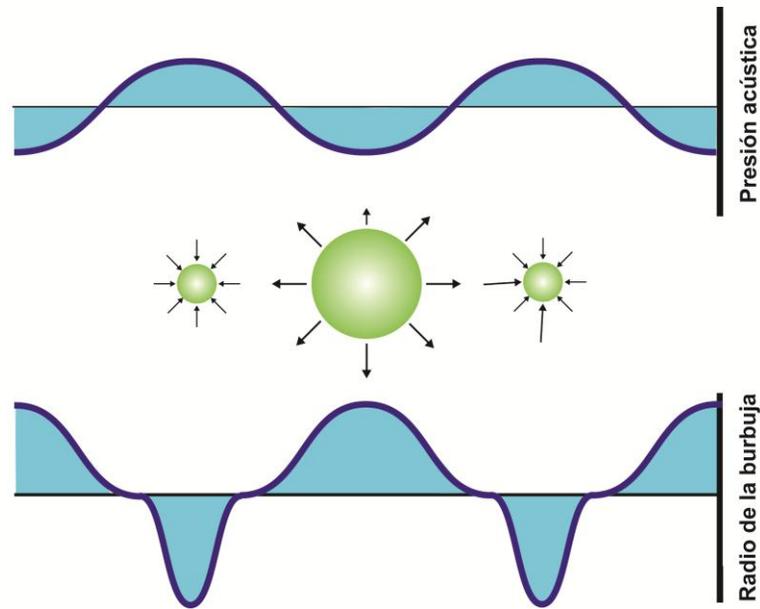


Figura 6. Comportamiento de un ACUS a potencias altas acústicas. El ACUS reduce su tamaño en el pico positivo de presión y lo aumenta en el pico negativo de presión, sin embargo, la oscilación no es lineal, la expansión del tamaño tiene mayor duración que la reducción.

Finalmente, si la potencia acústica aplicada es muy alta el ACUS se romperá y liberará el gas encapsulado, 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 (37), este fenómeno es actualmente explotado en el desarrollo de agentes de contraste en los cuales se ha incluido un principio activo, el cual es liberado mediante el aumento en la potencia del haz ultrasónico.

4.4. ACUS disponibles en el mercado, características principales y limitaciones

El uso de agentes de contraste de ultrasonografía no es un evento novedoso, los inicios del ACUS comienzan con la publicación de Gramiak y Shah en 1968 (38), quienes al inyectar verde de indocianuro (un agente de contraste utilizado en Rayos X) dentro de la aorta de conejo observaron un aumento importante en el contraste durante la realización de una ecocardiografía, llegando a la conclusión de que la mejora se debía a la producción *in situ* de burbujas de aire inducidas por cavitación. Esta observación permitió el posterior desarrollo de

los primeros ACUS comerciales, los cuales deberían en un principio de resolver el problema del tiempo de vida corto de las burbujas de aire y posteriormente, la problemática del paso de la circulación venosa a circulación arterial, debido a que se administraban intravenosamente, esto implicaba que deberían de ser lo suficientemente pequeños y resistentes para pasar a través de los capilares pulmonares.

Fue hasta los 80's, que comenzó el desarrollo de los ACUS comerciales con las observaciones que condujeron hacia la estabilización y miniaturización de microburbujas. Carroll *et al.* (1980) (39) demostraron que las burbujas de nitrógeno encapsuladas con gelatina eran lo suficientemente estables para ser usadas en US. Mientras que Feinstein *et al.* (1984) (40) señalaron que las microburbujas formadas a partir de la sonicación de albúmina sérica humana eran lo suficientemente pequeñas y estables para poder atravesar la circulación pulmonar y opacar el ventrículo izquierdo del corazón. Estos descubrimientos originaron un interés significativo en desarrollar ACUS que estuvieran disponibles comercialmente para un gran número de compañías farmacéuticas.

A partir de estos descubrimientos, diversos programas fueron iniciados para desarrollar un ACUS que fuera fácil de usar a nivel clínico. Schering AG (Berlín, Alemania) fue la primera compañía en lograr este objetivo. El primer ACUS desarrollado por esta empresa y puesto en el mercado europeo en 1991 fue Echovist[®], el cual consistía en burbujas de aire estabilizadas con una matriz de galactosa (41); posteriormente, la misma empresa lanzó en 1996 Levovist[®], nombrado así por ser capaz de opacar el ventrículo izquierdo. Molecular Biosystems Inc. (MBI; San Diego, CA, EUA) desarrolló Alburnex[®], el primer ACUS aprobado por la FDA en 1993 para su distribución en los Estados Unidos (42). Este agente se basó en la tecnología para estabilizar las microburbujas de aire mediante la encapsulación con albumina sérica humana. Otros productos similares fueron Quantison[®] y Myomap[®] (QuadrantLtd, Nottingham, Reino Unido), los cuales consistían en aire estabilizado con albumina recombinante (34). El hecho de que los ACUS desarrollados hasta ese tiempo contuvieran aire resultó en una reducida longevidad *in vivo* y limitó el uso comercial de estos agentes (43). Algunas compañías optaron por cambiar la composición de la pared incluyendo materiales poliméricos, tal fue el caso de Sonavist[®] (Schering AG, Berlin, Alemania), el cual consiste de microburbujas de aire producidas por emulsión-polimerización cuya pared está compuesta de poli(n-butil-2-cianocrilato), además este agente tiene la capacidad de ser captado por la células de Kuppfer siendo el primer ACUS específico para hígado.

Por otra parte, algunas compañías cambiaron su estrategia al uso de varios tipos de perfluorocarbonos (PFC's) para incrementar la persistencia de las primeras microburbujas introducidas en los 90's. Muchos agentes bajo desarrollo incorporaron la tecnología de PFC's en sus formulaciones. Dentro de esos productos se incluyen la reformulación de Albunex[®], el producto final fue nombrado Optison[®] (MBI, EUA), el cual fue aprobado por la FDA para su uso comercial en 1997. En la actualidad, dos son los ACUS aprobados por la FDA, éstos son: Definity[®] (2001) distribuido por Lantheus Medical Imaging Inc. e Imagent[®] (2002) distribuido por Alliance Pharmaceuticals, Inc. Otro agente, SonoVue[®] (Bracco Diagnostics Inc., Italia) utiliza hexafluoruro de azufre, un gas fluorinado de baja solubilidad, el cual fue aprobado en Europa en 2001. Algunos otros ACUS están aún en fases de investigación clínica. Sonazoid[®] (GE Healthcare, Reino Unido) es un ACUS consistente de perfluorobutano encapsulado mediante una capa lipídica, este agente se encuentra aprobado en Europa y Japón desde 2007, es otro caso de un ACUS desarrollado específicamente para hígado. La *Tabla 2* reúne los ACUS mencionados anteriormente junto con información relevante (14, 34, 43-46).

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

Nombre comercial	Gas	Pared	Año de introducción	Fabricante y/o comercializador
Echovist [®]	Aire	Sin pared	1982	Schering AG, Alemania
Levovist [®]	Aire	Ácido palmítico	1985	Schering AG, Alemania
Albunex [®]	Aire	Albúmina	1994	MBI, EUA
Optison [®]	Perfluoropropano	Albúmina	1997	AmershamHealth, RU
Echogen [®]	Perfluoropentano	Surfactante	1997	Sonus, EUA
SonoVue [®]	SF ₆	Fosfolípidos	2001	Bracco Italia
Definity [®]	Perfluoropropano	Fosfolípidos	2001	Bristol-Myers Squibb, EUA
Imagent [®]	N ₂ /Perfluorohexano	Surfactantes	2002	Alliance, EUA
Sonavist [®]	Aire	Poli(cianoacrilato)	2005	Schering AG, Alemania
Sonazoid [®]	Perfluorobutano	Fosfolípidos	2007	Amersham Health, RU

En general, los ACUS han evolucionado por generaciones, la cuales se han identificado porque los ACUS desarrollados durante una generación comparten algunas características especiales. De esta manera, algunos autores consideran que hasta la fecha han sido cuatro las

generaciones de evolución de los ACUS, mientras que otros autores hablan de que estamos en el desarrollo de la quinta, la cual permitirá el desarrollo de ACUS de escala nanométrica y que no solo serán útiles en el diagnóstico sino que también tendrán propiedades terapéuticas. La *Tabla 3* muestra las características de cada una de las generaciones (46).

Tabla 3. Evolución generacional de los ACUS y algunas características de cada generación. Modificado de (19).

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	Estabilidad y persistencia mejoradas
3	Partículas poliméricas micrométricas	Es posible controlar propiedades acústicas, pero no se acumulan en tumores
4	Partículas poliméricas de tamaño submicrónico	Es posible incorporar un agente terapéutico y modular su liberación además de acumularse en tumores

4.4.1. Limitaciones de los ACUS que actualmente están en el mercado

A pesar del avance que ha representado la introducción de microburbujas para el diagnóstico ultrasónico, éstas presentan una serie de limitaciones, riesgo y efectos adversos durante su uso en la práctica clínica, en algunos casos producto de la naturaleza de sus formulaciones y otros debido a su arquitectura y diseño.

Por ejemplo, un número importante de estudios *in vivo* e *in vitro* indican que los ACUS pueden inducir diversos efectos adversos a nivel vascular, entre los cuales destacan: hemorragias, hemólisis, petequias, lisis de plaquetas, etc. Lo anterior es causado principalmente por un

efecto llamado cavitación inercial, el cual causa una onda de choque que daña las estructuras biológicas y conlleva a la ruptura capilar y al daño de las células endoteliales. Si bien estos bioefectos pueden ser causados solo por el US, los ACUS juegan un papel importante en la cavitación inercial ya que actúan como núcleos para ésta durante la desestabilización del ACUS. En este caso las características de elasticidad de la pared son relevantes ya que la desestabilización es producto de un estrés excesivo en la pared durante la zona de rarefacción de la onda ultrasónica. Es importante destacar que la pared de los actuales ACUS en su mayoría está compuesta de fosfolípidos y la resistencia mecánica de la pared es muy pobre, por lo que es fácil la liberación súbita del gas que contienen causando un incremento en el número de núcleos para la cavitación inercial (47-50).

Por otro lado, el tamaño actual de los ACUS (1-3 μm), solo por debajo del diámetro de los capilares les permite tener una adecuada respuesta a las frecuencias de ultrasonidos convencionales, sin embargo, ese tamaño los limita a su uso únicamente como ACUS para aplicaciones en las cuales se requiere que el agente permanezca en el torrente sanguíneo (*blood pool agents*), dejando a un lado las aplicaciones en las cuales se requiere que el agente perfunda a través de un tejido en específico o de interés. Además, su uso se limita mucho más si se pretenden emplear para la detección de tumores. Diversos estudios han demostrado que durante la vascularización de un tumor, la estructura que recubre el endotelio de los vasos sanguíneos es diferente, debido a su rápido y desordenado crecimiento en comparación al que tuviera en condiciones normales. Se ha reportado que existe una hiperpermeabilidad debido a la presencia de poros en el endotelio. Estudios han revelado que el tamaño de estos poros se encuentra entre 400 y 600 nm (51), por lo tanto, para una mejor detección las microburbujas tendrían que extravasarse del torrente sanguíneo a través de esos poros, lo cual por su tamaño resulta limitado (52). Se ha sugerido que la miniaturización a escala nanométrica de estos sistemas podría mejorar la capacidad para detectar tumores en una variedad de órganos como hígado, riñón, páncreas, etc., (53, 54).

5. Nanotecnología en el ámbito biomédico

La nanoescala como es sabido hace referencia a objetos en donde sus dimensiones se sitúan en el orden de 10^{-9} m, mientras que la nanotecnología, sin ser una definición, es el entendimiento y control de la materia a nanoescala considerando un tamaño de 1- 100 nm, para la creación y uso de estructuras, aparatos y sistemas con nuevas propiedades y funciones debidas a su tamaño (<http://www.nano.gov/>).

Actualmente, los avances en nanotecnología han tenido un efecto positivo en el desarrollo de todas la áreas del conocimiento, su aplicación directa en la medicina ha derivado en una nueva sub-área denominada *nanomedicina*, la cual involucra diversas disciplinas como: la biología, la química, la física, la ingeniería química y la física, la ciencias de los materiales y la medicina entre otras (55). Los avances en la nanomedicina han permitido la introducción de novedosos sistemas de liberación de fármacos y agentes de contraste para diagnóstico.

En el área de farmacéutica los sistemas nanométricos que están en auge son principalmente aquellos concebidos para la entrega de fármacos mediante la vectorización espacial y/o temporal. Las ventajas de los también llamados acarreadores coloidales son entre otras el incremento en el índice terapéutico y la reducción de los efectos adversos. El número de sistemas acarreadores coloidales ha ido en crecimiento en años recientes tenemos como ejemplo: los liposomas (56-59), los niosomas (60), las micelas poliméricas (61), los dendrímeros (62), las microemulsiones (63), las nanopartículas cerámicas (64) y las nanopartículas poliméricas (NPP) (65-67).

En la última década, las NPP han asumido una posición de líder como sistemas acarreadores de fármacos, las NPP son definidas como partículas coloidales sólidas con un tamaño que varía entre 10 y 1000 nm. Éstas están constituidas de polímeros en donde el principio activo es disuelto, entrampado o encapsulado, y/o adsorbido o adherido en la superficie (68). Dependiendo del método de preparación y los materiales de partida dos tipos de NPP pueden ser producidas: nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas están formadas por una matriz polimérica densa, mientras que las nanocápsulas están compuestas de un núcleo rodeado de una membrana polimérica (69). Las NPP presentan un número importante de características que las hacen apropiadas para su uso en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, su capacidad

de controlar la liberación del fármaco; permitir la vectorización activa y pasiva; captura por parte de un tumor favorecido por la promoción en la permeación y retención (efecto EPR); biocompatibilidad y biodegradabilidad y protección del principio activo contra factores externos como luz, oxígeno y otros agentes (70-72).

Los métodos de preparación de las NPP pueden ser clasificados en dos grandes categorías: a) emulsificación de monómeros y polimerización, y b) dispersión de un polímero preformado. Los métodos de preparación de NPP a partir de polímeros preformados son una buena alternativa ya que permiten la carga eficiente de activos, tienen buen rendimiento, son escalables a nivel industrial y no dan origen a productos tóxicos derivados de una polimerización incompleta en comparación con aquellos que implican la polimerización *in situ*. Las técnicas derivadas basadas en la dispersión de un polímero preformado y que han sido extensamente utilizadas para la preparación de NPP son:

- a) emulsificación–evaporación (73).
- b) desplazamiento de disolvente o nanoprecipitación (74).
- c) *salting-out* (75).
- d) emulsificación–difusión (76-78).
- e) doble emulsión–evaporación (79).

Estas técnicas son similares en el sentido que involucran una solución orgánica que contiene los componentes de las NPP 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 NPP (80).

5.1. Estado actual en el desarrollo de ACUS a nanoescala

A partir de la década pasada se han incrementado considerablemente los trabajos relacionados con el desarrollo de ACUS de tamaño nanométrico, como se mencionó anteriormente, el reducir el tamaño de los ACUS actuales representa una alternativa eficaz para mejorar la detección de tumores debido a la posibilidad de que los ACUS puedan atravesar con ayuda del efecto EPR el endotelio de los vasos sanguíneos y retenerse en el tejido tumoral (81).

Entre los sistemas que se han desarrollado destacan principalmente NPP, nanoemulsiones, micelas poliméricas y liposomas nanométricos. De ellos las NPP y en particular las nanocápsulas presentan un mayor número de reportes debido a su versatilidad, ya que entre sus ventajas destacan; la capacidad de encapsular cantidades relevantes de materiales, el fácil control de sus características acústicas derivadas del control de las propiedades mecánicas de su pared, además de la posibilidad de modificar su superficie lo que es de gran ayuda en la vectorización activa y para la evasión de la opsonización.

Hasta la fecha son pocos los trabajos reportados del desarrollo de ACUS de escala nanométrica en comparación con otras áreas imaginológicas como RMN. Entre los sistemas reportados tenemos: nanoesferas, nanoemulsiones y nanocápsulas con núcleo líquido y nanocápsulas con núcleo gaseoso o nanoburbujas.

En 2006 y 2007, Liu *et al.* (82, 83) reportó la ecogenicidad *in vitro* de nanopartículas sólidas constituidas de diversos materiales como sílice, poliestireno y poli(ácido láctico) (PLA). El estudio incluyó la vectorización de las nanoesferas de PLA hacia células tumorales (SkBr3) y la evaluación del aumento en el contraste. Los resultados mostraron un aumento en el contraste del 22%, un dato importante es que se emplearon transductores de alta frecuencia (30-35 MHz). Nuestro grupo de investigación reportó en 2007 (84) un estudio en el que se evaluó la ecogenicidad *in vitro* de nanoesferas de PLGA y nanoesferas de PLGA preparadas con naftaleno empleado para inducir la formación de poros en la matriz polimérica, ambas nanopartículas mostraron un ligero aumento en el contraste, de 19% y 34%, respectivamente, evaluado a una frecuencia de 3.5 MHz con un equipo de ultrasonido de uso clínico.

El empleo de componentes líquidos como núcleos de los ACUS ha alargado el tiempo de vida media, el empleo en particular de PFCs se debe principalmente a su baja solubilidad y elevada densidad, entre los más empleados están el perfluoropentano, perfluorohexano, perfluorodecalina y el bromuro perfluorooctilo (85). De los mencionados anteriormente el perfluoropentano ha sido uno de los más incluidos en el desarrollo de ACUS debido a que presenta un punto de ebullición cercano a los 38 °C, este fenómeno se ha aplicado en el desarrollo en forma de nanoemulsión, la cual al ser inyectada en el cuerpo, sufre un cambio de fase generando nanoburbujas las cuales coalescen rápidamente formando microburbujas con potencial ecogénico (86). Rapoport *et al.* en 2007 publicó la preparación de micelas poliméricas

compuestas de copolímeros de bloque constituidos de poli(etilenglicol) PEG-PLA y poli(ϵ -caprolactona) (PEG-PCL), los cuales permitían la encapsulación de perfluoropentano (87). Sin embargo, la coalescencia descontrolada puede originar un crecimiento de las burbujas con la posibilidad de generar embolias, además es necesario el empleo de transductores de alta frecuencia superior a los 15 MHz debido a la baja compresibilidad de los líquidos empleados.

Sin duda, la mejor alternativa es la inclusión de gas dentro de los ACUS para incrementar el poder ecogenerador de los agentes, como resultado de la alta compresibilidad y gran diferencia de densidades entre los gases y los fluidos biológicos. Hasta la fecha son muy pocos los trabajos que reportan la preparación de ACUS con gas en su interior y muchos de ellos fueron publicados durante el desarrollo de este trabajo doctoral. En 2004, Oeffinger and Wheatley (54) reportaron el primer sistema a nanoescala de un ACUS que incluía gas en su interior, las también llamadas nanoburbujas estaban elaboradas con perfluoropropano estabilizado por una película de surfactantes. A pesar de que presentaron una buena ecogenicidad tanto, *in vitro* como *in vivo* (88), el tiempo de vida media era demasiado corto, además de que el método de preparación no era específico, obteniéndose un bajo rendimiento. De manera similar, Cavalli en 2009 (89, 90), describió la preparación nanoburbujas que contenían perfluoropentano, con la novedad de incorporar dentro de la pared de fosfolípidos polímeros como quitosán y dextrano para incrementar la resistencia mecánica de la pared. En 2010, Wang *et al.* (52) reportó la preparación de liposomas que contenían en su interior hexafluoruro de azufre (SF_6), las nanoburbujas de un tamaño de 333 nm presentaron un buen poder ecogénico tanto *in vivo* como *in vitro*, evaluados mediante un US en modo B y microscopia de US de alta frecuencia respectivamente.

En 2005, se reportó el primer ACUS de tamaño nanométrico que poseía una pared totalmente polimérica y que incluía un gas en su interior, Bloch *et al.* (6) evaluó nanocápsulas de 740 nm constituidas de una pared doble de un polímero biodegradable y albúmina sérica humana, la cual permitía la encapsulación de nitrógeno. Finalmente, en 2010 Wheatley and Lewandowski (91, 92) reportaron y patentaron la preparación de un ACUS de tamaño nanométrico constituido por una pared polimérica de PLGA y en cuyo interior se alojaba aire, las nanocápsulas fueron preparadas por el método de *salting-out*. La Tabla 4 resume las características de los diferentes ACUS que han sido preparados a escala nanométrica.

Tabla 4. Características de los ACUS preparados a escala nanométrica

Tipo de nanoagente	Pared	Núcleo	Tamaño de partícula (nm)	Referencia
Nanopartículas sólidas	Sílice	n.a.	100	(82)
	Poliestireno		300 - 500	
	PLA	n.a.	250	(83)
	PLGA	n.a.	150	(84)
Nanoemulsiones	n.a.	Perfluorodichlorooctano	250	(93)
	n.a.	Perfluoropentano	201 - 434	(94)
	n.a.	Bromuro de Perfluorooctilo	232 465	(95)
	n.a.	Perfluoropentano	200	(86)
Nanocápsulas líquidas	PLGA	Bromuro de Perfluorooctilo Perfluorodecalina Perfluorohexano	72 - 209	(85, 96)
	PEG-PLA	Perfluoropentano	500	(87, 97)
	PEG-PCL			
Nanoburbujas	Tween 80/Span 60	Perfluoropropano	450 - 750	(54)
	Dextran/ PVP/ Quitosán	Perfluoropentano	500	(90)
	Tween 80/Fosfolípidos/ Colesterol	Hexafloruro de azufre	300 - 400	(52)
Nanocápsulas gaseosas	Polímero biodegradable/ Albúmina sérica humana	Nitrógeno	740	(6)
	PLGA	Aire	640	(92)

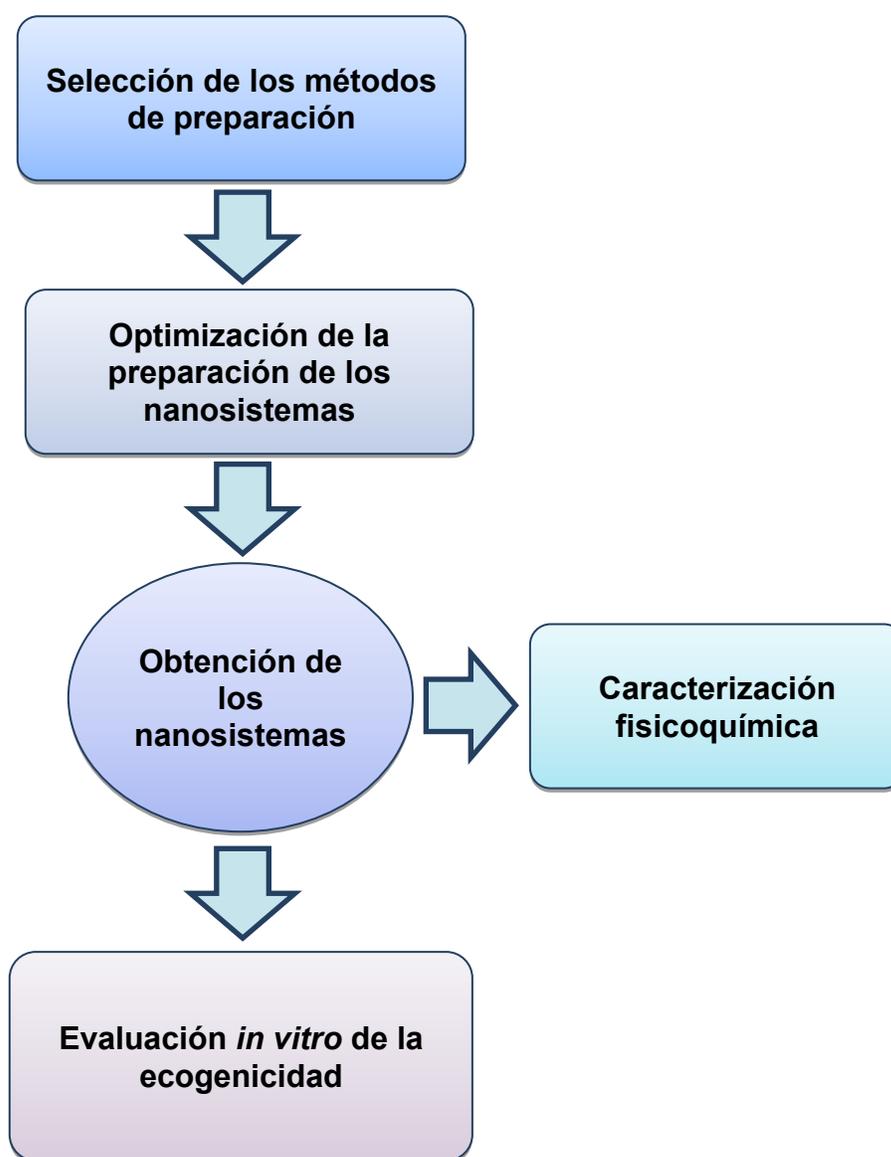
n.a. (no aplica)

El estado actual en el progreso de los ACUS de tamaño nanométrico revela un creciente interés en el desarrollo de agentes con una mayor estabilidad y persistencia, este reto representa la elección de incorporar polímeros como constituyentes de la pared, lo que le brinda una mayor resistencia en comparación con la pared a base de lípidos o surfactantes (98, 99); en el caso del tipo de gas la tendencia indica que los PFCs representan una buena opción debido a su baja solubilidad y difusividad; no obstante, la limitación más importante radica en el método de preparación del ACUS el cual no siempre permite la incorporación directa del gas. Sin embargo, el desarrollo de los ACUS, no solo está basado en mejorar las propiedades acústicas, sino que también busca incorporar los avances que se han logrado en los sistemas coloidales acarreadores de fármacos, estos avances incluyen la funcionalización de las superficies de los nanoagentes para aumentar su tiempo de residencia en el organismo y para permitir la vectorización activa hacia un tejido de interés, mediante la incorporación de sitios de interacción receptor-ligando. La nueva tendencia es generar sistemas capaces de ser empleados como agentes de diagnóstico y también como agentes terapéuticos, unidos en un concepto llamado *teragnosis*, en ese sentido los ACUS del futuro deberán incluir un fármaco (incluidos genes y proteínas). El agente teragnóstico debido a sus propiedades de superficie modificadas podrá ser vectorizado pasiva o activamente hacia su sitio de acción. Las técnicas diagnósticas permitirán dar un seguimiento adecuado y en tiempo real de su biodistribución para que una vez en su sitio blanco pueda liberar su contenido terapéutico mediante algún factor externo, por ejemplo, en US la aplicación de potencias acústicas más altas permitirían la ruptura del agente.

IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. Diagrama de flujo experimental

Figura 7. Diagrama de flujo experimental esquematizado



2. Métodos de preparación de los nanosistemas

2.1. Método de obtención de nanocápsulas oleosas y nanoesferas

Las nanocápsulas oleosas fueron preparadas mediante una modificación del método de emulsificación-difusión, el cual involucra el desplazamiento directo del disolvente mediante presión reducida, conforme a lo reportado por Quintanar-Guerrero *et al.*(100). Para su preparación el disolvente orgánico parcialmente soluble (acetato de etilo; AE, Fermont, Monterrey, México) y agua destilada fueron saturados mutuamente durante 1 minuto antes de su uso para asegurar el equilibrio termodinámico de las fases. Posteriormente, 100 mg del polímero (Poli(D,L-láctico-co-glicólico, 50:50); PLGA, DLG 4A, Lakeshore, Alemania) y 250 µL del aceite (Propilenglicol dicaprilato/dicaprato; Captex[®] 200, Watson Phillips, México) fueron disueltos en 10 mL del disolvente orgánico previamente saturado, la solución orgánica anterior se emulsificó en 20 mL de una fase acuosa formada por la dispersión en agua saturada de un estabilizante (Poli(alcohol vinílico); PVAL, Mowiol[®] 4-88, PM: 26000 g/mol; Glomarza, México) al 5% p/v. La emulsificación se realizó empleando un agitador de alto corte (Ultraturrax[®] T25, IKA, EUA) a 11 000 rpm durante 10 minutos. La emulsión aceite-en-agua (o/w) que se formó fue colocada en el rotaevaporador para inducir el desplazamiento directo del disolvente bajo presión reducida. La dispersión final, que contiene las nanocápsulas oleosas se lavó tres veces para retirar el excedente de estabilizante mediante ultracentrifugación y resuspensión en agua destilada. Finalmente la suspensión obtenida se congeló a -40 °C y liofilizó durante 24 h a una presión <100 µbar en un liofilizador marca FreeZone[®] 6 (Labconco, EUA). Para la obtención de las nanoesferas se procedió de la misma manera, pero sin incluir aceite en la preparación.

2.1. Método de obtención de la nanoemulsión y nanocápsulas de perfluoropentano (PFP)

La encapsulación de perfluoropentano (PFP) se intentó mediante la técnica de polimerización interfacial de alquilcianoacrilatos (101). La metodología consistió en formar en un principio la nanoemulsión de PFP, para ello 250 µL de PFP fueron disueltos en acetonitrilo (ACN; Fermont, Monterrey, México) e inyectados en 5 mL una fase acuosa consistente de Poloxámero F-127

0.5% (Lutrol[®] 127, BASF, EUA) y Zonyl[®] FSO 0.1% (Sigma, EUA), ajustada a pH=1. Hasta este punto se obtuvo la nanoemulsión de PFP. Para la preparación de las nanocápsulas, a la nanoemulsión formada se le adicionaron 100 µL de etilacianoacrilato (ECN; Sigma, EUA)) previamente disuelto en 1 mL de ACN. El sistema fue mantenido con agitación mecánica (Virtiz, Mod. 6-105-AF, EUA) (500 rpm) por 3 h a 4 °C. Posteriormente, la dispersión fue recuperada mediante ultracentrifugación.

2.2. Método de obtención de las nanocápsulas llenas de aire

En esta sección se describen dos metodologías para la preparación de las nanocápsulas llenas de aire, ambas están basadas en la técnica de doble emulsión-evaporación (102) y el método para elaborar macropartículas porosas reportado por Kyoung (103). La primera metodología propuesta emplea un disolvente orgánico totalmente inmiscible en agua y la segunda emplea un disolvente parcialmente miscible en agua.

2.2.1. Método empleando un disolvente inmiscible en agua

El método consistió en la emulsificación de una fase acuosa constituida por 1 mL de una solución de bicarbonato de amonio (BCA; Fermont, Monterrey, México) a una concentración de 1% p/v, en una fase oleosa constituida por 4 mL de diclorometano (DCM; Fermont, Monterrey, México), en el cual se disolvieron 50 mg de PLGA y 0.1 mg de un emulsificante (sesquioleato de sorbitán; SOS, Sigma, EUA). La emulsión agua-en-aceite (w_1/o) fue formada mediante agitación mecánica a una velocidad de 11 000 rpm mantenida durante un tiempo de 5 min. Posteriormente, a la emulsión w_1/o formada en el paso anterior se le adicionó 25 mL de PVAL al 2% y se agitó mecánicamente a una velocidad de entre 500-11 000 rpm para formar la doble emulsión del tipo ($w_1/o/w_2$); a continuación, la doble emulsión se mantuvo en agitación durante 3 h para la remoción del disolvente orgánico. La suspensión de nanopartículas fue lavada tres veces a través de la recolección del sobrenadante formado durante la ultracentrifugación a 38 100 x *g* durante 30 minutos. La dispersión final fue congelada a -40°C después de la adición de los agentes crioprotectores y fue posteriormente liofilizada durante 24 h a una presión <100 µbar.

2.2.1.1. Estudio del impacto de la velocidad en el tamaño y morfología de la partícula.

Durante el desarrollo del método de elaboración se evaluó el impacto de la velocidad y tiempo de agitación en el tamaño y distribución de partícula, así como en la morfología de las mismas. Las variables se evaluaron en la formación en la emulsión doble y fase de evaporación del disolvente, manteniendo constante las condiciones de formación de la primera emulsión. La Tabla 5 muestra los experimentos en este estudio, todos fueron realizados por triplicado.

Tabla 5. Experimentos realizados durante la preparación de nanocápsulas “llenas” de aire a partir del método de doble emulsión, empleando un disolvente inmisible en agua.

Preparación	Condiciones primera emulsión		Condiciones segunda emulsión	
	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)
NCDCM1	11 000 [†]	5	500 [‡]	180
NCDCM2			1000 [‡]	
NCDCM3			3000 [‡]	
NCDCM4			5000 [‡]	
NCDCM5			11000 [‡]	

[†] Agitación con Ultraturrax® T25, IKA, USA.

[‡] Agitación con Virtiz (Mod. 6-105-AF)

2.2.2. Método empleando un disolvente parcialmente miscible en agua

La metodología fue muy similar a la descrita en la preparación a partir de un disolvente inmisible. Para ello, se emulsificó 1 mL de una solución de Bicarbonato de amonio (BCA; Fermont, Monterrey, México) en una concentración del 1, 3 ó 5% p/v, en una fase oleosa constituida por 4 mL de AE saturado, en el cual se disolvieron 50 mg de PLGA y 0.1 mg del emulsificante sesquioleato de sorbitán. La emulsión agua-en-aceite (w_1/o) fue formada mediante agitación mecánica a una velocidad de 11 000 rpm, durante un tiempo de 5 min. Posteriormente, a la emulsión w_1/o formada en el paso anterior se le adicionó 25 mL de PVAL al 2% y nuevamente se agitó mecánicamente a una velocidad de 11 000 rpm durante 3 min ó 5

min para formar la doble emulsión del tipo ($w_1/o/ w_2$). A continuación, la doble emulsión fue colocada en el rotaevaporador para la extracción del disolvente orgánico. La suspensión de nanopartículas fue lavada tres veces mediante la recolección del sobrenadante formado durante la ultracentrifugación a $38\ 100 \times g$ durante 30 minutos. La dispersión final fue congelada a -40°C después de la adición de los agentes crioprotectores y posteriormente fue liofilizada durante 24 h a una presión $<100 \mu\text{bar}$

2.2.2.1. Estudio del impacto de la velocidad y tiempo de agitación en el tamaño y distribución de las partículas.

Se evaluó el impacto de la velocidad y el tiempo de agitación sobre el tamaño y la distribución de partícula durante la formación de la doble emulsión. Las variables se evaluaron en la formación en la emulsión doble, manteniendo constantes las condiciones de formación de la primera emulsión. La Tabla 6 muestra los experimentos en este estudio, todos fueron realizados por triplicado.

Tabla 6. Experimentos realizados durante la preparación de nanocápsulas llenas de aire a partir del método de doble emulsión, empleando un disolvente parcialmente miscible en agua.

Preparación	Condiciones primera emulsión		Condiciones segunda emulsión	
	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)
NCAcEt1	11000 [†]	5	5000 [‡]	3
NCAcEt2			5000 [‡]	5
NCAcEt3			11000 [‡]	3
NCAcEt4			11000 [‡]	5
NCAcEt5			11000 [†]	3
NCAcEt6			11000 [†]	5

[†] Agitación con Ultraturrax® T25, IKA, EUA.

[‡] Agitación con Virtiz (Mod. 6-105-AF)

3. Caracterización de las nanopartículas

3.1. Análisis del tamaño y distribución de partícula

El tamaño de partícula promedio (TPP) y el índice de polidispersión (IP) de las nanoesferas, nanocápsulas oleosas y nanocápsulas llenas de aire se determinó empleando un contador submicrónico (Coulter N4 Plus, EUA) mediante la técnica de dispersión dinámica de luz láser. La longitud de onda fue de 678 nm, empleando como fuente un láser de He/Ne de 10 mW. Las mediciones se efectuaron a un ángulo de 90°, durante 180 s, a una temperatura de 25°C. Todas las medidas se hicieron por triplicado para calcular el TPP a partir de la distribución por intensidad y el índice de polidispersión promedio (IP) a partir del análisis unimodal, ambos valores dados por el equipo.

Mientras que, el TPP y IP de la nanoemulsión y nanocápsulas de PFP fue determinado empleando un Zetasizer Nano ZS (Malvern, RU) mediante la técnica de dispersión dinámica de luz láser. La longitud de onda fue de 633 nm empleando como fuente un láser de He/Ne de 4mW. Las mediciones se efectuaron a un ángulo de 173°, durante 180 s a una temperatura de 25°C. Todas las medidas se hicieron por triplicado.

3.2. Determinación de la densidad de las nanopartículas

Se determinó la densidad isopícnica de las nanopartículas a partir de su separación en un gradiente de sílice coloidal (Percoll®, Sigma, EUA) con la finalidad de corroborar la encapsulación de los materiales. Las suspensiones de nanopartículas fueron concentradas, posteriormente un volumen de 0.5 mL del concentrado fue adicionado a 7 mL de Percoll® al 45% v/v diluido con NaCl 0.15 M. El gradiente fue generado *in situ* mediante ultracentrifugación a 6182 x *g* durante 3 h a 4°C en un rotor angular de 25° (90 Ti, Beckman, EUA). Para determinar la densidad se emplearon marcadores comerciales (Density Marker Beads®, Pharmacia LKB, Suecia), los cuales fueron tratados bajo las mismas condiciones que las muestras. Una vez generados los gradientes, se midió la posición de las bandas formadas y se comparó con la posición de los marcadores de densidad.

3.3. Potencial zeta

El potencial zeta se determinó mediante micro-electroforesis láser Doppler y análisis de fase de dispersión de luz en un equipo Malvern Zetasizer Nano HS (Malvern, RU), el cual emplea un láser de He/Ne de longitud de onda de 633 nm y 4 mW. Se realizaron un promedio de 50 lecturas empleando como solvente agua a una temperatura de 25 °C. La media y la desviación se calcularon a partir del promedio obtenido de las 50 lecturas realizado a 3 muestras de una sola preparación de al menos 3 lotes diferentes.

3.4. Microscopía óptica

Algunas de las preparaciones fueron observadas al microscopio óptico invertido Iroscope (Mod. SI-PHF) para determinar la distribución y tamaño de partícula así como su morfología. Las dispersiones fueron colocadas sin ningún tratamiento previo sobre un portaobjetos y cubiertas, posteriormente, fueron observadas a 45x y 100x. Para el análisis de tamaño de partícula, las fotografías obtenidas de la observación de diferentes campos fueron analizadas empleando el programa ImageJ v1.46, en donde se determinó el diámetro promedio aritmético y la desviación estándar aritmética midiendo las dimensiones de al menos 100 partículas.

3.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se observó la morfología de la superficie de las nanopartículas mediante MEB. La preparación de las muestras consistió en esparcir una gota de la suspensión de nanopartículas sobre la superficie de un cubreobjetos dejándola secar a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con una película de oro (~20 nm) empleando un dispersor iónico (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, JEOL, Japón) y observadas a 12.5 kV en un microscopio JSM- 25 S II (JEOL, Japón).

3.6. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las nanopartículas fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras fueron preparadas colocando una gota de la suspensión de nanopartículas sobre una rejilla de cobre malla 200, previamente cubierta con una película de resina de poli(vinil formal) (Formvar 15/95, Electron Microscopy Science, EUA). La gota fue dejada en contacto con la rejilla durante 2 min y posteriormente, el exceso fue removido usando papel filtro, finalmente las rejillas fueron secadas al aire a temperatura ambiente y guardadas en un lugar seco hasta su observación en un microscopio JEM-CX100 (JEOL, Japón).

4. Medición de la ecogenicidad *in vitro*

Para la determinación de la ecogenicidad de las nanopartículas se diseñó y construyó un sistema de US unidimensional o en modo-A, similar al descrito por El-Sherif *et al.* (7). El sistema consta de 3 elementos; la fuente de emisión-recepción de ultrasonidos, el portamuestras y el analizador de señal (*Figura 21*). La fuente de emisión-recepción de ultrasonidos consistió en un emisor-receptor y un transductor. Se emplearon transductores de un elemento de 1.27 cm de diámetro, con foco esférico de 5.08 cm (Panametrics, Olympus NDT, EUA), con frecuencias centrales de 5, 7.5 y 10 MHz; la tabla del *Anexo 1* resume las características de los transductores. Un transductor a la vez fue conectado al emisor-receptor (Panametrics 5072, Olympus NDT, EUA) con el cual se generaron pulsos a una frecuencia de repetición de 100 Hz, los pulsos fueron nuevamente recibidos por el transductor y amplificados a 40 dB, en la Tabla 2.2 del *Anexo 2* se detallan los parámetros de ajuste del instrumento. El emisor-receptor se acopló a un osciloscopio digital (Mod. DS1102CD, Rigol, China) para el procesamiento de las señales, la Tabla 2.4 del *Anexo 2* resume los ajustes del osciloscopio.

El muestreo se llevó a cabo en un contenedor portamuestras construido en acrílico de dimensiones internas de 3.10 x 2.5 x 25 cm (ancho x largo x alto), el cual poseía una ventana acústica de 2.5 x 2.5 cm y 0.1 mm de espesor, tanto el portamuestras como el transductor estaban sumergidos en un tanque de acrílico de dimensiones 20 x 30 x 25 (ancho x largo x alto), que contenía 11.5 l de agua desionizada y degasificada a 37°C. El transductor fue focalizado en el centro del portamuestras.

4.1. Elaboración de las curvas dosis-respuesta

Con el fin de determinar la efectividad de las preparaciones se realizaron curvas dosis-respuesta para cada una de los sistemas nanoparticulados: nanoesferas, nanocápsulas oleosas y nanocápsulas llenas de aire. Para ello, el portamuestras se llenó con 40 mL de agua desionizada y previamente desgasificada mantenida a una temperatura de 37 °C. Los liofilizados obtenidos durante la preparación de los sistemas fueron reconstituidos con agua desionizada a una concentración de 3 mg de nanopartículas/mL; posteriormente, 0.1 mL de esta dispersión fue inyectada dentro del portamuestras y se agitó gentilmente mediante una barra magnética. Pasados 15 s de la adición se procedió a registrar el voltaje cuadrático medio (V_{rms}) de los pulsos registrados en el osciloscopio. Es importante señalar que el análisis de los datos para las muestras de nanoesferas y nanocápsulas oleosas se realizaron mediante la captura y el posterior análisis de 10 “formas de onda” empleando el software que acompañaba el osciloscopio (Ultrascope ver. 00.01.04, Rigol, China); mientras que, la captura y el procesamiento de los datos correspondientes a las nanocápsulas llenas de aire se realizaron mediante un programa el cual tuvo que ser desarrollado en esta investigación. El programa fue escrito en LabView® para ambiente Windows®, el programa se configuró para que permitiera el registro y captura del V_{rms} cada 100 ms durante un tiempo de 3 s, es decir, permitió el registro de 30 lecturas, en el Anexo 3 se muestra la salida de pantalla del programa escrito.

Las lecturas fueron registradas después de la adición consecutiva de 0.1 mL hasta que se completó 1 mL de la suspensión de nanopartículas, permitiendo evaluar un rango de concentración final en el portamuestras de 0.015-0.075 mg de nanopartículas/mL. Las curvas dosis-respuesta fueron construidas tomando como respuesta el aumento de señal (AS), calculado a partir de la comparación entre el V_{rms} , obtenido con las nanopartículas y sin ellas, para ello se empleó la ecuación 11. El AS de cada sistema nanoparticulado se basó en el promedio de las lecturas obtenidas de tres mediciones del mismo lote de al menos tres lotes diferentes.

$$AS(dB) = 20 \log \left(\frac{V_{rms} \text{ con nanopartículas}}{V_{rms} \text{ sin nanopartículas}} \right) \quad \dots\dots \text{Ecuación 11}$$

4.2. Seguimiento del aumento de la señal con respecto al tiempo

La capacidad de las nanocápsulas llenas de aire para mantener el AS durante el tiempo fue evaluada como un indicador de la persistencia y estabilidad del agente. Para ello, se inyectó un volumen de 0.6 mL de una suspensión de nanopartículas de concentración de 3 mg/mL dentro del portamuestras, el cual contenía 40 mL de agua desionizada, desgasificada y mantenida a 37 °C, la concentración final del agente fue de 0.045 mg/mL. Posteriormente, se determinó el AS a los 15 s de adicionar el agente (tiempo cero) y se continuó con el estudio durante los 30 minutos posteriores, realizando mediciones cada 5 min.

4.3. Determinación de la frecuencia de resonancia

La determinación de la frecuencia de resonancia de las nanocápsulas llenas de aire fue realizada de acuerdo a una metodología similar a la reportada por Jong (36) y Wu (104). Para ello, 0.6 µl de una suspensión de nanopartículas de concentración 3 mg/mL fueron inyectados en el portamuestras que contenía 40 mL de agua desionizada y desgasificada mantenida a 37°C. Detrás del portamuestras se colocó un reflector de acero inoxidable de 5.08 cm de espesor. El transductor fue focalizado sobre la superficie del reflector, se emplearon los tres transductores uno a la vez, conectados en el modo de pulso-eco, la frecuencia de repetición del pulso fue de 100 Hz. La señal recibida (pulso) en una ventana de 1 µs fue capturada por el osciloscopio y se le aplicó la función FFT (transformada rápida de Fourier), para cambiar el dominio a frecuencias. La señal transformada fue dividida en 50 segmentos dentro del rango de ancho de banda del transductor de -6 dB y se calculó el coeficiente de atenuación para cada una de las 50 frecuencias, de acuerdo a la ecuación 12.

$$\alpha_p = \alpha_m + 10 \log \left[\frac{A_m}{A_p} \right] / d \quad \dots\dots \text{Ecuación 12}$$

Donde, α_p es el coeficiente de atenuación de la muestra; α_m es el coeficiente de atenuación del medio en este caso del agua cuyo valor es de 0.0022 dB/cm a una frecuencia de 1 MHz; A_p y A_m son las amplitudes de la señal transformada de la muestra y del medio, respectivamente; y d es el espesor de la muestra. El experimento fue repetido con los tres transductores cubriendo un rango de frecuencias de 3.11-12.66 MHz y se graficó el coeficiente de atenuación de la muestra contra la frecuencia.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Preparación de nanoesferas y nanocápsulas oleosas

En la actualidad existen 5 métodos principales y ampliamente utilizados para la preparación de nanoesferas y nanocápsulas con núcleo oleoso a partir de polímeros preformados que fueron mencionados anteriormente. Diversas publicaciones se han enfocado al estudio del mecanismo de formación de las nanopartículas y de las variables del proceso que impactan en el tamaño y distribución de partícula, la eficiencia de encapsulamiento, etc. (69, 105-109). Nuestro grupo de investigación ha empleado principalmente el método de desplazamiento de solvente y el de emulsificación – difusión para la preparación de nanoesferas y nanocápsulas con aplicación farmacéutica y cosmética (84, 100, 110-115). Por esta razón la metodología para la preparación de los nanoesferas y nanocápsulas de Captex[®] 200 con el polímero PLGA que fueron empleadas para su evaluación como ACUS no presentó ninguna modificación a la convencional. El método de emulsificación – difusión con el desplazamiento directo del disolvente permitió la obtención de nanoesferas de distribución estrecha y monodispersa con un rango de tamaño entre 70-400 nm, el TPP fue de 173 ± 7 nm, el IP de 0.09 ± 0.01 y el $\zeta = -32.7$ mV. Por otra parte, las nanocápsulas oleosas presentaron una distribución estrecha y monodispersa con un rango de tamaño entre 100-1000 nm, el TPP fue de 350 ± 9 nm, el IP de 0.18 ± 0.05 y el $\zeta = -8.4$ mV. Las Figuras 8 y 9 muestran la distribución de tamaño de partícula medida mediante dispersión dinámica de luz láser de las nanoesferas y nanocápsulas oleosas, respectivamente. El potencial zeta (ζ) es un parámetro importante para la caracterización de la carga superficial de las nanopartículas, el cual tiene influencia en la estabilidad física de la suspensión y en la mucoadhesión. En teoría, entre mayor sea el potencial en valor absoluto, no importando si es positivo o negativo, mayor será la estabilidad de la suspensión. La elevada repulsión electrostática entre las partículas con la misma carga eléctrica prevendrá su agregación (116). En el caso particular de las nanoesferas y nanocápsulas oleosas preparadas, el valor de ζ indica que poseerían una buena estabilidad física, lo cual fue comprobado ya que las suspensiones sin liofilizar y los reconstituidos fueron estables durante al menos 3 meses, es decir, no presentaron señales de agregación ni sedimentación cuando fueron mantenidos en refrigeración a 4°C.

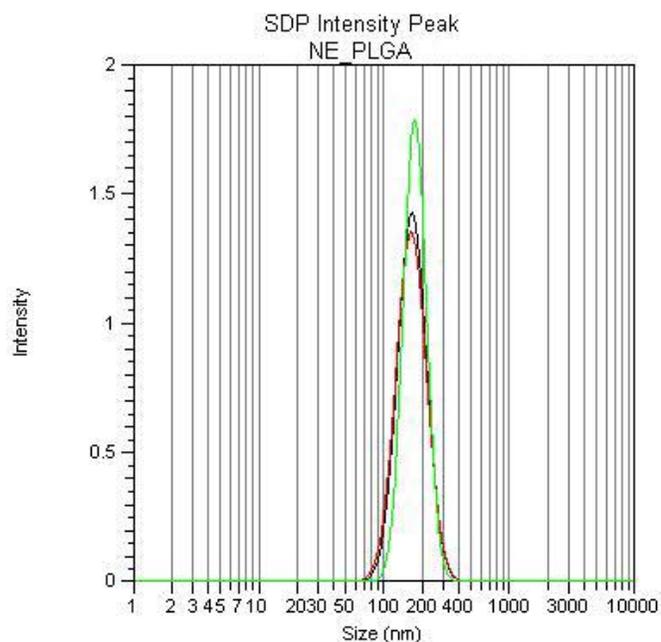


Figura 8. Distribución de tamaño de partícula de las nanoesferas de PLGA obtenidas mediante el método de emulsificación-difusión y medido mediante DLS.

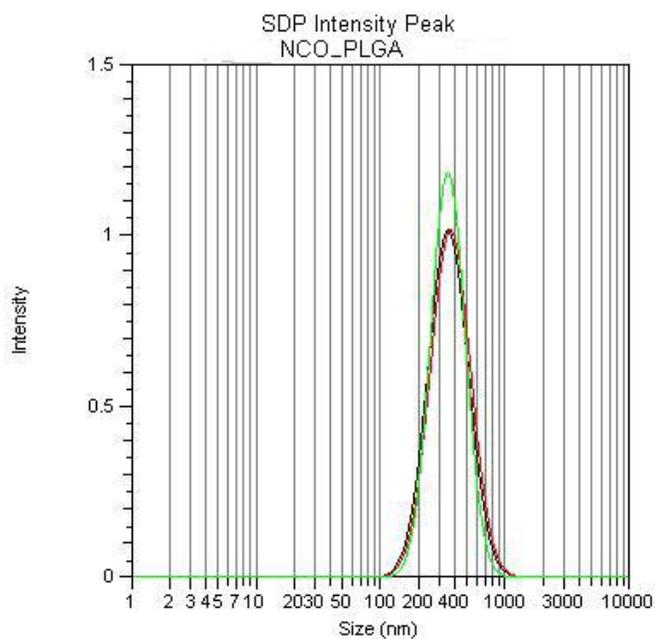


Figura 9. Distribución de tamaño de partícula de las nanocápsulas con núcleo oleoso de Captex® 200 y membrana polimérica de PLGA obtenidas mediante el método de emulsificación-difusión y medido mediante DLS.

2. Preparación de nanoemulsión y nanocápsulas de PFP

En esta investigación se propuso la formación de la nanoemulsión de PFP con la finalidad de que las nanogotas sirvieran como plantilla para la posterior formación de las nanocápsulas, además la nanoemulsión también fue evaluada para determinar su efecto ecogénico como resultado del cambio de fase de líquido a gas que sufre entre los 35-40 °C. El método propuesto permitió la preparación de la nanoemulsión de una manera sencilla, la distribución de tamaño de partícula fue amplia con un rango de 300-1500 nm (*Fig. 10*), con un TPP = 730.6 ± 5 nm y un IP = 0.172. La nanoemulsión fue estable únicamente durante 5 horas, después de ese tiempo se observó sedimentación; posteriormente, la coalescencia de los glóbulos de la nanoemulsión para formar una emulsión y finalmente la separación de fases.

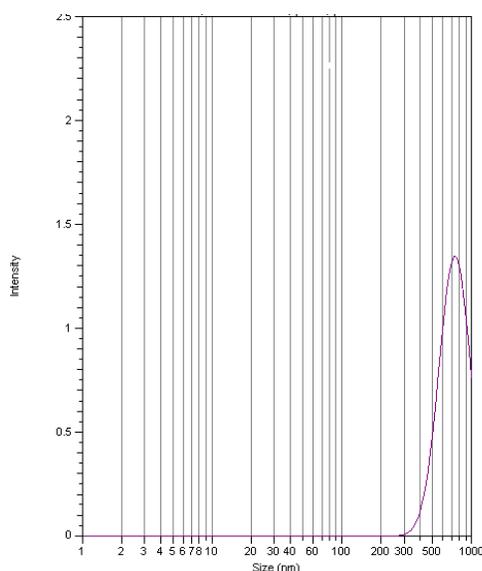


Figura 10. Distribución de tamaño de partícula de la emulsión de PFP obtenida mediante el método de desplazamiento de disolvente y medido mediante DLS.

La contribución de este trabajo en este sentido fue el reportar una metodología que no requería un agitador de alto corte en la preparación de la nanoemulsión de PFP. La preparación y empleo de nanoemulsiones de PFCs líquidos como ACUS no es algo novedoso, durante los últimos años se han reportado diferentes metodologías para la preparación y evaluación como ACUS de emulsiones y nanoemulsiones de perfluoropentano, perfluorohexano, perfluorooctano,

bromuro de perfluorocetilo, perfluorodecalina, entre otros (117, 118). En la mayoría de los métodos se requiere de un agitador de bajo corte para la formación de la emulsión mientras que para la nanoemulsión se requiere de alto corte además de la combinación de tensoactivos para lograr la estabilidad física del sistema disperso. La naturaleza química de los PFC hace que se requiera la adición de emulsificantes fluorados como el sulfonato de perfluorooctano o la serie de tensoactivos comercializadas bajo la marca de Zonyl® o Capstone® por DuPont™, debido a que no es posible la estabilización únicamente con tensoactivos convencionales (94). En el caso particular de nuestra metodología, el evitar el uso del agitador de alto corte, reduce la evaporación del PFP, la cual se da aún si se trabaja a bajas temperaturas, esto fue comprobado por este autor durante el trabajo de investigación de maestría (119). En la metodología propuesta, la energía necesaria para la formación de la nanoemulsión es cedida durante la difusión del disolvente orgánico hacia la fase acuosa; una ventaja adicional es que se prescinde del uso del tensoactivo fluorinado, el cual es altamente tóxico, sin embargo, la principal desventaja de la metodología sugerida es que no es posible la remoción del disolvente a presión reducida.

Una vez desarrollado el método para la formación de la nanoemulsión de PFP, se procedió a la preparación de las nanocápsulas de PFP mediante el método de polimerización interfacial, el método fue propuesto tomando como base la experiencia anterior durante el trabajo de Maestría en el cual no fue posible la encapsulación del PFP con polímeros preformados mediante las técnicas de emulsificación – difusión y desplazamiento de disolvente. La metodología basada en la polimerización interfacial requiere la formación previa de la nanoemulsión de PFP, la que debe permanecer estable al menos durante 3 horas. A esta emulsión se le adicionó un monómero con propiedades tensoactivas (ECN), el control de la velocidad de polimerización se realizó manteniendo la nanodispersión a pH ácido dado que el mecanismo de polimerización de los PACAs es aniónico.

Las condiciones anteriores nos permitieron obtener microcápsulas de PFP. La microscopia óptica mostró la morfología capsular de las partículas, en donde se observa la pared de las microcápsulas más oscura que el núcleo compuesto de PFP, una imagen similar a la reportada por Pisani *et al.* (85) para microcápsulas de PFOB. El análisis de tamaño de partícula realizado mediante el programa Image J reveló que las microcápsulas presentaron un tamaño promedio en número de $2.74 \pm 0.45 \mu\text{m}$.

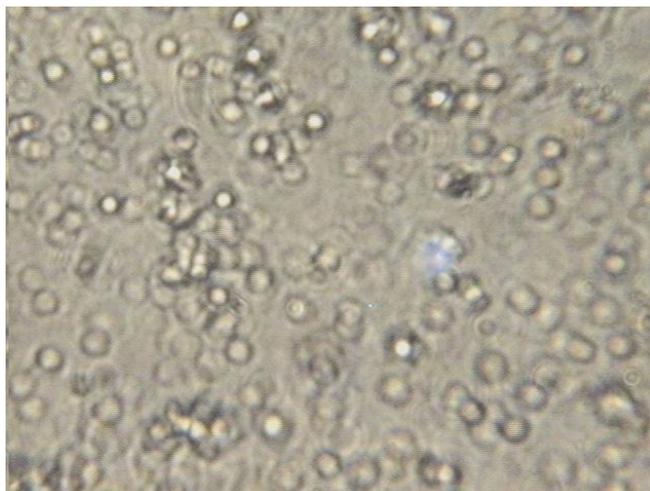


Figura 11. Imagen capturada mediante microscopia óptica en donde se muestran las microcápsulas de PFP elaboradas mediante el método de polimerización interfacial observadas a 100x.

Es importante señalar que hasta el momento no hay reportes sobre el éxito en la encapsulación de PFP en micro- o nanopartículas poliméricas, en uno de los intentos se empleó el método de emulsificación-evaporación, sin embargo, este método funcionó bien para para otros PFCs líquidos pero no para el PFP ya que durante la etapa de evaporación el PFP se volatilizó junto con el DCM empleado en la emulsificación (85).

Si bien la metodología propuesta se basó en una similar reportada para la microencapsulación de bromuro de perfluorooctilo (120, 121), las modificaciones propuestas que incluyen; la formación previa de la nanoemulsión, el empleo de un disolvente miscible con agua, mantener el sistema a 4°C y la recuperación de las partículas mediante centrifugación sin la evaporación previa del disolvente, permitió la preparación por primera vez de microcápsulas de PFP con membrana polimérica. También es importante indicar que el proyecto fue continuado y los resultados obtenidos hasta ahora indican que condiciones de pH=3, el empleo de PVAL al 10% como estabilizante y una agitación de 24 000 rpm durante 1 h permiten la preparación nanocápsulas de un tamaño de entre 700-900 nm, además de que se evita el uso de un surfactante fluorinado (122).

3. Preparación de nanocápsulas llenas de aire

3.1. Método empleando un disolvente parcialmente miscible en agua

Para la preparación de las nanocápsulas se plantearon originalmente tres metodologías, las cuales tenían como objetivo generar poros o huecos en la matriz polimérica de las nanopartículas, para formar sistemas con mayor poder ecogénico en comparación con las nanopartículas sólidas y con núcleo líquido. La primera consistió en la liofilización de nanoemulsiones de disolventes de bajo punto de ebullición y alta presión de vapor; en las que se incluyó un polímero como material de soporte, la idea fue que el solvente actuara como generador de poros. Se evaluaron las combinaciones hexafluoroacetona (HFA)/ tetracloruro de carbono (CCl_4), HFA/ciclohexano (CH) y dimetilsulfóxido (DMSO)/CH. La segunda consistió en el intento de la nanoencapsulación de agua mediante la técnica de polimerización interfacial y su posterior liofilización, como una alternativa para la formación de sistemas huecos; en ambas metodologías los resultados obtenidos no fueron satisfactorios para la obtención de los sistemas porosos. Finalmente, la tercera consistió en la formación de sistemas porosos o huecos a partir de emulsiones múltiples del tipo ($w_1/o/w_2$), en donde la fase acuosa (w_2) contiene un generador de gas que actúa como agente porogénico, se tomó como base lo descrito por Kyoung (103) quienes reportaron la obtención de micropartículas poliméricas porosas mediante una metodología similar.

Durante la primera etapa del desarrollo se propuso el uso del disolvente DCM para que formara parte de la fase oleosa de la emulsión, en donde la fase acuosa la constituyó una solución al 1% de bicarbonato de amonio (BCA), se formó una emulsión primaria (w_1/o) mediante agitación de alto corte, la emulsión obtenida fue vertida en la fase w_2 constituida de una solución al 2% de alcohol polivinílico (PVAL), la adición se hizo gota a gota manteniendo la agitación mecánica a 500 rpm por 3 minutos y posteriormente, se sometió a un baño de US durante 2 horas hasta la evaporación del DCM. La micrografías mostradas en la *Figura 12* muestran las nanopartículas obtenidas mediante las condiciones anteriormente mencionadas; como puede observarse, el método es capaz de generar partículas con un rango de tamaño que van de los 200- 1300 nm, sin embargo, no se evidenció la presencia de poros o huecos en su estructura, es posible que durante el sometimiento al baño de ultrasonido el cual tenía como objetivo remover el disolvente orgánico, la fase interna acuosa la cual contenía el generador de gas migrara a la fase externa

acuosa como resultado de la energía suministrada y no permitiera la formación de poros en la nanopartícula.

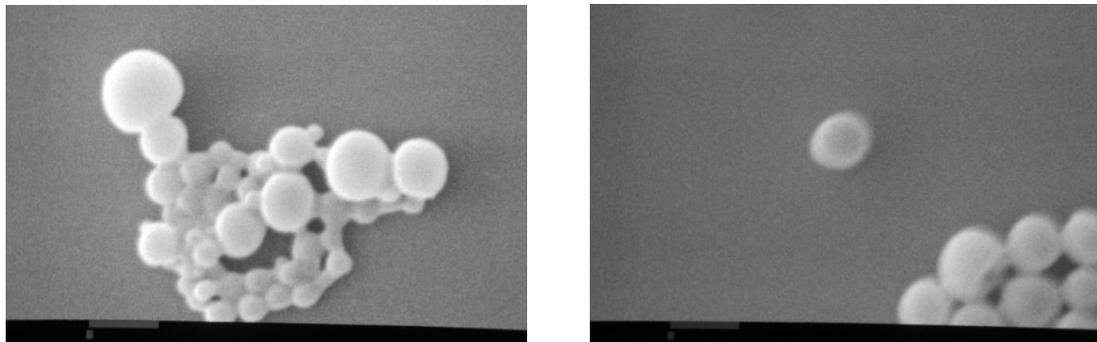


Figura 12. Micrografías obtenidas mediante MEB de las nanopartículas preparadas a partir de la metodología de doble emulsión empleando un disolvente inmiscible con agua. (Barra = 1 μm)

Se realizó el experimento sin someter el sistema al US únicamente se agitó de manera mecánica a 500 rpm durante 3 h y las microscopias ópticas (*Figura 13*) mostraron micropartículas altamente porosas de un tamaño aproximado de entre 10 – 25 μm , se realizó una prueba preliminar de ecogenicidad *in vitro* revelando que las preparaciones porosas presentaban una AS de entre 15-20 dB.

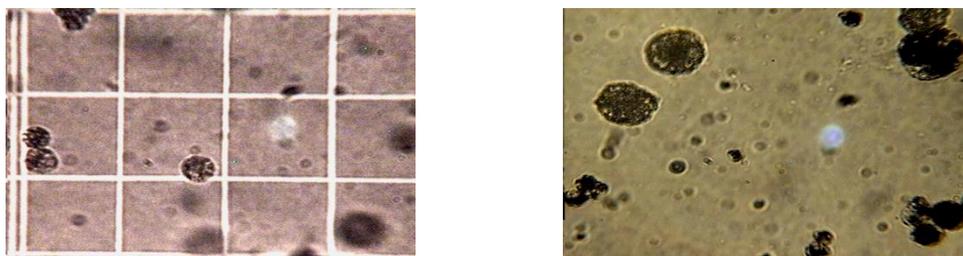


Figura 13. Imágenes capturadas mediante microscopia óptica de las macropartículas preparadas a partir de un disolvente inmiscible en agua, en donde la evaporación se logró mediante agitación a 500 rpm durante 3 horas. (Izquierda: 40x, derecha: 100x)

En consecuencia de que se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la ecogenicidad de las macropartículas porosas las actividades posteriores se enfocaron a determinar el efecto de la velocidad de agitación durante la formación de la segunda emulsión con el objetivo de controlar

el tamaño de las partículas porosas y reducirlo a la escala nanométrica conservando la porosidad.

3.1.1. Efecto de la velocidad en el tamaño y morfología de la partícula.

Es bien conocido que en los métodos para la preparación de micropartículas y nanopartículas basados en la formación de una emulsión, las condiciones de agitación juegan un papel importante en el tamaño resultante. Para conocer el efecto de la velocidad y el tiempo de agitación se decidió evaluar las velocidades de 500, 1000, 3000, 5000 y 11000 rpm durante un tiempo de 3 h en la formación de la segunda emulsión y la evaporación del disolvente manteniendo constante las condiciones de formación de la primera emulsión. El tamaño de partícula promedio para las preparaciones se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Tabla de resultados del tamaño de partícula promedio obtenido bajo las diferentes condiciones de agitación, preparadas mediante el método de doble emulsión empleando un disolvente inmiscible en agua.

Preparación	Tiempo de agitación (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Tamaño promedio ($\mu\text{m} \pm \text{d.e.}$)
NCDCM1	180	500	12.4 ± 5.3
NCDCM2		1000	10.4 ± 3.8
NCDCM3		3000	3.8 ± 2.0
NCDCM4		5000	4.7 ± 3.7
NCDCM5		11000	0.38 ± 0.08

De acuerdo con los resultados anteriores y como se mencionó previamente la velocidad de agitación durante la formación de la segunda emulsión y la etapa de evaporación juegan un papel importante en el tamaño de la partícula, encontrándose que a mayor velocidad de agitación el tamaño de partícula disminuye, tal como se demuestra de manera gráfica en la

Figura 14. Diversos estudios han encontrado que cuando se preparan micropartículas y nanopartículas mediante métodos que requieren la formación de una emulsión el tamaño final de las partículas es directamente proporcional al tamaño de glóbulo de la emulsión precursora, por lo tanto, la agitación se vuelve un parámetro importante en el tamaño final de las partículas. En general, en los gráficos de tamaño vs velocidad de agitación se observa una zona de disminución geométrica del tamaño a velocidades bajas, mientras que conforme aumenta la velocidad de agitación el comportamiento se vuelve asintótico. La teoría clásica de dispersión liquido-liquido establece que se alcanza un diámetro máximo estable y posteriormente el tamaño de glóbulo de la emulsión ya no disminuye y la energía transferida se transforma en calor, aumentando la temperatura de la emulsión (123, 124).

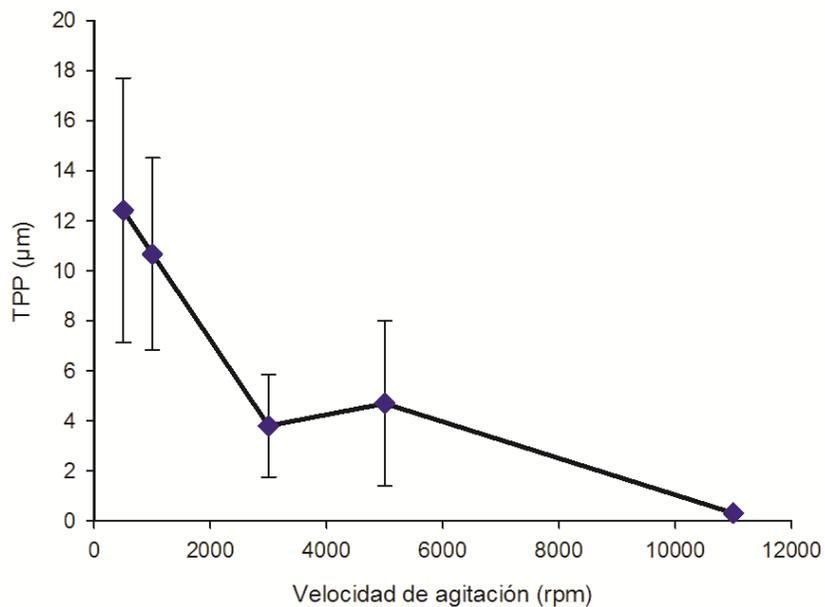


Figura 14. Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula para los sistemas preparados mediante el uso de un disolvente inmiscible con el agua.

Por otra parte, la porosidad de los sistemas se vió impactada también por la velocidad de agitación, tal como puede verse en las micrografías obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido (*Figura 15*). Se observó que a mayor velocidad de agitación la porosidad de las partículas se ve disminuida, debido posiblemente al excesivo estrés mecánico al cual es sometida la doble emulsión, esto genera un rompimiento de los glóbulos y la consecuente migración de la fase interna (w_1) hacia la fase externa acuosa dando como resultado la disminución en la porosidad, tal como sucedió cuando la emulsión se sometió al baño de US. Este fenómeno es común en emulsiones múltiples, por esta razón, en general las condiciones de agitación para la formación de la segunda emulsión son menos vigorosas prefiriéndose velocidades baja (125). Aunado a este fenómeno también hay que considerar que el tiempo que permanece la segunda emulsión en agitación (3 h) es demasiado prolongado, y esto favorece también a la disminución en la porosidad, pero es necesario para la completa evaporación del DCM y la formación de las nanopartículas al entrar el polímero en contacto con un medio no disolvente.

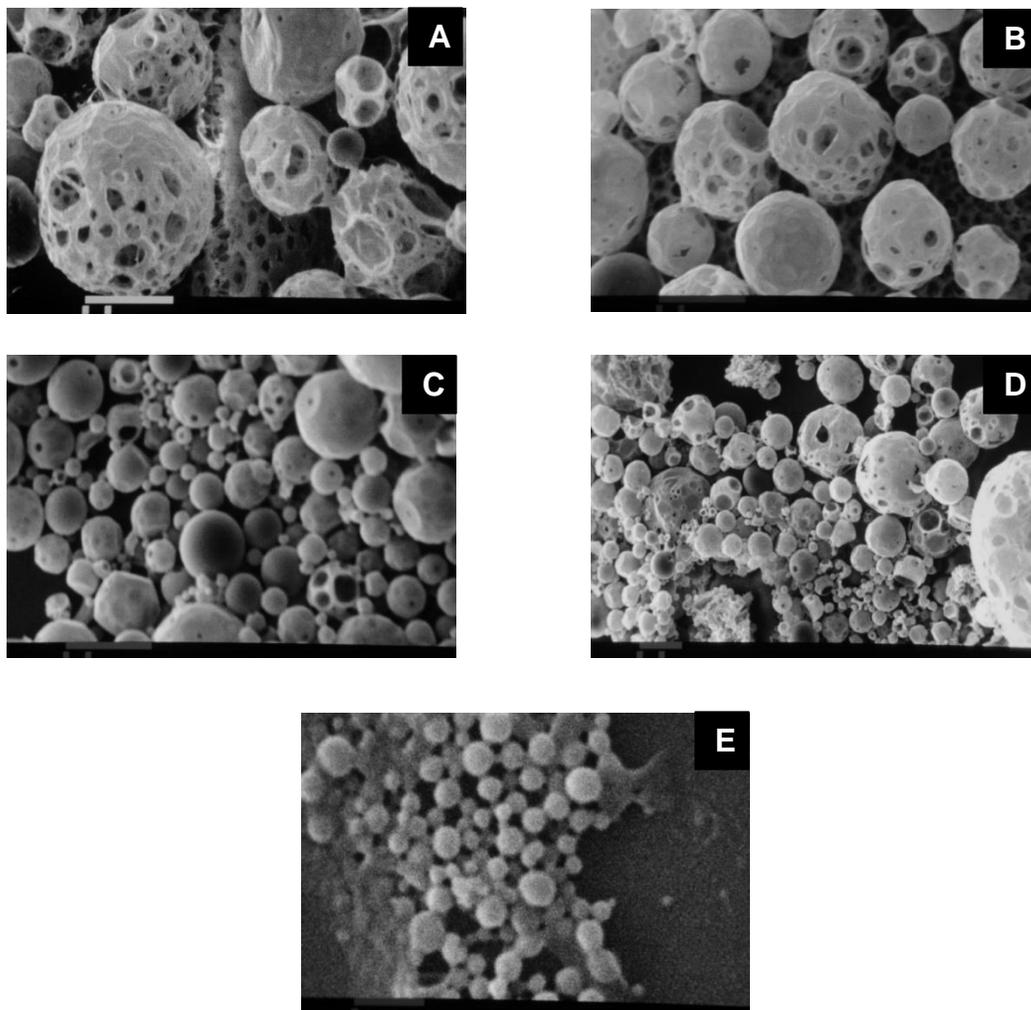


Figura 15. Micrografías obtenidas mediante MEB de las partículas preparadas modificando la velocidad de agitación en donde se aprecia la disminución de la porosidad. A) 500 rpm, B) 1000 rpm, C) 3000 rpm, D) 5000 rpm y E) 11 000, todas a un tiempo de 3 h. (Barra = 10 μm para A, B, C y D; Barra=1 μm para E).

3.2. Método empleando un disolvente parcialmente miscible en agua

Debido a los resultados anteriores, se replanteó la metodología conociendo que era posible obtener sistemas porosos a partir del método de doble-emulsión, incluyendo BCA en la emulsión primaria y conociendo también que la principal limitante era la etapa de evaporación del disolvente, la cual tendría que ser acortada para la obtención de sistemas submicrónicos. La nueva propuesta se basó nuevamente en el método de doble emulsión- evaporación del disolvente (102), siendo la modificación principal el empleo del AE como disolvente orgánico sustituyendo al DCM, la ventaja del uso de AE radica en que es parcialmente miscible con el agua, lo que lo hace susceptible a que difunda cuando se adiciona un exceso de fase externa acuosa, o bien cuando el disolvente es eliminado por destilación. La difusión permite que el polímero sea arrastrado y se dé la formación de las nanopartículas debido a que el polímero se encuentra en un medio no disolvente para él, este fenómeno ocurre de manera rápida sin la necesidad de tiempos prolongados de agitación.

La nueva propuesta metodológica permitió la obtención de dos tipos de partículas, las cuales solo fueron evidenciadas una vez que la dispersión fue sometida a ultracentrifugación a 20000 rpm durante 20 min. La diferencia se observó en la densidad, dando como resultado partículas con una densidad mayor a la del agua, las cuales formaban una pastilla en el fondo del tubo y por otra parte, partículas con una densidad notablemente menor, las cuales flotaron (*Figura 16*). Se determinó el TPP de ambas partículas confirmando la formación de sistemas submicrónicos, las partículas que flotaron tuvieron un tamaño ligeramente mayor (368 ± 85.3 nm), mientras que para las encontradas en la pastilla el tamaño fue de 227 ± 40.7 nm (*Figura 17*).



Figura 16. Características de las partículas obtenidas a partir del método de doble emulsión con la modificación del empleo de un disolvente parcialmente miscible. En la parte izquierda se muestra el tubo con agua utilizado con referencia y en la derecha se observa el tubo en donde se aprecia la presencia de dos tipos de partículas, unas de baja densidad que flotan en la parte superior mientras que otras quedan formando parte de la pastilla.

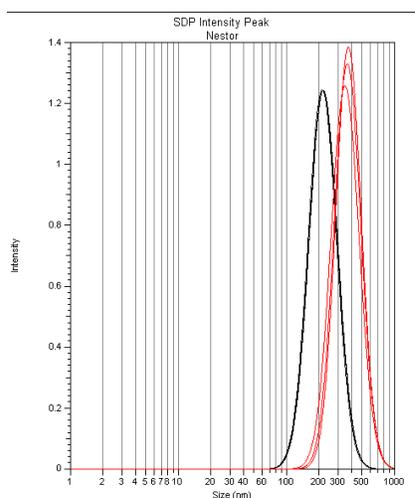


Figura 17. Distribución del tamaño de partícula analizado por DLS. En negro (distribución de la izquierda), las nanopartículas encontradas en la pastilla y en rojo (distribución de la derecha), las nanopartículas de baja densidad que flotaron.

También se procedió a observar los dos tipos de nanopartículas mediante microscopia electrónica de barrido y de transmisión. La *Figura 18A* muestra las micrográficas obtenidas mediante MEB de las partículas que flotaron, las nanopartículas presentaron forma esférica, con una distribución homogénea y con una superficie uniforme, también se observaron nanopartículas “incompletas” (*Figura 18B*), su aparición se atribuye al mecanismo de formación, el cual se explica más adelante. En la *Figura 18* se muestran las micrográficas obtenidas mediante TEM, en las cuales se evidencia la morfología capsular de las nanopartículas que flotaron en el tubo (*Figura 19B*), notándose una diferencia significativa cuando se observaron nanoesferas (*Figura 19A*), en éstas últimas se aprecia una densidad electrónica homogénea mientras que en las primeras se distingue una pared electrónicamente densa y un núcleo claro. Estas evidencias nos sugirieron que el método propuesto permitía la preparación de nanocápsulas “llenas” de aire.

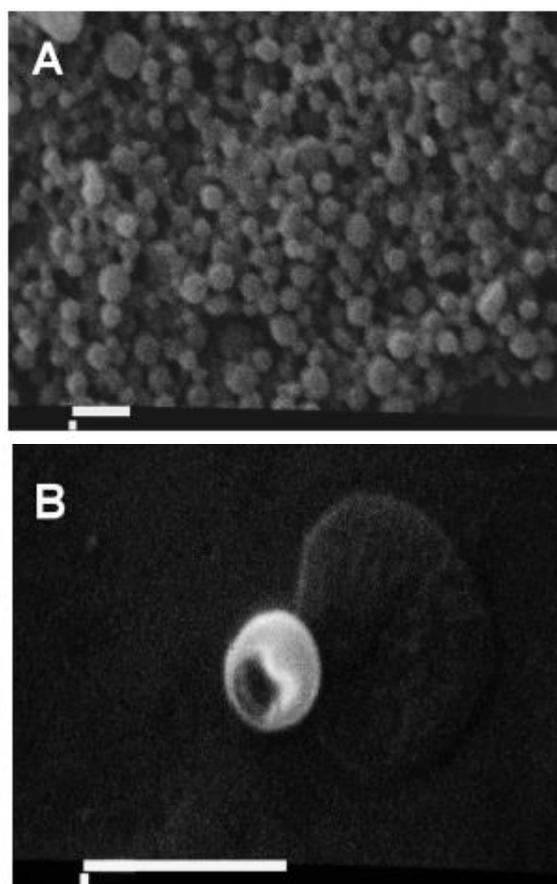


Figura 18. Micrografías obtenidas mediante MEB de las nanopartículas preparadas mediante el método de doble emulsión cuando se empleó un disolvente parcialmente miscible con agua. A) Población de nanocápsulas “llenas” de aire y B) nanopartículas incompletas mostrando cavidades (Barra = 1 μm).

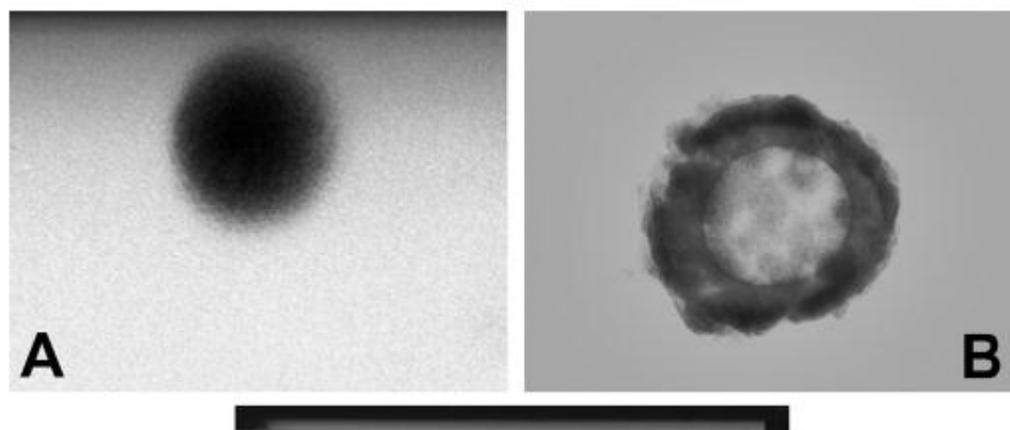


Figura 19. Micrografías obtenidas mediante MET de las nanopartículas preparadas mediante el método de doble emulsión empleando un disolvente orgánico parcialmente miscible con agua. A) Nanoesferas de PLGA y B) nanocápsulas “llenas” de aire (Barra = 1 μm).

El mecanismo de formación que se plantea sugiere que durante la primer emulsificación se forma una nanoemulsión del tipo w/o, donde el BCA se encuentra disuelto en la fase interna acuosa (w_1) (*Figura 20A*), posteriormente la segunda emulsificación permite la obtención de una emulsión doble del tipo w/o/w (*Figura 20B*). Después de la formación de la doble emulsión, probablemente nanogotas de la fase interna (w_1) que contiene BCA son arrastradas hacia la fase externa (w_2) durante la difusión del disolvente. Esas nanogotas están rodeadas de una capa de solvente orgánico residual que contiene polímero, actuando como barrera que previene la penetración de la fase externa (126) (*Figura 20C*). Una vez que el disolvente orgánico es completamente eliminado, el polímero se agrega alrededor de la nanogota formando una nanocápsula hidrofílica (127) (*Figura 20D*). El ABC que fue encapsulado es hidrolizado y libera dióxido de carbono dentro de la nanocápsula (*Figura 20E*), posiblemente en ocasiones se genera una presión elevada y el dióxido de carbono es liberado formando nanocápsulas incompletas o con poros (*Figura 20F*). Durante la liofilización de las nanocápsulas el BCA y el agua residual son sublimados dando lugar a las nanocápsulas “llenas de aire” una vez expuestas a las presión atmosférica (98). Durante el proceso, no toda la fase interna es encapsulada y, la migración de la fase interna hacia la fase externa y la posterior agregación del polímero puede dar lugar a la formación de nanoesferas, las cuales no flotan una vez centrifugadas (*Figura 20G*). El esquema de lo descrito anteriormente se presenta en la *Figura 20*.

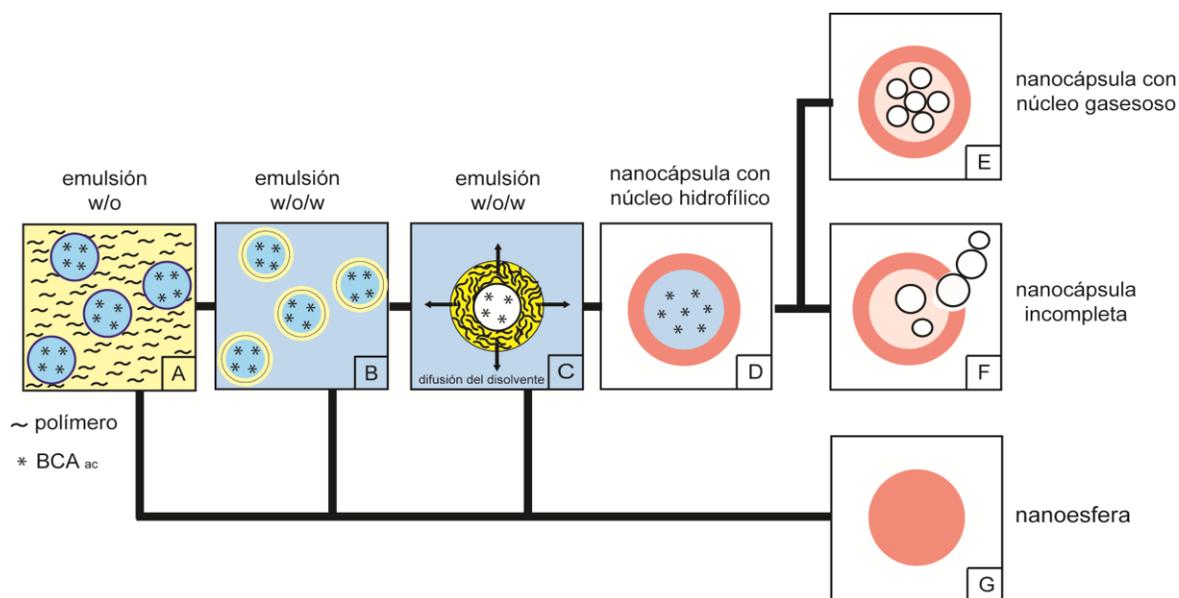


Figura 20. Mecanismo propuesto para la formación nanocápsulas “llenas” de aire. A) Formación de la emulsión primaria; B) Formación de la emulsión secundaria; C) Difusión del disolvente orgánico debido a su eliminación por presión reducida; D) Formación de una nanocápsula con núcleo hidrofílico; E) Generación y retención de gas dentro de la nanocápsula; F) Generación de una presión excesiva y rompimiento de la cápsula generando nanocápsulas incompletas y G) Formación de nanoesferas desde las etapas A, B y C debido a la migración de la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa.

Para confirmar las diferencias en densidad y tratar de determinar su valor de densidad isopícnica, se procedió a separar las partículas en un gradiente generado *in situ* durante la ultracentrifugación de una dispersión coloidal de sílice o bien en un gradiente de sacarosa para los sistemas con densidad mayor a 1.2 g/cm^3 . Los resultados se muestran en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Valores de densidad teórica y densidad isopícnica experimental

Sistema	Densidad teórica (g/cm ³)	Densidad experimental (g/cm ³)
Nanoesferas	1.29	1.24–1.30 ^a
Nanocápsulas oleosas	1.06	1.04 ^b
Nanoesferas llenas de aire	0.45	n.d. ^c
Nanopartículas encontradas en la pastilla	n.c. ^d	1.22-1.30 ^a

^a Determinada en un gradiente de sacarosa.

^b Determinada en un gradiente de sílice coloidal.

^c n.d.=no determinada, el valor se encontró fuera de la curva de calibración.

^d n.c. = no calculada.

Estos datos muestran que las nanoesferas de PLGA tienen una densidad muy cercana al material del que están constituidas, ya que se reporta que el PLGA tiene una densidad de 1.29 g/cm³, valores similares han sido reportados por algunos autores como Vauthier *et al.* (128), quienes encontraron que la densidad isopícnica de nanoesferas de PLGA 50:50 fue de 1.28 g/cm³. Como puede observarse, la densidad de las nanopartículas que se encontraban formando parte de la pastilla tuvieron una densidad similar a la de las nanoesferas, por lo que se confirma parte del mecanismo de formación propuesto. Por otra parte, las nanocápsulas oleosas tuvieron un valor de densidad intermedio entre la densidad de sus constituyentes el PLGA y el Captex[®] 200 cuya densidad es de 0.94 g/cm³. Finalmente, no fue posible determinar experimentalmente la densidad de las nanopartículas llenas de aire, debido a que éstas flotaron nuevamente saliendo del rango de la curva de calibración el cual fue de 1.018-1.138 g/cm³, muy probablemente la densidad experimental se encuentre cercana a la calculada teóricamente, para este cálculo se tomó en cuenta la densidad de los constituyentes; el PLGA y el aire considerando un espesor de la pared de 50 nm según lo determinado en las micrografías obtenidas por MET.

3.2.1. Efecto de la velocidad y tiempo de agitación en la distribución del tamaño de partícula.

Como parte de la optimización de la preparación de las nanocápsulas llenas de aire mediante el método de doble emulsión – evaporación del disolvente empleando un disolvente parcialmente miscible con agua, se evaluó el efecto de la velocidad de agitación, tiempo de agitación y tipo de agitación durante la segunda emulsificación, sobre el TPP. Los resultados se muestran en la *Tabla 9*.

Tabla 9. Influencia de la velocidad, tiempo y tipo de agitación sobre el tamaño de partícula en la preparación de las nanocápsulas “llenas” de aire mediante el empleo de un disolvente parcialmente miscible con agua.

Preparación	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)	Tamaño promedio ($\mu\text{m} \pm \text{d.e.}$)
NCAcEt1	5000 [‡]	3	436.5 \pm 27.5
NCAcEt2	5000 [‡]	5	415.7 \pm 15.4
NCAcEt3	11000 [‡]	3	418.3 \pm 5.3
NCAcEt4	11000 [‡]	5	425.7 \pm 13.6
NCAcEt5	11000 [†]	3	382.5 \pm 34.2
NCAcEt6	11000 [†]	5	348.1 \pm 55.1

[†] Agitación con Ultraturrax® T25, IKA, USA.

[‡] Agitación con Virtiz (mecánica).

Se realizó un ANOVA de dos factores por separado, es decir se comparó primeramente el efecto de la velocidad de agitación y el tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula cuando la agitación se realizó mediante el Virtiz (mecánica) y, posteriormente se comparó efecto del tiempo de agitación y el tipo de agitación (mecánica y Ultraturrax®) sobre el tamaño de partícula cuando la velocidad fue igual para ambas preparaciones. Para el análisis se consideró el promedio de las 3 lecturas de 3 lotes diferentes (n=9).

En la primera comparación el ANOVA reveló que la velocidad de agitación no representa un efecto estadísticamente significativo sobre la reducción o aumento del tamaño de partícula ($p = 0.14$, $\alpha = 0.15$), mientras que el tiempo de agitación sí es un factor que modifica de manera estadísticamente significativa el tamaño de partícula ($p = 0.02$, $\alpha = 0.15$); sin embargo, de manera práctica esta diferencia es tecnológicamente irrelevante ya que ambas nanopartículas se comportarán de manera similar cuando se sometan al US. El resumen del análisis de esta comparación se presenta en la Sección 4.1 del Anexo 4.

Mientras que, en la segunda comparación el ANOVA reveló que el tipo de agitación sí muestra diferencias estadísticamente significativas sobre el tamaño de partícula final, ($p = 0.01$, $\alpha = 0.15$) mientras que el tiempo de agitación no es un factor que afecte ($p = 0.13$, $\alpha = 0.15$). La diferencia encontrada debido a tipo de agitación podría ser importante desde el punto de vista de su comportamiento como agente de contraste ya que la reducción de tamaño es en términos de magnitud significativa y por lo tanto, lo será también en la sección transversal, además era de esperarse que el agitador de alto corte redujera y homogenizara en mayor medida el tamaño de partícula en comparación con el agitador mecánico acondicionado con una propela. Basándose en los resultados anteriores, en la preparación subsecuente de las nanopartículas “llenas” de aire se empleó como condiciones, 11 000 rpm durante 5 min para la primera emulsificación y 11 000 rpm durante 3 min para la segunda emulsificación, ambas efectuadas con el Ultraturrax®. El resumen del análisis de la segunda comparación se presenta en la sección 4.2. del Anexo 4.

4. Evaluación de la ecogenicidad *in vitro* de los sistemas nanoparticulados

4.1. Diseño y construcción del sistema de ultrasonido en modo A

Para la determinación de la ecogenicidad se diseñó y construyó un sistema de US en modo A o unidimensional similar al descrito por El-Sherif *et al.* (7). Como se mencionó en la sección de metodología, el sistema consta de la unidad de muestreo, la cual lo constituye un portamuestras de acrílico de 2.54 x 2.54 x 25 cm (largo x ancho x alto), éste presenta en la parte inferior a una altura de 1 cm, una ventana de 2.54 x 2.54 cm cubierta con polietileno de 100 μm de espesor. Tanto el portamuestras como el transductor se encuentran sostenidos por un soporte de acero

inoxidable, el cual reduce al mínimo la movilidad de los elementos; así mismo, el transductor se encuentra montado sobre un riel que le permite ajustar su posición para que sea focalizado (Figura 22). El soporte de acero inoxidable que sostiene el portamuestras y el transductor se encuentra sumergido en un tanque de acrílico de 20 x 20 x 25 cm (largo x ancho x alto) conteniendo agua desionizada y desgasificada a 37 °C. Los transductores empleados en esta investigación son transductores de un elemento, el diámetro de los transductores fue de 1.27 cm con un foco esférico de 5.08 cm, el cual mejora la recepción de ultrasonidos de pequeños dispersores, en esta investigación se emplearon transductores de 3 diferentes frecuencias centrales, 5.0, 7.5 y 10.0 MHz, los cuales abarcan el rango de frecuencias más empleados en el ámbito imaginológico. El transductor es excitado por un emisor-receptor, el cual permite el funcionamiento de transductores de hasta 35 MHz, el emisor-receptor fue acoplado mediante un cable BCN a un osciloscopio digital el cual permite el registro de señales, las cuales fueron guardadas como archivo digital, y analizadas posteriormente en una PC empleando el software proveído con el equipo. Las primeras pruebas fueron analizadas según lo anteriormente descrito, para pruebas posteriores se programó en LabView® una interfaz entre el osciloscopio y la PC para la adquisición en tiempo real de los datos (ver Anexo 3).

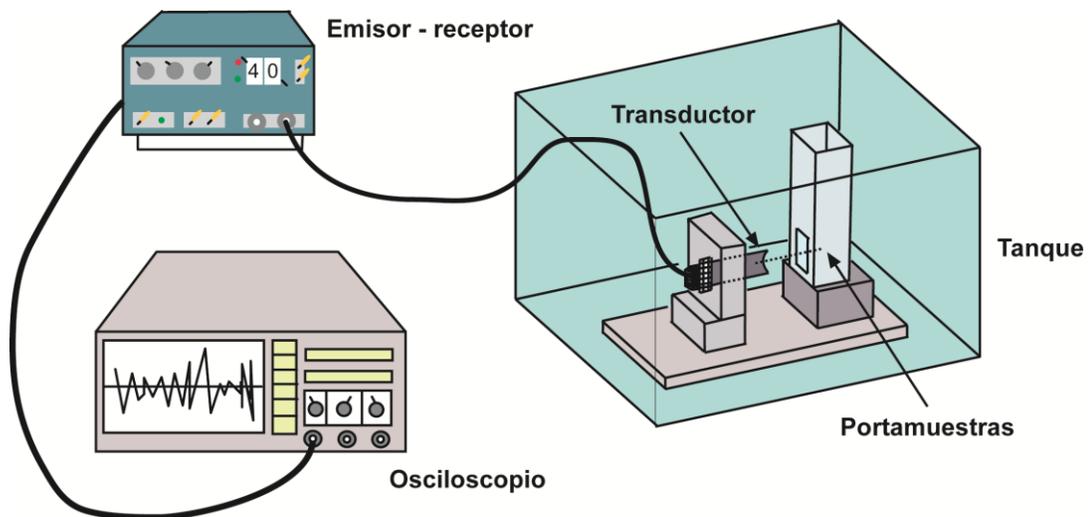


Figura 21. Diseño del sistema para la evaluación in vitro de la ecogenicidad. A) Unidad de muestreo constituido por el portamuestras y el transductor inmerso en un tanque de acrílico; B) Emisor-receptor de pulsos ultrasónicos; C) Osciloscopio para el análisis de los pulsos adquiridos.

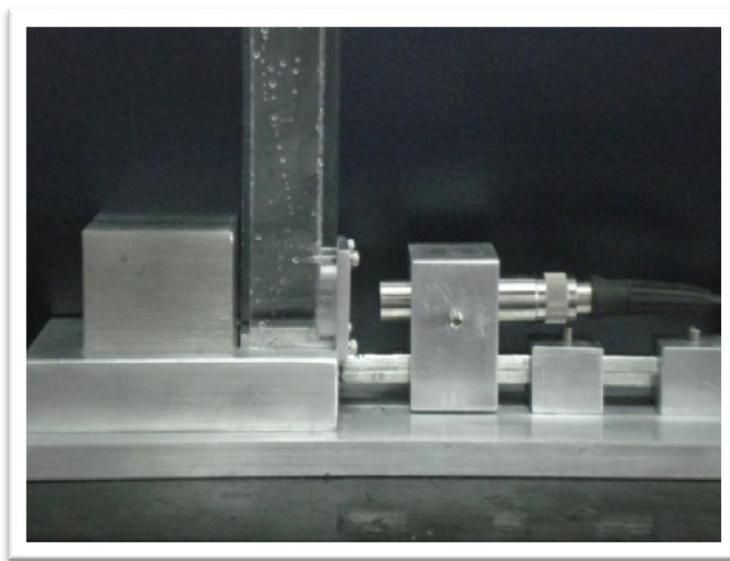


Figura 22. Fotografía de la unidad de muestreo la cual fue diseñada y construida especialmente para esta investigación.

4.2. Determinación de la ecogenicidad *in vitro* de las nanoesferas, nanocápsulas oleosas, nanoemulsión de Captex[®] 200 y PFP.

En estudios preliminares se establecieron los parámetros de los instrumentos (Anexo 2) para posteriormente determinar la ecogenicidad de las nanoesferas de PLGA (NE), nanocápsulas de Captex[®] 200 (NCO), nanoemulsión de Captex[®] 200 (NEO) y nanoemulsión de perfluoropentano (NEPFC). Además como material de referencia se empleó aire en forma de espuma, para la formación de la espuma, se hizo pasar una solución de Tween[®] 80 al 5% varias veces por una jeringa ($n = 50$), obteniéndose una dispersión estable al menos 2 minutos de apariencia lechosa.

Las mediciones de la ecogenicidad se realizaron cuantificando la dispersión acústica generada por los nanosistemas, la cual se determinó tomando como tiempo de retraso $67 \mu\text{s}$, tiempo que tarda en viajar el sonido el doble de la distancia focal (5.08 cm), considerando como el valor de la velocidad del sonido la reportada para el agua. La medición fue realizada en un intervalo de $1 \mu\text{s}$, tomando como tiempo central los $67 \mu\text{s}$. Se capturaron 10 “formas de onda” (*waveforms*) para cada concentración de nanosistemas, para construir una curva dosis-respuesta

acumulada. Posteriormente, en la PC se determinó el voltaje cuadrático medio (V_{rms}) de cada una de las capturas y se calculó el AS. La *Figura 23* es un ejemplo de las capturas de pantalla que se obtuvieron durante la evaluación del efecto ecogénico de las NEPLGA, en la *Figura 23a* se observa la dispersión originada por la línea base (únicamente agua) mientras que en las demás capturas (*Figura 23b-d*) se observa los ecos originados por las nanopartículas a diferentes concentraciones, la amplitud de los ecos fue medido para determinar el V_{rms} y así obtener el AS.

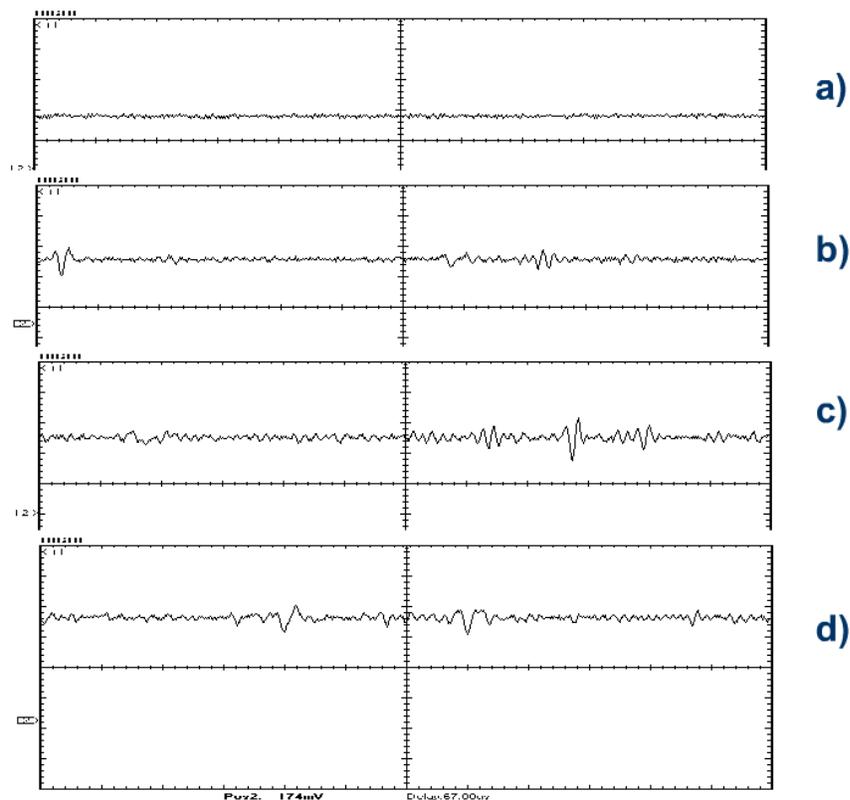


Figura 23. Ejemplos de capturas de pantalla obtenidas de la dispersión acústica de los nanosistemas. a) Línea base; b) NE 0.030 mg/mL; c) NE 0.0375 mg/mL d) NE 0.045 mg/mL

Como se comentó se realizó una curva acumulada de dosis-respuesta construida a partir de los valores de AS y la dosis de cada nanosistema, los resultados obtenidos cuando se empleó una frecuencia de 5 MHz se presentan en la *Figura 24*.

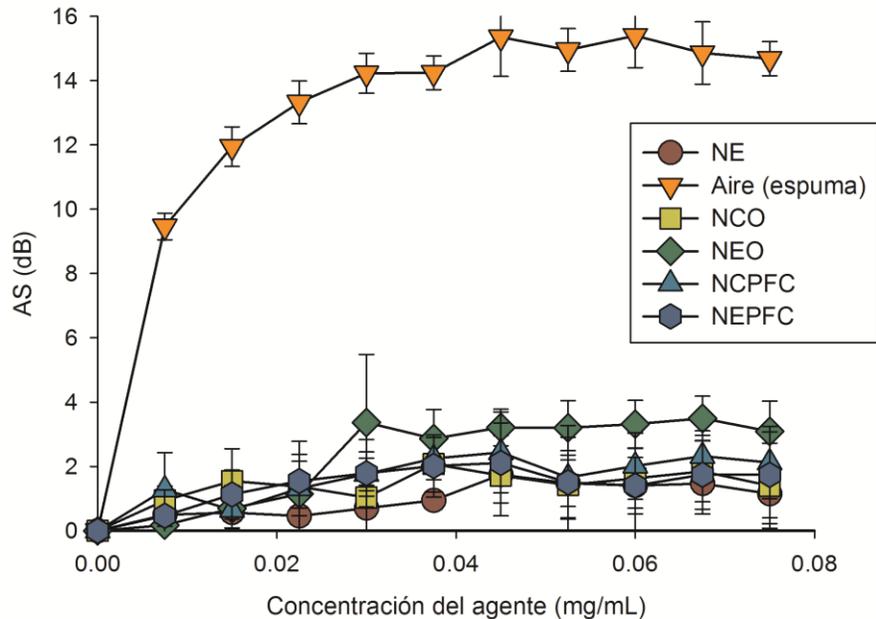


Figura 24. Curva dosis-respuesta para los diferentes sistemas a 5 MHz.

Como puede verse en la *Figura 24*, a una frecuencia de 5 MHz el sistema que presenta una mayor ecogenicidad denotado como un aumento máximo de alrededor de 15 dB, es el material empleado como referencia. Era de esperarse que el aire en forma de espuma presentara este comportamiento debido principalmente a la enorme diferencia de impedancia dada por la enorme diferencia también en la densidad del aire con respecto al medio de dispersión. La impedancia acústica como se comentó anteriormente, se define como el producto de la densidad del medio por la velocidad de la onda que atraviesa ese medio. A mayor diferencia de impedancias se tendrá un incremento en la intensidad de la onda acústica reflejada. Por otra parte, la presencia de nanosistemas sólidos (nanoesferas) y con centro líquido (nanocápsulas y nanoemulsiones) muestran un aumento poco significativo en la ecogenicidad (2 - 4 dB). En la práctica imaginológica se requiere que un buen agente de contraste sea capaz de aumentar la señal al menos de 20-30 dB (7).

Se realizó un ANOVA de dos factores para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes sistemas y entre las diferentes concentraciones. Se tomó como base para el análisis el promedio de las 10 lecturas de 3 lotes diferentes ($n = 30$).

El análisis permitió deducir que la concentración del nanosistema sí tiene un efecto sobre el AS ($p = <0.001$, $\alpha = 0.15$) y que este efecto fue más marcado en el caso de la dispersión de aire; en general, se observó que a concentraciones inferiores a 0.030 mg/mL conforme se incrementa la concentración se da un aumento en el AS ($p = <0.001$, $\alpha = 0.15$), sin embargo, a concentraciones mayores a 0.30 mg/mL, el aumento de señal llega a un máximo donde el valor es estadísticamente similar, este efecto se observó en todas las preparaciones. Por otra parte, de acuerdo con el análisis de Tukey se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el AS de la NEO con respecto de las demás preparaciones ($p = <0.001$, $\alpha = 0.15$), esta diferencia se observó únicamente a partir de la concentración de 0.03 mg/mL. En general, el AS debido a las burbujas de aire fue estadísticamente diferente a todos los sistemas evaluados ($p = <0.001$, $\alpha = 0.15$). El mismo comportamiento se observó a 7.5 y 10 MHz. El resumen del análisis se presenta en la sección 4.3 del Anexo 4.

Es importante considerar las posibles razones por las cuales los sistemas nanoparticulados probados no tuvieron un alto poder ecogénico. Es evidente que no existe una diferencia importante de impedancias entre las nanopartículas y el medio de dispersión, si consideramos la densidad de los diferentes materiales utilizados y la velocidad del sonido para los sólidos y líquidos es de 1540 m/s y la del aire es de 380 m/s, las impedancias de las diferentes preparaciones son las mostradas en la *Tabla 10*.

Tabla 10. Impedancias acústicas de los diferentes materiales utilizados en la preparación de las nanopartículas.

Material	Densidad (g/cm ³) a 20°C	Impedancia Pa*s/m x 10 ⁵
Agua	0.998	15.35
Captex [®] 200	0.94	14.48
PLGA	1.28	18.48
Perfluoropentano	1.54	23.10
Aire	0.00129	0.005109

Como puede verse la diferencia en la impedancia de las preparaciones que contienen nanopartículas y el agua es mínima, a diferencia entre la impedancia entre el aire y el agua, lo que origina que la intensidad de reflexión acústica sea mínima en las preparaciones con nanopartículas. Además la compresibilidad del aire es superior a la compresibilidad de cualquiera de los demás materiales por encontrarse en estado gaseoso. La dependencia de la ecogenicidad con respecto a la impedancia se hace evidente como se mencionó en la sección de marco de referencia, en la propiedad llamada sección transversal ($\bar{\sigma}$).

4.3. Determinación de la ecogenicidad *in vitro* de nanocápsulas llenas de aire.

Posteriormente a la obtención de las nanocápsulas llenas de aire, se evaluó su ecogenicidad *in vitro* tal como se hizo con los demás sistemas nanoparticulados. La única modificación fue en relación con el método de captura de datos, el cual como se ha mencionado para el caso de las nanocápsulas llenas de aire, fue ayudado mediante la programación de una interfaz entre el osciloscopio y la PC (ver Anexo 3).

Las curvas dosis-respuesta se muestran en la *Figura 25*, en el gráfico se puede observar que las nanocápsulas que fueron sometidas a una frecuencia de 10 MHz son las únicas que mostraron un aumento significativo en la ecogenicidad, con una respuesta máxima de aproximadamente 15 dB, a partir de una concentración de nanopartículas de 0.045 mg/mL, mientras que a 7.5 MHz la respuesta máxima fue de aproximadamente 4 dB y finalmente a 5 MHz la ecogenicidad máxima registrada fue de aproximadamente 2 dB.

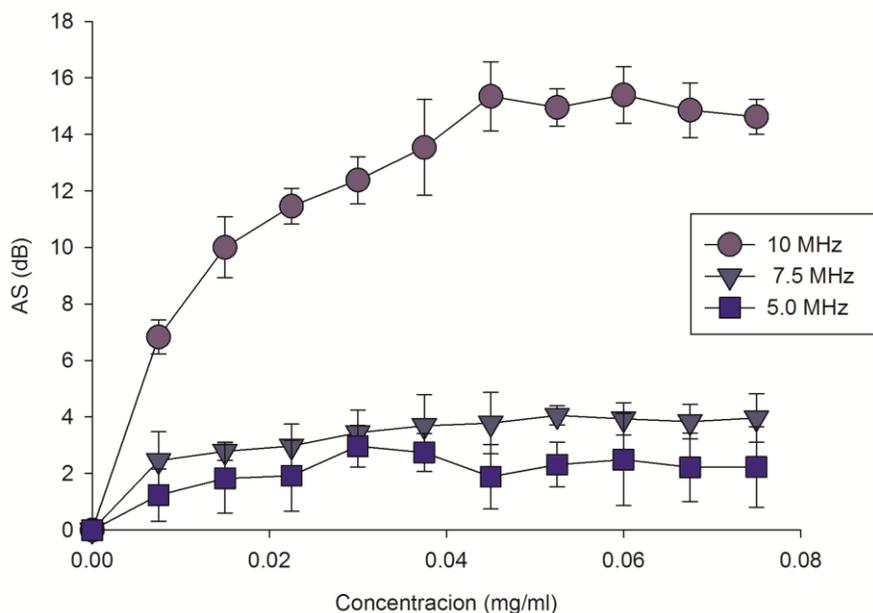


Figura 25. Curvas dosis- respuesta de las preparaciones elaboradas por el método de doble emulsión – evaporación del disolvente a diferentes frecuencias.

Se realizó un ANOVA de dos factores para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones y la frecuencia. El análisis permitió deducir que la concentración del nanosistema sí tiene un efecto sobre el AS ($p = <0.001$, $\alpha = 0.15$). Por otra parte, también se observó diferencias estadísticamente significativas entre el AS y la frecuencia de sonicación ($p = <0.001$, $\alpha = 0.15$). El resumen del análisis se presenta en la sección 4.4 del Anexo 4.

Como se observa, existe claramente una dependencia de la frecuencia con respecto a la ecogenicidad. Esta dependencia puede deberse a que las nanocápsulas gaseosas se comportan como osciladores armónicos reforzando la señal a la frecuencia fundamental, esto último fue evidenciado mediante un estudio de atenuación que se detalla en la sección 4.5.

Debido a que la inyección de aire en el torrente sanguíneo por sí mismo representa un riesgo, se deben de administrar volúmenes pequeños, se ha visto que volúmenes menores a 200 μ l son seguros (7), por lo tanto la dosis necesaria para observar un aumento en la ecogenicidad debe ser baja. Considerando que la concentración de 0.045 mg/mL fue la mínima concentración

en la que se observó el máximo aumento de señal, sería necesario para estudios *in vivo* administrar una dosis de 3-4 mg/Kg, este valor sería alto considerando que debe ser administrado en un volumen menor a 200 μ l, sin embargo, debe considerarse que el agente sería diseñado para acumularse en un órgano o tejido en específico, lo que incrementaría la concentración *in situ* y por lo tanto la dosis de aplicación, este tipo de situaciones son difíciles de predecir a partir de datos *in vitro*.

Adicionalmente, se determinó el efecto de la concentración del BCA en la ecogenicidad de las nanocápsulas “llenas” de aire a la frecuencia de 10 MHz, partiendo de la hipótesis de que a mayor concentración de BCA se podrían tener sistemas con mayor ecogenicidad. Se encontró que el aumento en la señal a una concentración de nanocápsulas de 0.045 mg/mL, fue de 14.6 ± 1.41 dB, 15.3 ± 1.0 dB y 13.6 ± 2.0 dB, cuando se utilizó BCA 1%, BCA 3%, BCA 5%, respectivamente (Figura 13). El ANOVA demostró que no hay diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de BCA y la ecogenicidad encontrada ($p = 0.69$, $\alpha = 0.05$). El resumen completo puede consultarse en la sección 4.5. del Anexo 4.

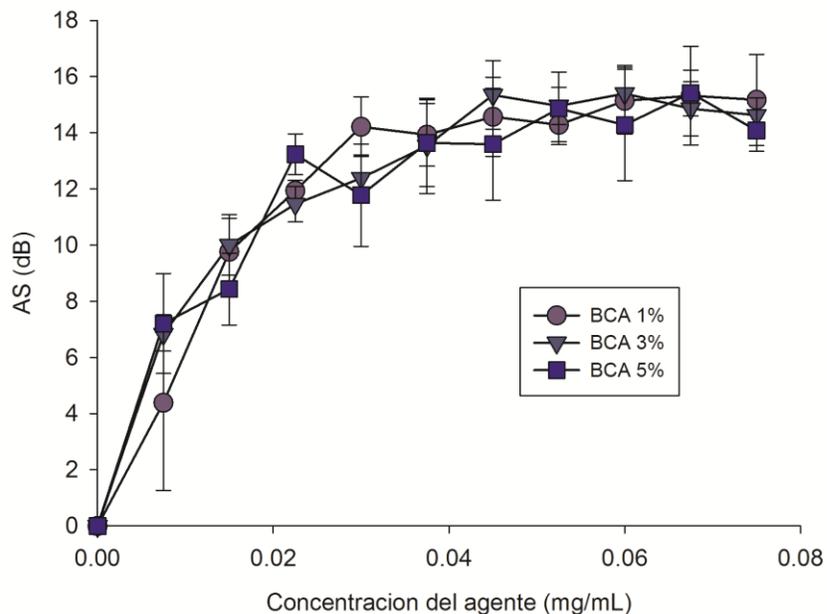


Figura 26. Curvas dosis- respuesta de las nanocápsulas “llenas” de aire construidas para observar el efecto de la concentración del BCA en la ecogenicidad.

De acuerdo con el mecanismo propuesto, la formación de las nanocápsulas “llenas” de aire dependerá en mayor medida de que se favorezca la formación, primeramente, de nanocápsulas con núcleo acuoso y posteriormente de que la presión ejercida por la generación del gas no rompa la estructura de las nanocápsulas; en ese sentido, la concentración del BCA solo tendrá un papel importante en lograr la formación de más nanocápsulas “llenas” de aire pero no que sean más ecogénicas, ya que el volumen de gas encapsulado permanecerá constante. Como se mencionó anteriormente, el aumento en la concentración del BCA solo incrementó el rendimiento en la cantidad recuperada de nanocápsulas “llenas” de aire después de la ultracentrifugación a expensas de una disminución en la cantidad de nanoesferas formadas, siendo del 12.4%, 15.5% y 16.3% (p/p), porcentaje que fue calculado de acuerdo a la siguiente relación [peso de nanocápsulas “llenas” de aire/(peso de nanoesferas + peso de nanocápsulas “llenas” de aire) x 100], ambos sistemas recuperados del mismo lote de preparación.

4.4. Determinación del tiempo de máxima respuesta

Se evaluó la disminución de la respuesta con respecto al tiempo utilizando una concentración de las nanocápsulas “llenas” de aire de 0.045 mg/mL preparadas con 3 % de BCA a una frecuencia de 10 MHz, encontrándose una disminución de aproximadamente 2 dB después de 30 minutos (*Figura 27*).

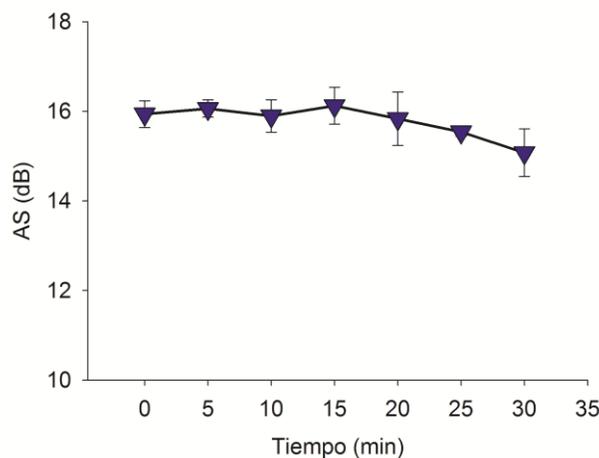


Figura 27. Disminución de la señal con respecto al tiempo para las nanocápsulas preparadas con 3 % de BCA a una concentración de 0.045 mg/mL.

Este estudio es importante porque revela en cierto grado la estabilidad física del agente y la resistencia a la ruptura de su pared, ya que una disminución en la señal se traduce en la pérdida de la integridad de la pared y la penetración de agua desplazando el aire o gas encapsulado (129). En un estudio imaginológico se espera que el agente de contraste actúe durante al menos 10-15 minutos debido a la pared polimérica que las constituye. 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, requieren que su estabilidad sea mayor a 5 minutos (130). En el caso particular de las nanocápsulas “llenas” de aire la pérdida de señal fue mínima después de 30 minutos, por lo que se puede inferir que tienen una buena estabilidad *in vitro*; sin embargo, esto no es concluyente ya que *in vivo* están involucrados otros fenómenos de estrés mecánico como el paso transpulmonar repetido del agente, entre otros.

4.5. Determinación de la frecuencia de resonancia

Como se mencionó anteriormente, las nanocápsulas “llenas” de aire mostraron tener una dependencia de la ecogenicidad con respecto a la frecuencia a la cual se irradiaban. Para determinar si efectivamente las nanocápsulas “llenas” de aire podrían comportarse como osciladores armónicos, se realizó la determinación de la atenuación del ultrasonido con respecto a la frecuencia. Este estudio se basa en determinar la pérdida de amplitud (atenuación) de un eco generado por un obstáculo debido a su paso por un medio, en este caso, la dispersión de nanocápsulas “llenas” de aire. La pérdida de señal puede ser debida a cualquiera de los fenómenos descritos en la sección 3.3.3.3, sin embargo, cuando existen dispersores acústicos en el medio capaces de comportarse como osciladores armónicos la atenuación es dependiente de la frecuencia. En otras palabras, si la partícula es capaz de comportarse como oscilador armónico entonces poseerá una frecuencia a la cual se logre un máximo de oscilación, llamada frecuencia de resonancia, en la cual también se encontrará la máxima atenuación ya que la partícula absorberá esa frecuencia.

Para efectuar este análisis se calculó el coeficiente de atenuación de la dispersión de las nanocápsulas “llenas” de aire en función de la frecuencia. Lo anterior a partir de un análisis de 10 ecos generados por un bloque de acero inoxidable y dividido en 50 segmentos. Se emplearon los tres transductores para cubrir un rango de 3.11 – 12.66 MHz, tal como se describió en la metodología. El gráfico característico de atenuación *versus* frecuencia se puede observar en la *Figura 28*

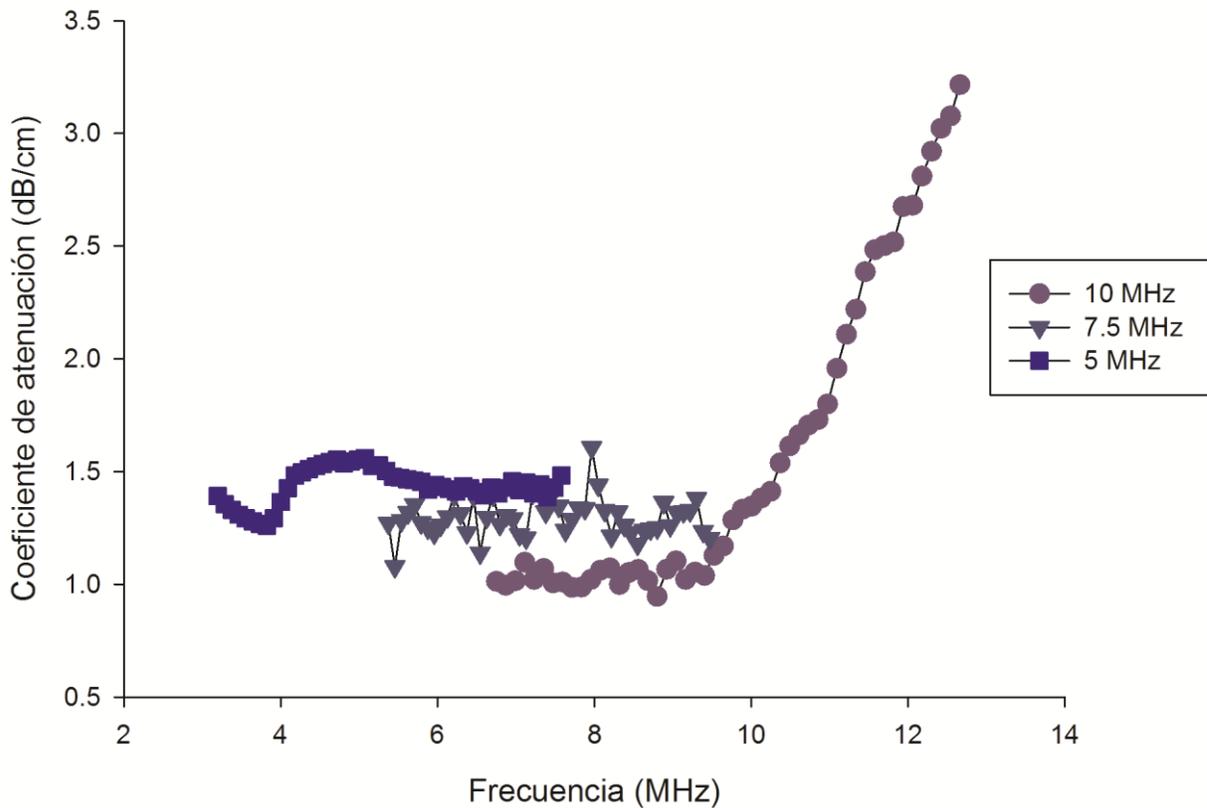


Figura 28. Gráfico del coeficiente de atenuación contra la frecuencia para la dispersión de nanocápsulas “llenas” de aire, empleando los 3 transductores de 5, 7.5 y 10 MHz.

Como se mencionó anteriormente, existe una relación entre tamaño de partícula y la frecuencia de resonancia, la cual se expresa en la ecuación 11 (54). Considerando que las nanocápsulas gaseosas tienen un diámetro de $0.37 \mu\text{m}$, la frecuencia de resonancia esperada sería de 17.6 MHz. Si bien, la frecuencia máxima de estudio fue de 12.66 MHz a partir del transductor de 10 MHz (ver Anexo 1), se puede observar una tendencia clara de aumento de la atenuación conforme se aumenta la frecuencia de sonicación. El aumento en la señal que se observó a una frecuencia de 10 MHz para las nanocápsulas “llenas” de aire puede explicarse debido a que probablemente se esté irradiando parcialmente a la frecuencia de resonancia y que por ello, las nanocápsulas “llenas” de aire oscilen y aumenten la dispersión acústica. Por otra parte, como a frecuencias más bajas no existe una contribución significativa debido a la oscilación armónica las nanocápsulas “llenas” de aire, no muestran una alta ecogenicidad. También es necesario puntualizar que no solo el tamaño de la partícula es relevante para que un sistema pueda alcanzar una oscilación armónica, sino también, dependerá de las características elásticas de las partículas, ya que sistemas rígidos tienen frecuencias de resonancia más altas que sistemas más elásticos, a pesar de que poseen el mismo tamaño (6, 99).

VI. CONCLUSIONES

La presente investigación permitió concluir que el método de polimerización interfacial se presenta como una alternativa simple para la preparación de microcápsulas de perfluoropentano y etilcianoacrilato, además se demostró que el método de emulsificación-difusión es una alternativa versátil y sencilla para la preparación de preparación de nanoesferas, nanocápsulas líquidas de Captex® 200 y nanoemulsiones de Captex® 200 y perfluoropentano. Las características morfológicas y propiedades fisicoquímicas como la densidad de las nanopartículas mencionadas anteriormente, juegan un papel importante en su poder ecogénico, se observó que las nanoesferas, nanocápsulas líquidas y nanoemulsiones no mostraron ecogenicidad significativa a ninguna de las frecuencias empleadas.

Asimismo, se desarrolló una metodología reproducible para obtener nanocápsulas poliméricas biodegradables “llenas” de aire mediante la modificación del método de doble emulsión – evaporación del disolvente, empleando un disolvente parcialmente miscible con agua, se determinó que el poder ecogénico de las nanocápsulas “llenas” de aire fue dependiente de la frecuencia de sonicación, se observó un aumento de señal importante a partir de una concentración del agente de 0.045 mg/mL y una frecuencia de 10 MHz, mientras que a 5 MHz y 7.5 MHz el aumento fue mínimo. Se demostró una alta estabilidad de las nanocápsulas “llenas” de aire a la sonicación mostrando una disminución mínima (2 dB) de la señal después de 30 minutos. Las nanocápsulas “llenas” de aire representan sistemas con gran potencial para ser empleados como agentes de contraste en USD, implicando ventajas importantes como son: ecogenicidad relevante a bajas concentraciones y alta estabilidad, además de ser un agente nanométrico compuesto por una pared polimérica biodegradable susceptible de ser funcionalizada para ser dirigida a un sitio específico, por ejemplo un tumor.

El presente trabajo deja como perspectivas importantes, el estudio de diversos parámetros en la preparación de las nanocápsulas “llenas” de aire como la temperatura, proporción de fases y tipo de polímero para mejorar el rendimiento; por otra parte, sería interesante realizar la modificación y funcionalización de la superficie para aumentar su tiempo circulación y dirigirlas a un sitio de acción específico, finalmente se hacen imprescindibles los estudios de ecogenicidad *in vivo* empleando modelos animales.

VII. REFERENCIAS

1. D.M. El-Sherif. Development of novel PLGA contrast agents for use as ultrasound targeted drug delivery vehicles. Tesis. Doctor en Filosofía, Drexel University, 2003.
2. P.A. Lewin. Quo vadis medical ultrasound? *Ultrasonics*. 42:1-7 (2004).
3. P. Burns. Bubbles in radiology - the state of art. Universidad de Toronto, 2000.
4. E.R. Wisner, K. Ferrara, J.D. Gabe, D. Patel, T.G. Nyland, R.E. Short, and T.B. Ottoboni. Contrast enhanced intermittent power Doppler ultrasound with sub-micron bubbles for sentinel node detection. *Acad Radiol*. 9 Suppl 2:S389-391 (2002).
5. R. Basude and M.A. Wheatley. Generation of ultraharmonics in surfactant based ultrasound contrast agents: use and advantages. *Ultrasonics*. 39:437-444 (2001).
6. S.H. Bloch, R.E. Short, K.W. Ferrara, and E.R. Wisner. The effect of size on the acoustic response of polymer-shelled contrast agents. *Ultrasound Med Biol*. 31:439-444 (2005).
7. D.M. El-Sherif and M.A. Wheatley. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J Biomed Mater Res A*. 66:347-355 (2003).
8. D.M. Anderson. *Mosby's medical, nursing, & allied health dictionary*, Mosby, St. Louis, 2002. pp 304.
9. W.R. Hendee and E.R. Ritenour. *Medical imaging physics*, Wiley-Liss, New York, 2002.
10. A. Elliott. *Medical imaging*. *Nucl Instr Meth Phys Res Section A*. 546:1-13 (2005).
11. J.P. Hornak. *Encyclopedia of imaging science and technology*, J. Wiley, New York, 2002.
12. WHO. *Essential diagnostic imaging*, World Health Organization, 2012. pp. 1-4.
13. N. de Jong, P.J. Frinking, A. Bouakaz, and F.J. Ten Cate. Detection procedures of ultrasound contrast agents. *Ultrasonics*. 38:87-92 (2000).
14. C.J. Harvey, J.M. Pilcher, R.J. Eckersley, M.J. Blomley, and D.O. Cosgrove. Advances in ultrasound. *Clin Radiol*. 57:157-177 (2002).
15. M. Halliwell. A tutorial on ultrasonic physics and imaging techniques. *Proc Inst Mech Eng Part H*. 224:127-142 (2010).
16. E. Mathiowitz. *Encyclopedia of controlled drug delivery*, John Wiley & Sons, New York, 1999. pp. 325-340.
17. A.M. Morawski, G.A. Lanza, and S.A. Wickline. Targeted contrast agents for magnetic resonance imaging and ultrasound. *Curr Opin Biotechnol*. 16:89-92 (2005).

18. D. Chatterjee, K. Sarkar, P. Jain, and N.E. Schreppler. On the suitability of broadband attenuation measurement for characterizing contrast microbubbles. *Ultrasound Med Biol.* 31:781-786 (2005).
19. H. Becher and P. Burns. *Handbook of Contrast Echocardiography*, 2000. Toronto. pp-1-42.
20. A. Raisinghani and A.N. DeMaria. Physical principles of microbubble ultrasound contrast agents. *Am J Cardiol.* 90:3J-7J (2002).
21. L. Needleman. Vascular applications of ultrasound contrast agents. *U Ultrasound Med Biol.* 29:S45 (2003).
22. D.O. Cosgrove. Contrast-enhanced ultrasound of liver lesions. *Ultrasound Med Biol.* 36:2146-2147 (2010).
23. D. Cosgrove and M. Blomley. Liver tumors: evaluation with contrast-enhanced ultrasound. *Abdom Imaging.* 29:446-454 (2004).
24. C. Nicolau. Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Yes, it is possible. *Radiologia* (2012).
25. C. Nicolau, L. Bunesch, C. Sebastia, and R. Salvador. Diagnosis of bladder cancer: contrast-enhanced ultrasound. *Abdom Imaging.* 35:494-503 (2010).
26. V. Sanna, G. Pintus, P. Bandiera, R. Anedda, S. Punzoni, B. Sanna, V. Migaleddu, S. Uzzau, and M. Sechi. Development of polymeric microbubbles targeted to prostate-specific membrane antigen as prototype of novel ultrasound contrast agents. *Mol Pharm.* 8:748-757 (2011).
27. A. Sever, A. Broillet, M. Schneider, K. Cox, S. Jones, J. Weeks, P. Mills, D. Fish, and P. Jones. Dynamic visualization of lymphatic channels and sentinel lymph nodes using intradermal microbubbles and contrast-enhanced ultrasound in a swine model and patients with breast cancer. *J Ultrasound Med.* 29:1699-1704 (2010).
28. F.M. Drudi, V. Cantisani, M. Gnechi, F. Malpassini, N. Di Leo, and C. de Felice. Contrast-Enhanced Ultrasound Examination of the Breast: A Literature Review. *Ultraschall Med* (2012).
29. A. Della Martina, K. Meyer-Wiethe, E. Allemann, and G. Seidel. Ultrasound contrast agents for brain perfusion imaging and ischemic stroke therapy. *J Neuroimaging .* 15:217-232 (2005).
30. S. Rickes, K. Monkemuller, and P. Malfertheiner. Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of pancreatic tumors. *JOP .* 7:584-592 (2006).

31. S.A. Beyer-Enke, M. Hocke, A. Ignee, B. Braden, and C.F. Dietrich. Contrast enhanced transabdominal ultrasound in the characterisation of pancreatic lesions with cystic appearance. *JOP*. 11:427-433 (2010).
32. S. Saini, K.S. Jhaveri, D.V. Sahani, J.C. Varghese, and P.F. Hahn. Evaluation of simethicone coated cellulose (SonoRx) as a negative oral contrast agent for abdominal-pelvic computed tomography. *Acad Radiol*. 9 Suppl 2:S357-358 (2002).
33. M.J. Blomley, J.C. Cooke, E.C. Unger, M.J. Monaghan, and D.O. Cosgrove. Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *BMJ*. 322:1222-1225 (2001).
34. E. Quaia. *Contrast media in ultrasonography : basic principles and clinical applications*, Springer, New York, NY, 2005.
35. N. de Jong, L. Hoff, T. Skotland, and N. Bom. Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: theoretical considerations and some measurements. *Ultrasonics*. 30:95-103 (1992).
36. N. de Jong, R. Cornet, and C.T. Lancée. Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres. Part two: measurements. *Ultrasonics*. 32:455-459 (1994).
37. L. Hoff. Acoustic properties of ultrasonic contrast agents. *Ultrasonics*. 34:591-593 (1996).
38. R. Gramiak and P.M. Shah. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*. 3:356-366 (1968).
39. B.A. Carroll, R.J. Turner, E.G. Tickner, D.B. Boyle, and S.W. Young. Gelatin encapsulated nitrogen microbubbles as ultrasonic contrast agents. *Invest Radiol*. 15:260-266 (1980).
40. S.B. Feinstein, P.M. Shah, R.J. Bing, S. Meerbaum, E. Corday, B.L. Chang, G. Santillan, and Y. Fujibayashi. Microbubble dynamics visualized in the intact capillary circulation. *J Am Coll Cardiol*. 4:595-600 (1984).
41. J. Hilmann, L. Lange, and I. Zimmermann. (1984). Mikropartikel und gasblächen enthaltendes ultraschall-kontrastmittel. Patente. EP 0123235.
42. R. Lohrmann. Gas-filled microspheres with fluorine-containing shells. Patente. US 5562893, 1996.
43. A.P. Millerand N.C. Nanda. Contrast echocardiography: new agents. *Ultrasound Med Biol*. 30:425-434 (2004).
44. Y. Liu, H. Miyoshi, and M. Nakamura. Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery. *J Control Release*. 114:89-99 (2006).

45. B.A. Kaufmann, K. Wei, and J.R. Lindner. Contrast Echocardiography. *Curr Probl Cardiol.* 32:51-96 (2007).
46. G. Marshall, A. Sykes, J. Berry, and L. Jonker. The “humble” bubble: Contrast-enhanced ultrasound. *Radiography.* 17:345-349 (2011).
47. D.L. Miller and R.A. Gies. The influence of ultrasound frequency and gas-body composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffects in mouse intestine. *Ultrasound Med Biol.* 26:307-313 (2000).
48. D.L. Miller. WFUMB safety symposium on echo-contrast agents: *In vitro* bioeffects. *Ultrasound Med Biol.* 33:197-204 (2007).
49. J.H. Hwang, A.A. Brayman, M.A. Reidy, T.J. Matula, M.B. Kimmey, and L.A. Crum. Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments in vivo. *Ultrasound Med Biol.* 31:553-564 (2005).
50. G.R. ter Haar. Ultrasonic contrast agents: safety considerations reviewed. *Eur J Radiol.* 41:217-221 (2002).
51. F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D.A. Berk, V.P. Torchilin, and R.K. Jain. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 55:3752-3756 (1995).
52. Y. Wang, X. Li, Y. Zhou, P. Huang, and Y. Xu. Preparation of nanobubbles for ultrasound imaging and intracellular drug delivery. *Int J Pharm.* 384:148-153 (2010).
53. B.B. Goldberg. Contrast agents. *Ultrasound Med Biol.* 26 Suppl 1:S33-34 (2000).
54. B.E. Oeffinger and M.A. Wheatley. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics.* 42:343-347 (2004).
55. O.C. Farokhzad and R. Langer. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev.* 58:1456-1459 (2006).
56. A. Vikdjerg, S. Petersen, F. Melander, J. Henriksen, and K. Jorgensen. Liposomes for drug delivery and methods for preparation thereof. (2009). Patente. WO 2009141450A2.
57. D. Fologea, G. Salamo, R. Henry, M. Borrelli, and P. Corry. (2010). Method of controlled drug release from a liposome carrier. Patente. WO 201011490.
58. W. Neuberger and V. Albrecht. (2011). Pegylated liposomes formulations for photodynamic treatment of inflammatory diseases. Patente. EP 2222277A1.
59. T. Zhu and J. Szostak. (2011). Uniform-sized, multi-drug carrying, and photosensitive liposomes for advanced drug delivery. Patente. US 20110105995.

60. N. Alcántar, E. Williams, and R. Toomey. (2010). Niosome-hydrogel drug delivery system. Patente. US 20100068264.
61. K. Breitenkamp, K. Sill, H. Skaff, and R. Breitenkamp. (2011). Compositions comprising polymeric micelles for drug delivery. Patente. US 8299128.
62. C. Paleos, D. Tsiourvas, and O. Sideratou. (2006). Multifunctional dendrimers and hyperbranched polymers as drug and gene delivery systems. Patente. US 20060204472.
63. I. Legen, J. Kerc, and P. Jurkovic. (2010). Self-microemulsifying drug delivery systems. Patente. EP 1961412A1.
64. B. Chung, Y. Lim, and K. Kim. (2010). Gold nanocages containing magnetic nanoparticles. Patente. US 20100228237.
65. J. Cheon and J.-H. Lee. (2009). Nanoparticles for penetration of blood-brain barrier. Patente. US 20100228237.
66. J. Viladot Petit, R. Delgado González, and A. Fernández Botello. (2011). Lipid nanoparticle capsules. Patente. EP 2549977.
67. B. Mishra, B.B. Patel, and S. Tiwari. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*. 6:9-24 (2010).
68. M. Muthu. Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview. *Asian J Pharm*. 3:266-273 (2009).
69. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Dev Ind Pharm*. 24:1113-1128 (1998).
70. A. Kumari, S.K. Yadav, and S.C. Yadav. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B*. 75:1-18 (2010).
71. H. Maeda and Y. Matsumura. EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* (2010).
72. A.F. Ourique, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, and R.C.R. Beck. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int J Pharm*. 352:1-4 (2008).
73. J.W. Vanderhoff, M.S. El-Aasser, and J. Ugelstad. (1979). Polymeric emulsification process. Patente. US 4177177.

74. H. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, and C. Thies. (1988). Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules. Patente. EP 0275796 B2.
75. C. Bindschaedler, R. Gurny, and E. Doelker. (1988). Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof. Patente. WO 8808011.
76. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, R. Gurny, H. Fessi, and E. Doelker. (1999). Method for producing an aqueous colloidal dispersion of nanoparticles. Patente. WO1999033558.
77. D. Quintanar, H. Fessi, E. Doelker, and E. Allémann. (1999). Method for preparing vesicular nanocapsules. Patente. US 6884438.
78. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, R. Gurny, H. Fessi, and E. Doelker. (2001). Method for producing aqueous colloidal dispersions of nanoparticles. Patente. WO 1999033558.
79. M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, and C. Vigneron. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Release*. 50:31-40 (1998).
80. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*. 24:1113-1128 (1998).
81. H. Maeda. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzy Reg*. 41:189-207 (2001).
82. J. Liu, A.L. Levine, J.S. Mattoon, M. Yamaguchi, R.J. Lee, X. Pan, and T.J. Rosol. Nanoparticles as image enhancing agents for ultrasonography. *Phys Med Biol*. 51:2179-2189 (2006).
83. J. Liu, J. Li, T.J. Rosol, X. Pan, and J.L. Voorhees. Biodegradable nanoparticles for targeted ultrasound imaging of breast cancer cells *in vitro*. *Phys Med Biol*. 52:4739-4747 (2007).
84. N. Mendoza-Muñoz, E. Piñón-Segundo, A. Ganem-Quintanar, and D. Quintanar-Guerrero. Preparación y evaluación *in vitro* de nanopartículas poliméricas biodegradables como agente de contraste para ultrasonido. *TIP Rev Esp Cien Quím Biol*. 10:9-15 (2007).

85. E. Pisani, N. Tsapis, J. Paris, V. Nicolas, L. Cattel, and E. Fattal. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization. *Langmuir*. 22:4397-4402 (2006).
86. K. Kawabata, N. Sugita, H. Yoshikawa, T. Azuma, and S.-i. Umemura. Nanoparticles with multiple perfluorocarbons for controllable ultrasonically induced phase shifting. *Jpn J App Phys*. 44:4548-4552 (2005).
87. N. Rapoport, Z. Gao, and A. Kennedy. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 99:1095-1106 (2007).
88. M.A. Wheatley, F. Forsberg, N. Dube, M. Patel, and B.E. Oeffinger. Surfactant-stabilized contrast agent on the nanoscale for diagnostic ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol*. 32:83-93 (2006).
89. R. Cavalli, A. Bisazza, A. Rolfo, S. Balbis, D. Madonnaripa, I. Caniggia, and C. Guiot. Ultrasound-mediated oxygen delivery from chitosan nanobubbles. *Int J Pharm*. 378:215-217 (2009).
90. R. Cavalli, A. Bisazza, P. Giustetto, A. Civra, D. Lembo, G. Trotta, C. Guiot, and M. Trotta. Preparation and characterization of dextran nanobubbles for oxygen delivery. *Int J Pharm*. 381:160-165 (2009).
91. M.A.M. Wheatley, Lewandowski, J. (2009). Novel polymeric ultrasound contrast agent and methods of making thereof. Patente. US 20090028797.
92. J.L. Arias, V. Gallardo, F. Linares-Moliner, and A.V. Delgado. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J Colloid Interf Sci*. 299:599-607 (2006).
93. G.M. Lanza, K.D. Wallace, M.J. Scott, W.P. Cacheris, D.R. Abendschein, D.H. Christy, A.M. Sharkey, J.G. Miller, P.J. Gaffney, and S.A. Wickline. A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation*. 94:3334-3340 (1996).
94. S.C. Quay. (1996). Phase shift colloids as ultrasound contrast agents. Patente. US5707606.
95. S.A. Wickline, M. Hughes, F.C. Ngo, C.S. Hall, J.N. Marsh, P.A. Brown, J.S. Allen, M.D. McLean, M.J. Scott, R.W. Fuhrhop, and G.M. Lanza. Blood contrast enhancement with a novel, non-gaseous nanoparticle contrast agent. *Acad Radiol*. 9 Suppl 2:S290-293 (2002).

96. R. Díaz-López, N. Tsapis, M. Santin, S.L. Bridal, V. Nicolas, D. Jaillard, D. Libong, P. Chaminade, V. Marsaud, C. Vauthier, and E. Fattal. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials*. 31:1723-1731 (2010).
97. N.Y. Rapoport, A.L. Efros, D.A. Christensen, A.M. Kennedy, and K.H. Nam. Microbubble Generation in Phase-Shift Nanoemulsions used as Anticancer Drug Carriers. *Bubble Sci Eng Technol*. 1:31-39 (2009).
98. W. Cui, J. Bei, S. Wang, G. Zhi, Y. Zhao, X. Zhou, H. Zhang, and Y. Xu. Preparation and evaluation of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 73:171-178 (2005).
99. F. Forsberg, J.D. Lathia, D.A. Merton, J.B. Liu, N.T. Le, B.B. Goldberg, and M.A. Wheatley. Effect of shell type on the in vivo backscatter from polymer-encapsulated microbubbles. *Ultrasound Med Biol*. 30:1281-1287 (2004).
100. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker. Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int J Pharm*. 188:155-164 (1999).
101. P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin, and P. Speiser. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol*. 31:331-332 (1979).
102. M.D. Blanco and M.J. Alonso. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm*. 43:287-294 (1997).
103. T. Kyoung, J. Jin, D. Sung, and T. Gwan. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials*. 27:152-159.
104. J. Wu and J. Tong. Experimental study of stability of a contrast agent in an ultrasound field. *Ultrasound Med Biol*. 24:257-265 (1998).
105. E. Allémann, R. Gurny, and E. Doelker. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int J Pharm*. 87:247-253 (1992).
106. S. Galindo-Rodríguez, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm Res*. 21:1428-1439 (2004).

107. C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 385:113-142 (2010).
108. J. Molpeceres, M. Guzmán, M.R. Aberturas, M. Chacon, and L. Berges. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. *J Pharm Sci.* 85:206-213 (1996).
109. M. Beck-Broichsitter, E. Rytting, T. Lehardt, X. Wang, and T. Kissel. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the "ouzo region" upon drug loading. *Eur J Pharm Sci.* 41:244-253 (2010).
110. K.L. Peterson, A.G. MacLeod, E.R. Wisner, R.F. Larson, and R.E. Pollard. Quantitative assessment of blood volume, blood flow, and permeability of the brain of clinically normal dogs by use of dynamic contrast-enhanced computed tomography. *Am J Vet Res.* 69:45-50 (2008).
111. E. Piñón-Segundo, A. Ganem-Quintanar, V. Alonso-Pérez, and D. Quintanar-Guerrero. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int J Pharm.* 294:217-232 (2005).
112. E. Piñón-Segundo, A. Ganem-Quintanar, J. Rafael Garibay-Bermúdez, J. Juan Escobar-Chávez, M. López-Cervantes, and D. Quintanar-Guerrero. Preparation of nanoparticles by solvent displacement using a novel recirculation system. *Pharm Dev Technol.* 11:493-501 (2006).
113. D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, E. Doelker, and H. Fessi. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res.* 15:1056-1062 (1998).
114. D. Quintanar-Guerrero, D. Tamayo-Esquivel, A. Ganem-Quintanar, E. Allémann, and E. Doelker. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *Eur J Pharm Sci.* 26:211-218 (2005).
115. I.M. Rodríguez-Cruz, C.L. Domínguez-Delgado, J.J. Escobar-Chávez, G. Leyva-Gómez, A. Ganem-Quintanar, and D. Quintanar-Guerrero. Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery systems. *Int J Pharm.* 371:177-181 (2009).
116. I.D. Morrison and S. Ross. *Colloidal dispersions : suspensions, emulsions, and foams*, Wiley-Interscience, New York, 2002.
117. J.Y. Fang, C.F. Hung, S.C. Hua, and T.L. Hwang. Acoustically active perfluorocarbon nanoemulsions as drug delivery carriers for camptothecin: drug release and cytotoxicity against cancer cells. *Ultrasonics.* 49:39-46 (2009).

118. R. Díaz-López, N. Tsapis, and E. Fattal. Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and (19) F-MRI. *Pharm Res.* 27:1-16 (2010).
119. N. Mendoza-Muñoz. Preparación y evaluación *in vitro* de nanocápsulas de perfluoropentano como agente de contraste en ultrasonido. Informe de investigación. Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México. (2008).
120. E. Pisani, N. Tsapis, B. Galaz, M. Santin, R. Berti, N. Taulier, E. Kurtisovski, O. Lucidarme, M. Ourevitch, B.T. Doan, J.C. Beloeil, B. Gillet, V. Urbach, S.L. Bridal, and E. Fattal. Perfluorooctyl bromide polymeric capsules as dual contrast agents for ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Adv Func Mater.* 18:2963-2971 (2008).
121. R. Díaz-López, N. Tsapis, D. Libong, P. Chaminade, C. Connan, M.M. Chehimi, R. Berti, N. Taulier, W. Urbach, V. Nicolas, and E. Fattal. Phospholipid decoration of microcapsules containing perfluorooctyl bromide used as ultrasound contrast agents. *Biomaterials.* 30:1462-1472 (2009).
122. D.M. Santos-Pérez, L.A. Santos-Valderrábano, E.A. Camacho-Ortiz, D. Quintanar-Guerrero, A. Ganem-Quintanar, and N. Mendoza-Muñoz. Preparación y optimización de nanocápsulas poliméricas de perfluoropentano para su uso como agente de contraste. *Rev Mex Cienc Farm.* 43 Suppl 1:66-67 (2012).
123. S.A. Galindo-Rodríguez, F. Puel, S. Briançon, E. Allémann, E. Doelker, and H. Fessi. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *Eur J Pharm Sci.* 25:357-367 (2005).
124. M.L.T. Zweers, D.W. Grijpma, G.H.M. Engbers, and J. Feijen. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J Biomater Res B.* 66B:559-566 (2003).
125. A. Aserin. *Multiple emulsions : technology and applications*, John Wiley & Sons, 2008.
126. J. Liu, Z. Qiu, S. Wang, L. Zhou, and S. Zhang. A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced *in vitro* anti-tumor activity. *Biomed Mater.* 5:065002 (2010).
127. C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 385:113-142 (2010).

128. C. Vauthier, C. Schmidt, and P. Couvreur. Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation. *J Nanopart Res.* 1:411-418 (1999).
129. M.A. Wheatley, F. Forsberg, K. Oum, R. Ro, and D. El-Sherif. Comparison of *in vitro* and *in vivo* acoustic response of a novel 50:50 PLGA contrast agent. *Ultrasonics.* 44:360-367 (2006).
130. P. Nayaran. Development and characterization of hollow polymeric microcapsules for use as contrast agent for diagnostic ultrasound, Tesis, Doctor en Filosofía, Drexel University. (1999).

VIII. ANEXOS

1. Anexo 1. Tabla de las características brindadas por el proveedor de los transductores empleados para la determinación de la ecogenicidad *in vitro*.

Transductor	5.0 MHz	7.5 MHz	10.0 MHz
Modelo	V-309	V-320	V-311
Frecuencia central (MHz)	5.34	7.38	9.65
Frecuencia pico (MHz)	5.52	7.14	10.16
% de Ancho de banda (-6 dB)	83.61	56.68	62.49
Distancia de foco (cm)	5.08	5.08	5.08

2. Anexo 2. Diagrama del emisor-receptor y del osciloscopio y tablas de los parámetros de ajuste para la determinación de la ecogenicidad *in vitro*.

2.1. Diagrama del emisor receptor



2.2. Tabla de ajustes del emisor-receptor.

Parámetro	Valor
Modo	1 (T/R)
Filtro superior (HPF)	Out
Filtro inferior (LPF)	full BW
Frecuencia de repetición del pulso (PRF)	100Hz
Energía	1
Amortiguación	3 (50Ω)
Ganancia	+ 40 dB

2.3. Diagrama del osciloscopio

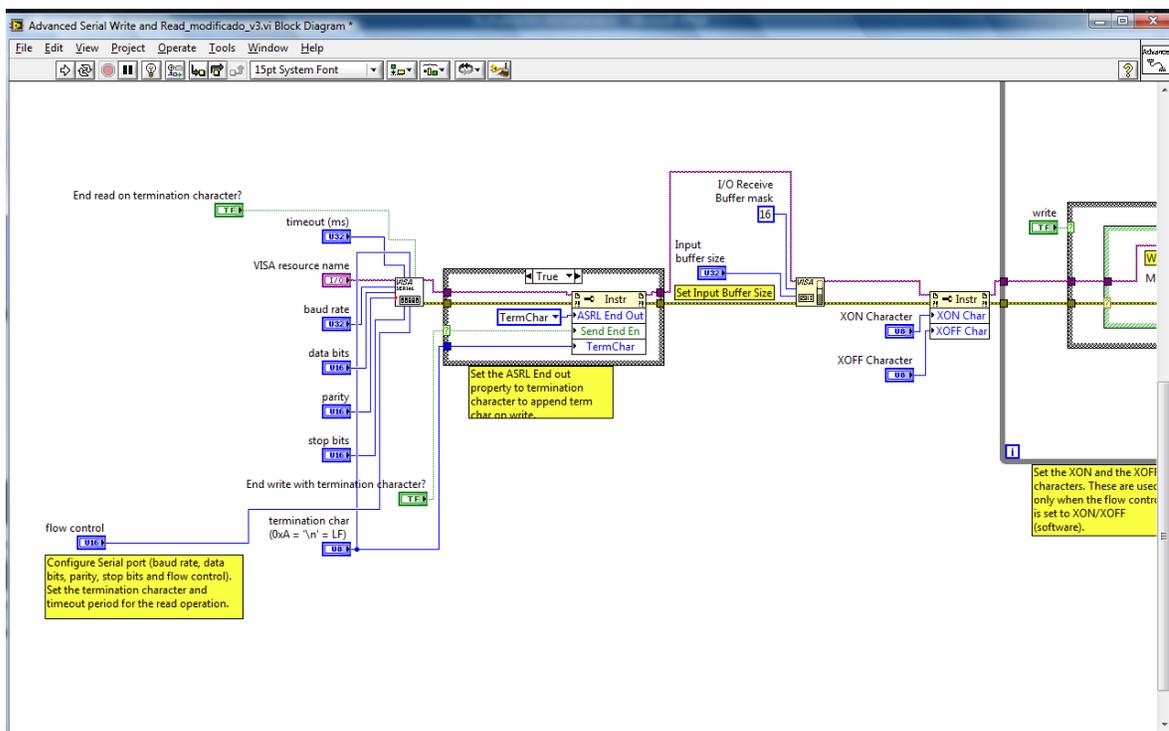


2.4. Tabla de ajustes del osciloscopio

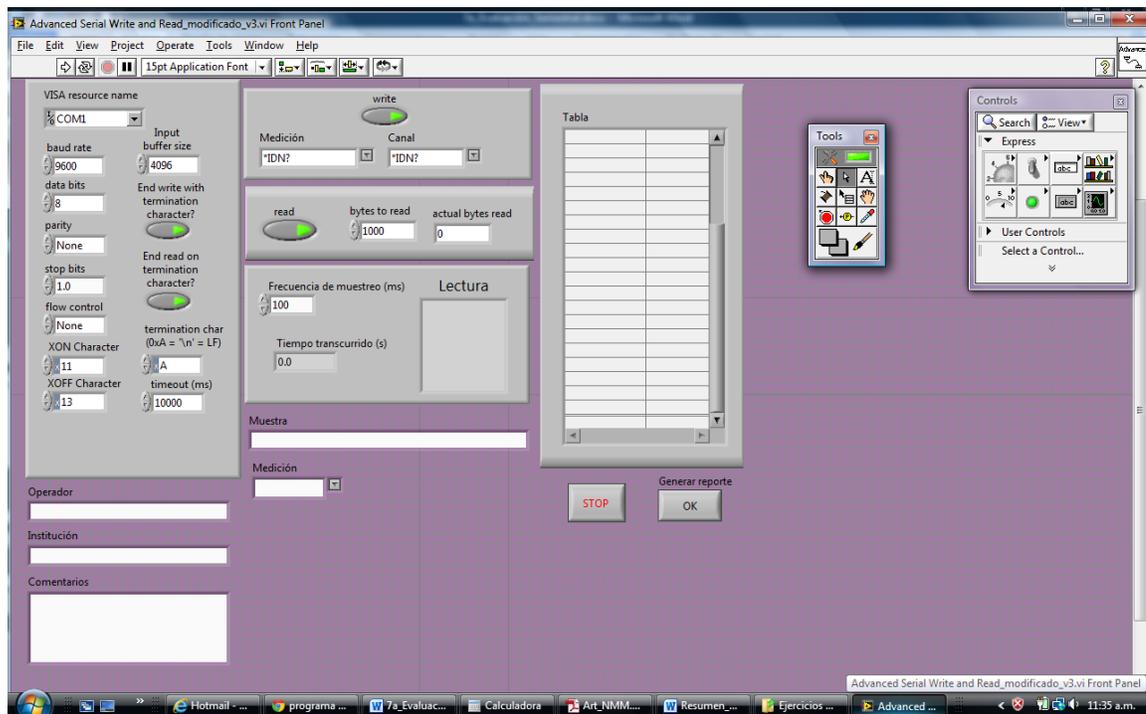
Canal	Valor	Dominio Tiempo	Valor	Trigger	Valor
Volt/Div	100 mV	División	1.000 μ s	Método	Márgen
Límite ancho de banda	OFF	Retraso	67.000 μ s	Pendiente	Incremento
		Formato	Y-T	Acoplamiento	DC
				Nivel	1.00 div
				Sensibilidad	1.00 div
				Espera	1.00 μ s

3. Anexo 3. Diseño del programa para la captura de datos para la determinación de la ecogenicidad *in vitro*.

3.1. Diagrama de conexiones del programa diseñado en LabView para la captura de datos.



3.2. Salida de pantalla del programa diseñado en LabView para la captura de datos.



4. Anexo 4. Análisis Estadístico

4.1. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación del efecto de la velocidad y tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas “llenas” de aire preparadas con acetato de etilo. Resumen de las tablas dadas por el programa SigmaPlot 11.0

Resumen del ANOVA de dos factores para la determinación del efecto de la velocidad y el tiempo de agitación en la preparación de las nanocápsulas “llenas” de aire empleando acetato de etilo.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
Velocidad	1	1354.7	1354.7	2.7	0.14
Tiempo	1	3971.2	3971.2	8.0	0.02
Velocidad por Tiempo	1	664.5	664.5	1.3	0.28
Residual	8	3950.6	493.82		
Total	11	9941.1	903.7		

GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Media de los cuadrados; F: Valor de F; P: Probabilidad

4.2. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación del efecto de la velocidad y tipo de agitación sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas “llenas” de aire preparadas con acetato de etilo. Resumen de las tablas dadas por el programa SigmaPlot 11.0

Resumen del ANOVA de dos factores para la determinación del efecto del tipo y el tiempo de agitación en la preparación de las nanocápsulas “llenas” de aire empleando acetato de etilo.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
Tipo	1	7183.4	7183.4	18.7	0.01
Tiempo	1	1102.1	1102.1	2.9	0.13
Tipo x Tiempo	1	16.3	16.3	0.04	0.84
Residual	8	3071.9	383.9		
Total	11	11373.8	1033.9		

GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Media de los cuadrados; F: Valor de F; P: Probabilidad

4.3. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación de la ecogenicidad *in vitro* para las sistemas NEPLGA, NCO; NE y NEPFC a 5 MHz. Resumen de las tablas dadas por el programa SigmaPlot 11.0

4.3.1. Resumen del ANOVA de dos factores para la determinación del efecto de la concentración y el tipo de sistema nanoparticulado sobre la ecogenicidad *in vitro* a 5 MHz.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
Concentración	10	326.8	32.7	57.6	<0.001
Sistema	4	3205.3	801.3	1412.1	<0.001
Concentración x Sistema	40	390.8	9.8	17.2	<0.001
Residual	110	62.4	0.6		
Total	164	3985.4	24.3		

GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Media de los cuadrados; F: Valor de F; P: Probabilidad

4.3.2. Comparación de Tukey entre cada uno de los sistemas

Comparación	Diferencia de cuadrados	Probabilidad
Aire vs. NE	11.3	<0.001
Aire vs. NCO	11.2	<0.001
Aire vs. NEPFC	11.3	<0.001
Aire vs. NEO	10.3	<0.001
NEO vs. NE	0.9	<0.001
NEO vs. NCO	0.9	<0.001
NEO vs. NEPFC	0.9	<0.001
NEPFC vs. NE	0.1	0.985
NEPFC vs. NCO	0.06	0.998
NCO vs. NE	0.04	1.000

4.4. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación de la ecogenicidad *in vitro* para las nanocápsulas llenas de aire a 5.0, 7.5 y 10.0 MHz. Resumen de las tablas obtenidas por el programa SigmaPlot 11.0

4.4.1. Resumen del ANOVA de dos factores para la determinación del efecto de la concentración de las nanocápsulas “llenas” de aire y el porcentaje de BCA sobre la ecogenicidad *in vitro* a 10 MHz.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
Concentración	9	125.9	13.987	122.8	<0.001
Frecuencia	2	2262.1	1131.1	0.4	0.69
Concentración por Frecuencia	18	102.8	5.7	1.3	0.24
Residual	60	43.3	0.7		
Total	89	2534.1	28.5		

GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Media de los cuadrados; F: Valor de F; P: Probabilidad

4.4.2. Comparación de Tukey entre cada una de las frecuencias

Comparación	Diferencia de cuadrados	Probabilidad
10MHz vs. 5.0 MHz	11.5	<0.001
10MHz vs. 7.5 MHz	9.4	<0.001
7.5 MHz vs. 5.0 MHz	2.1	<0.001

4.5. ANOVA de dos factores efectuado para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación del efecto de la concentración del BCA sobre la ecogenicidad *in vitro* para las nanocápsulas llenas de aire a 10.0 MHz. Resumen de las tablas obtenidas por el programa SigmaPlot 11.0

Resumen del ANOVA de dos factores para la determinación del efecto de la concentración de las nanocápsulas “llenas” de aire y el porcentaje de BCA sobre la ecogenicidad in vitro a 10 MHz.

Fuente de variación	GL	SC	MC	F	P
Concentración	10	2039.7	203.9	122.8	<0.001
Porcentaje	2	1.2	0.6	0.4	0.69
Concentración por Porcentaje	20	41.9	2.1	1.3	0.24
Residual	66	109.6	1.7		
Total	98	2192.4	22.4		

GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Media de los cuadrados; F: Valor de F; P: Probabilidad

5. Anexo 5. Publicaciones

Ultrasonics 51 (2011) 839–845



Contents lists available at ScienceDirect

Ultrasonics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ultrasPreparation and *in vitro* evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imagingMendoza-Muñoz Néstor^a, Noriega-Peláez Eddy Kei^a, Nava-Arzaluz María Guadalupe^a,
Mendoza-Elvira Susana Elisa^b, Ganem-Quintanar Adriana^a, Quintanar-Guerrero David^{a,*}^aLaboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, México C.P. 55740, Mexico^bFacultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, México C.P. 55740, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2011

Received in revised form 13 April 2011

Accepted 20 April 2011

Available online 29 April 2011

Keywords:

Nanocapsules

Nanospheres

Contrast agents

Ultrasound imaging

in vitro echogenicity

ABSTRACT

The aim of this study was to prepare air-filled nanocapsules intended ultrasound contrast agents (UCAs) with a biodegradable polymeric shell composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA). Because of their size, current commercial UCAs are not capable of penetrating the irregular vasculature that feeds growing tumors. The new generation of UCAs should be designed on the nanoscale to enhance tumor detection, in addition, the polymeric shell in contrast with monomolecular stabilized UCAs improves the mechanical properties against ultrasound pressure and lack of stability. The preparation method of air-filled nanocapsules was based on a modification of the double-emulsion solvent evaporation technique. Air-filled nanocapsules with a mean diameter of 370 ± 96 nm were obtained. Electronic microscopies revealed spherical-shaped particles with smooth surfaces and a capsular morphology, with a shell thickness of ~ 50 nm. Air-filled nanocapsules showed echogenic power *in vitro*, providing an enhancement of up to 15 dB at a concentration of 0.045 mg/mL at a frequency of 10 MHz. Loss of signal for air-filled nanocapsules was 2 dB after 30 min, suggesting high stability. The prepared contrast agent in this work has the potential to be used in ultrasound imaging.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

After the study published by Gramiak and Shah [1], ultrasound contrast agents (UCAs) have experienced several improvements aimed at achieving longevity, sensitivity, and specificity. Nowadays, microbubbles are the most widely studied and the most common type of UCAs available in the market; they consist of air or gas bubbles with a size between 3 and 10 μm , encapsulated either within phospholipids [2,3] or within polymers [4–7]. Microbubble size is one of the most important characteristics that should be controlled when designing an UCA, due to its association with the scattering cross section (SCS). The SCS is a parameter that represents the effective scattering area in a particle, and it should be maximized to increase the echogenic power of an UCA. The SCS is related to the sixth power of the radius, the higher the radius of the bubble, the higher the scattering cross section [8]. Paradox-

ically, the major drawback of microbubbles is associated with their size, because sometimes they are not able to penetrate and detect tumors efficiently. Studies have demonstrated the hyperpermeability of the endothelium in tumor microvessels due to the existence of pores, and measurements have shown that the cutoff size of endothelial pores is between 400 and 600 nm [9]; consequently, microbubble penetration into active tumors and rear ultrasound detection are difficult.

Recently, nanoscale UCAs have been presented as an attractive alternative to improve tumor detection because of their ability to cross the endothelium. This feature is interesting in both imagiological and therapeutic aspects, because if an antineoplastic agent is included into nanoscale UCAs, these could also be used as drug delivery systems and their therapeutic effect would be potentiated by the well-known enhanced permeation and retention effect (EPR) [10].

In the past decade, few studies have been published related to the preparation and evaluation of nanoscale UCAs: solid nanoparticles, liquid-core nanoagents, and gaseous-core nanoagents, some representative examples are mentioned after. Solid nanoparticles from materials such as silica, polystyrene, and polylactic acid (PLA) were tested by Liu et al. [11,12], PLA nanospheres targeted to tumoral cells (SkBr3) had an *in vitro* increment of 22% of the average gray value at a high frequency of insonification

* Corresponding author. Address: Bolognia 4 #28, Bosques del Lago, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54766, Mexico. Tel./fax: +52 55 56 23 20 65.

E-mail addresses: nestormm05@hotmail.com (M.-M. Néstor), eddynoriega@hotmail.com (N.-P.E. Kei), lupita.navaarzaluz@yahoo.com.mx (N.-A.M. Guadalupe), seme_6@yahoo.com (M.-E.S. Elisa), ganemq@hotmail.com (G.-Q. Adriana), quinta.na@servidor.unam.mx (Q.-G. David).

(30–55 MHz). We have previously reported the *in vitro* echogenic power of nanospheres composed of PLGA; the average gray value was increased 16%, evaluated with a commercial ultrasonic system (3.5 MHz) [13]. Liquid-core nanoagents have also been evaluated as UCAs. Liquid perfluorocarbons (PFCs), such as perfluoropentane (PFP), perfluorohexane (PFH), perfluorodecalin (PFD), and perfluorooctyl bromide (PFOB) are preferably used as core materials due to their low solubility and high density [14]. One of the most widely studied PFCs is PFP because of its boiling point below 37 °C; when it is inside the body, it suffers a phase shift, which results in a change in size from nanobubbles to microbubbles [15]. However, bubble coalescence, together with this uncontrollable enlargement, increases the risk of adverse effects. Although the liquid-core has improved the mechanical resistance and lifetime of UCAs, poor echogenicity due to low compressibility and the use of high frequencies of insonification above 15 MHz are their major drawbacks. On the other hand, the inclusion of gas into UCAs has increased the scattering power, resulting in a high echogenicity due to the high compressibility and the low density of the gases. Oeffinger and Wheatley [16] reported the preparation of nanobubbles including a gaseous PFC (octafluoropropane) as core material and stabilized by a surfactant monolayer. Recently, Wang et al. [17] developed liposomal sulfur hexafluoride (SF₆)-filled nanobubbles with good response both *in vitro* and *in vivo*. Polymer-shelled nanoscale UCAs, including nitrogen, were tested by Bloch et al. [18] also Wheatley and Lewandowski reported the preparation of polymeric shell nanobubbles by the salting-out method [19]. Polymer-shelled UCAs have the advantage of providing a better stability compared to UCAs with surfactant or lipid shells due to the elastic properties of polymers [6,20].

The objective in this paper was to study three systems: (a) nanospheres, (b) oil-filled nanocapsules, and (c) air-filled nanocapsules as models of solid, liquid, and gas core nanoscale UCAs, evaluating their echogenic power. At the moment has was mentioned above few work has been intentioned to prepare polymeric-shell nanoscale ultrasound contrast agents. The procedure for the preparation of air-filled nanocapsules has not been previously reported. Our proposal is based on the process of adding hydrophilic actives to nanocapsules by the double-emulsion solvent evaporation method [21,22], with subsequent emulsification of an aqueous solution of ammonium bicarbonate (ABC) into a partial water-soluble organic solution containing the polymer. This water-in-oil (w/o) emulsion is then dispersed in an external aqueous phase with a stabilizer; as a result, a double water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion is formed. Finally, the organic solvent is directly removed under reduced pressure through the colloidal dispersion formed. The introduction of a gas-generating agent, such as ABC, allows the obtainment of gas-core nanocapsules, and then, when nanocapsules are lyophilized, the gases are removed and replaced with air at atmospheric pressure.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly(D,L-lactide-co-glycolide, 50:50) (PLGA; Lakeshore, Germany). Poly(vinyl alcohol) (PVAL; Mowiol[®]4-88, Mw: 26000; Glomarza, Mexico). Ammonium bicarbonate powder (ABC) and ethyl acetate (EtAc) of analytical grade were purchased from Fermont (Monterrey, Mexico). Sorbitan sesquioleate (SS), sucrose and Percoll[®] were obtained from Sigma (St. Louis, USA). Density Marker Beads[®] (Pharmacia LKB, Sweden). Propylene Glycol Dicaprylate/Dicaprate (Captex[®] 200, Watson Phillips, Mexico). Deionized water was obtained from Elix 5[®] system (Millipore, USA). All the other chemicals were at least of analytical grade.

2.2. Nanoparticle preparation methods

2.2.1. Air-filled nanocapsules preparation method

Air-filled nanocapsules were prepared by a modified double-emulsion solvent evaporation method [21]. Briefly, 1 mL of an ABC solution (3% w/v) was emulsified into 4 mL of AcEt previously saturated with water and containing 50 mg of PLGA and 0.1 mg of SS. This w₁/o emulsion was made using a high-speed stirrer (Ultraturrax[®] T25, IKA, USA) at 11,000 rpm for 5 min. Twenty-five millilitre of PVAL (2% w/v) EtAc-saturated aqueous solution were then poured into the primary emulsion and stirred at 11,000 rpm for 3 min to form the w₁/o/w₂ emulsion. The double emulsion was directly placed into the rotavapor at 70 mm Hg, 30 rpm, and 30 °C until the complete extraction of the organic solvent. The nanocapsules formed were washed three times by ultracentrifugation (Optima[®] LE-80 K, Beckman, USA) at 38,100g for 30 min, only the supernatant was collected. The final suspension was frozen after the addition of bulk agents at –40 °C and lyophilized for 24 h at <100 μbar (FreeZone[®] 6, Labconco, USA).

2.2.2. Nanospheres and oil-filled nanocapsules preparation method

Oil-filled nanocapsules were prepared using the emulsification-diffusion technique involving the direct displacement of the solvent by distillation [23]. The organic solvent (EtAc) and water were mutually saturated for 1 min before use, in order to ensure the initial equilibrium of both liquids. Typically, 100 mg of PLGA and 250 μL of Captex[®] 200 were dissolved in 10 mL of water-saturated organic solvent, and this organic solution was emulsified with 20 mL of an organic solvent-saturated aqueous solution of PVAL (5%, w/v) using a high-speed stirrer (Ultraturrax[®] T25, IKA, USA) at 11,000 rpm for 10 min. The oil-in water emulsion formed was directly placed into the rotavapor at 70 mm Hg, 30 rpm, and 30 °C until the complete extraction of the organic solvent. Nanospheres were prepared by the same procedure, but without the addition of Captex[®] 200. All batches were washed three times by ultracentrifugation, and the final suspension was frozen at –40 °C and lyophilized for 24 h at <100 μbar.

2.3. Nanoparticle characterization

2.3.1. Particle size analysis

The average size and the polydispersity index of the nanoparticles were determined by the laser light scattering technique (Coulter N4 Plus, USA). The laser light wavelength was 678 nm (He/Ne 10 mW). Measurements were obtained at a 90° fixed-angle for 180 s, at a temperature of 25 °C. Measurements were made in triplicate for all batches prepared.

2.3.2. Nanocapsule density determination

Density was determined by isopycnic separation using a colloidal silica gradient, in order to verify the encapsulation of the material. Dispersions were concentrated and 0.5 mL were added to 7 mL of Percoll[®] 45% (v/v) diluted with 0.15 M NaCl. The gradient was generated *in situ* by ultracentrifugation at 6182g for 3 h, at 4 °C in a 25° angle head rotor (90 Ti, Beckman, USA). The density markers were used and treated identically as the sample dispersion. At the end of the process, the position of the sample band was compared with the markers' position.

2.3.3. Scanning electron microscopy (SEM)

The surface morphology of nanoparticles was observed. The nanoparticle dispersion was spread over a slab and dried at room temperature. The samples were coated with a thick gold layer (~20 nm) (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, JEOL, Japan) and analyzed by SEM using a JSM-25 S II scanning electron microscope (JEOL, Japan).

2.3.4. Transmission electron microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy was performed using a JEM-CX100 transmission electron microscope (JEOL, Japan). The nanocapsule suspension was dropped onto a formvar film-coated copper grid for 2 min. The excess solution was removed using filter paper and the grids were air-dried prior to observation.

2.4. *In vitro* echogenicity measurement

An *in vitro* A-mode ultrasound device (Fig. 1), similar to that described by El-Sherif and Wheatley [5], was constructed in order to determine the *in vitro* echogenicity. The pulsed-echo system consists of a single-element, spherically focused transducer (diameter = 1.27 cm, focus = 5.08 cm) (Panametrics, Olympus NDT, USA) immersed in a tank filled with degassed and deionized water at 37 °C. The center frequency of the transducers was 5 and 10 MHz, the –6 dB bandwidth of 62% and 84% respectively, the pulse length was calculated as 0.75 mm and 1.2 mm respectively. The transducer was focused on the center of the sample container (2.54 × 2.54 × 10 cm, width × length × height), fitted with an acoustic window. A pulser-receiver (Panametrics 5072, Olympus NDT, USA) was used to excite the transducer (PRF = 100 Hz, Energy level: ~13 J, Damping level: 50 Ω). The backscatter signal was received by the same transducer and was amplified to 40 dB by the pulser-receiver. The signal was detected by a digital oscilloscope (Mod. DS1102CD, Rigol, China) and finally, the waveforms obtained were stored and then analyzed with the provided software (Ultrascope ver. 00.01.04, Rigol, China).

2.4.1. Dose–response curve

Cumulative dose–response curves were constructed to determine the echogenicity of air-filled nanocapsules, oil-filled nanocapsules, and nanospheres. The sample container was filled with 40 mL of degassed water and temperature was allowed to reach 37 °C. Lyophilized nanoparticles were reconstituted with deionized water at a final concentration of 3 mg/mL, and 0.1 mL of this stock dispersion were subsequently injected into the sample container and magnetically stirred; ten waveforms were captured after 15 s to ensure the homogeneous distribution of the agent, were sampled and finally stored in the oscilloscope memory. The procedure was repeated until 1 mL of the nanoparticle dispersion was added. Response was defined as signal enhancement (SE) and was determined by measuring the root mean square voltage of the captured waveforms. The SE was calculated by comparing the ultrasound wave intensities with and without sample, according with the Eq. (1) [24].

$$SE(\text{dB}) = 20 \log(V_{\text{rms,with agent}}/V_{\text{rms,without agent}}) \quad (1)$$

the SE value for each concentration were based on an average of the ten waveforms from three different readings each from five different batches.

2.4.2. Time-dependent response

The ability of air-filled nanocapsules to sustain the response over time was measured as an indicator of the agent stability. A known quantity of air-filled nanocapsules was injected into the sample container to achieve a concentration of 0.045 mg/mL then the SE was measured after 15 s (zero time). The study was followed for 30 min repeating the measurements every 5 min.

3. Results and discussion

3.1. Nanoparticle preparation and characterization

ABC has been used as gas producer and, consequently, as pore-generating agent in the preparation of new drug delivery systems, including the development of microbubbles [5,25,26]. Aqueous solutions of ABC release carbon dioxide and ammonia, which have the ability to produce holes or pores in the polymeric matrix. In this work, we prepared the air-filled nanocapsules through the double-emulsion solvent evaporation method when ABC was in the aqueous phase of the primary emulsion. We realized that when ABC was not incorporated into the primary emulsion, only nanospheres were recovered from the sediment before the first ultracentrifugation. Conversely, when ABC was used, two kinds of nanoparticles were observed, ones that floated on the top of the tube, suggesting gas (carbon dioxide) encapsulation, and ones that formed a sediment constituted of nanospheres. The carbon dioxide-filled nanocapsules were recovered and lyophilized, the carbon dioxide was finally replaced by air at atmospheric pressure, obtaining the air-filled nanocapsules. Table 1 shows the mean diameter, polydispersity index and the densities (experimental and theoretical) of air-filled nanocapsules, nanospheres, and oil-filled nanocapsules, the last two prepared by the emulsification-diffusion technique. All mean diameters were in the nanoscale range. There is a clear difference between the nanocapsules (both air- and oil-filled) and the nanospheres; in general, this behavior was attributed to the volume of the encapsulated material, which increases the mean diameter of the nanocapsule. Fig. 2 shows the size distribution of air-filled nanocapsules, in general an unimodal and width distribution was observed.

The density studies showed that oil-filled nanocapsules had a density intermediate between the theoretical density of PLGA (1.29 g/cm³) and the oil (0.94 g/cm³), this confirm the encapsulation of the oil. Besides, the density of nanospheres was found between 1.24 and 1.30 g/cm³. This was similar to that reported

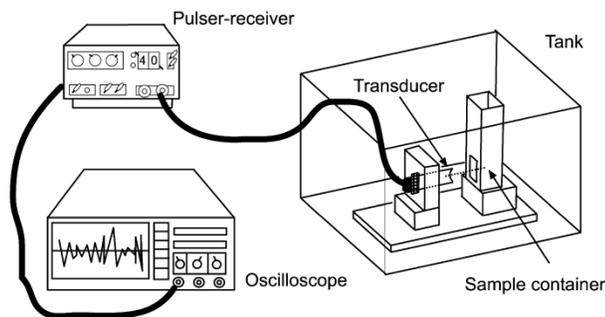


Fig. 1. Mode-A ultrasound setup used for the *in vitro* echogenicity measurements.

Table 1
Mean diameter, polydispersity index and densities for the three nanoparticulate systems.

System	Mean diameter ^a (nm ± σ)	Polydispersity index (PI) ^b	Experimental density (g/cm ³)	Theoretical density (g/cm ³)
Nanospheres	212 ± 3	0.11	1.24–1.30 ^c	1.29
Oil-filled nanocapsules	350 ± 27	0.18	1.04 ^d	1.06
Air-filled nanocapsules	370 ± 12	0.23	n.d. ^e	0.45

^a σ = standard deviation from three measurements ($n = 3$).

^b Coefficient of variation of the distribution = $1/\sqrt{[(1/2 \cdot PI)] + 4}$.

^c Determined in a sucrose gradient.

^d Determined in a colloidal silica gradient.

^e n.d. = not determined, the value was out the calibration curve.

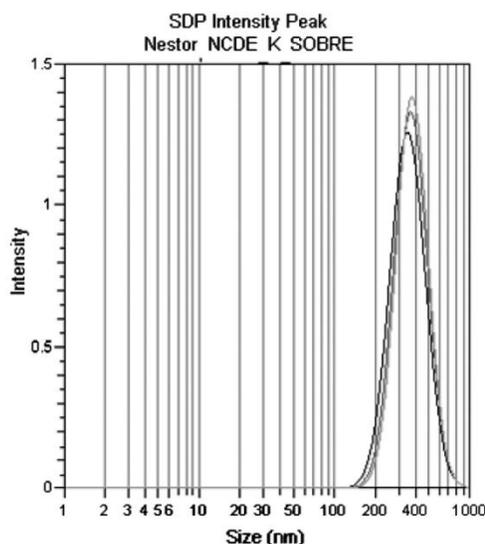


Fig. 2. Size distribution of air-filled nanocapsules determined by laser light scattering. The graph shows a monomodal and narrow size distribution where the air-filled nanocapsules were less than 1 μm .

in the study by Vauthier et al. [27], where the density of PLGA 50:50 nanospheres was above 1.28 g/cm³. Experimental density of air-filled nanocapsules was not determined because were out of the calibration density range (1.018–1.138 g/cm³). The theoretical density of the nanoparticulate systems was calculated considering the densities of the compositing materials and a shell thickness of 50 nm for nanocapsules according to the determined from TEM micrographics.

The capsular structure of air-filled nanocapsules was studied by electronic microscopies. The examination of air-filled nanocapsules by SEM revealed spherical particles with smooth surfaces (Fig. 3A), and also, nanocapsules that were not completely formed were observed as a result of the formation mechanism (Fig. 3B). TEM revealed the typical core–shell structure of air-filled nanocapsules (Fig. 4A), where the core appears darker while the air core is gray because of the difference in electronic density, since in SEM, the incomplete formation of nanocapsules was elucidated. In contrast, nanospheres were observed as well-defined homogeneous darker structures (Fig. 4B). However, the size was apparently bigger than the determined by laser light scattering.

The mechanism of formation of air-filled nanocapsules (Fig. 5) may be explained by the solvent diffusion–evaporation from the organic phase to the external aqueous phase (w_2), which results

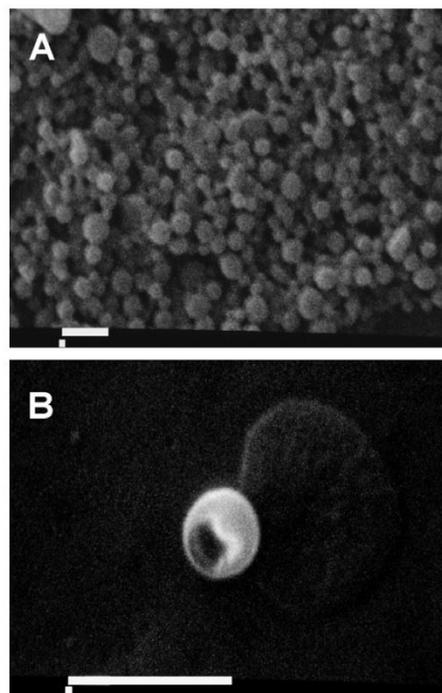


Fig. 3. Scanning electron micrographs of air-filled nanocapsules: (A) completely formed shelled particles and (B) incompletely formed shelled particles (bar = 1 μm).

in the formation of nanoparticles and in the gas-generating reaction of the ABC encapsulated in the nanocapsules. Probably, nanodroplets of the ABC-containing internal aqueous phase are carried to the external aqueous phase during the organic solvent diffusion. These nanodroplets are surrounded by a polymer layer and by the remaining organic solvent, which act as a barrier preventing the penetration of the external aqueous phase [28]. Then, the polymer aggregates around the aqueous nanodroplets, forming the nanocapsules with a hydrophilic core [29]. The encapsulated ABC undergoes hydrolysis and produces carbon dioxide inside the nanocapsule; sometimes, an extra inner pressure can be released, resulting in incomplete nanocapsules with pores. When nanocapsules are freeze-dried, water and residual ABC are sublimated, giving rise to hollow nanocapsules. Finally, air fills the hollow at atmospheric pressure [6]. During the process, not all of the internal aqueous phase is encapsulated into nanocapsules; migration of the internal aqueous phase to the external aqueous phase, or polymer aggregation may occur, and, as a result, nanospheres are obtained.

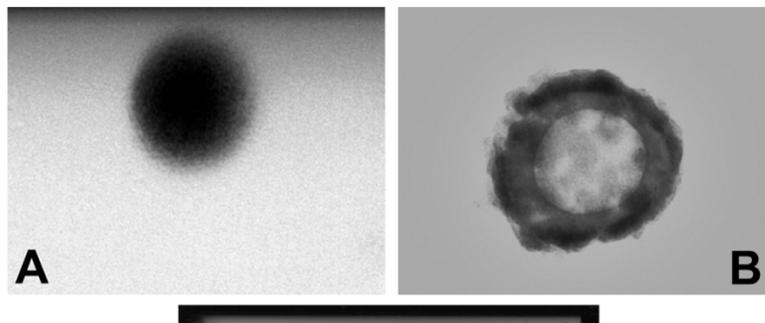


Fig. 4. Transmission electron micrographs of PLGA nanospheres (A) and air-filled nanocapsules (B) in the last one, the typical capsular structure is visualized, where the polymeric shell appears darker (bar = 1 μm).

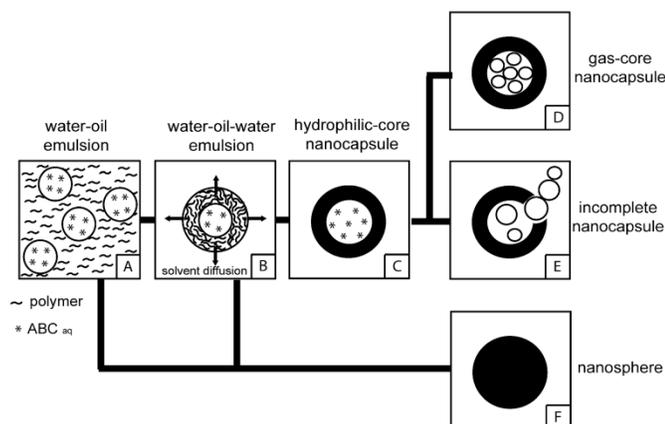


Fig. 5. Schematic representation of the suggested mechanism of formation of air-filled nanocapsules by the double emulsion–solvent evaporation method.

3.2. *In vitro* echogenicity measurement

Fig. 6 shows the *in vitro* acoustic backscatter of the three nanoparticulate preparations. The formulations were tested in order to compare the echogenic properties as a result of the core and structural architecture. Nanospheres and oil-core nanocapsules exhibited a similar behavior, with a maximum enhancement of 3.9 dB for nanospheres and 2.5 dB for oil-core nanocapsules, both at a concentration of 0.03 mg/mL and at the insonification frequency of 10 MHz. No statistically significant difference was demonstrated by the one-way ANOVA analysis between nanospheres and oil-core nanocapsules ($p = 0.86$, $\alpha = 0.05$), and both signal increases were not clinically relevant (20–30 dB). In contrast, air-filled nanocapsules had the appropriate structural architecture to be echogenic, they yielded a maximum acoustic enhancement of 15.4 dB at a concentration of 0.045 mg/mL at a frequency of 10 MHz. On the other hand, the enhancement of air-filled nanocapsules at 5 MHz was only 4 dB, this value was similar to the obtained with nanospheres and oil-core nanocapsules. As shown in Fig. 7, air-filled nanocapsules had a good stability, the signal enhancement produced was sustained for 30 min (a sufficient time to complete a study in the clinical practice) at a frequency of 10 MHz, only 2 dB of abatement was observed, the last is associated with the poly-

meric shell that provides good mechanical strength and elasticity to withstand ultrasound-induced pressure changes [6,20].

Strictly, the *in vitro* enhancement of air-filled nanocapsules at 10 MHz are out to be clinically relevant however it could be detectable by the medical ultrasound equipment [24]. Considering the intravenous injection of the agent, for *in vivo* studies could be necessary a dose between 3 and 4 mg/kg to achieve the same *in vitro* concentration, moreover it is necessary to consider that the possible accumulation by passive or active targeting of the air-filled nanocapsules would increase the concentration in the organ or tissue and consequently lowering the effective dose. In this study, air-filled nanocapsules without any coating were proposed therefore uptake by the reticulo-endothelial system (RES) would be easy, it could provoke the accumulation in liver or spleen by passive targeting as was described for other nanoparticulate systems, these phenomenon would be used for diagnosis in specific organs, Wang et al. [17] demonstrated the ultrasonic detection in liver of nanobubbles without any coating. Protection against clearance using PEG or poloxamers could be easily implemented in the air-filled nanocapsules described in this work in order to improve the EPR effect.

We attribute the echogenic power of air-filled nanocapsules to their low density. As it was previously mentioned, the SCS

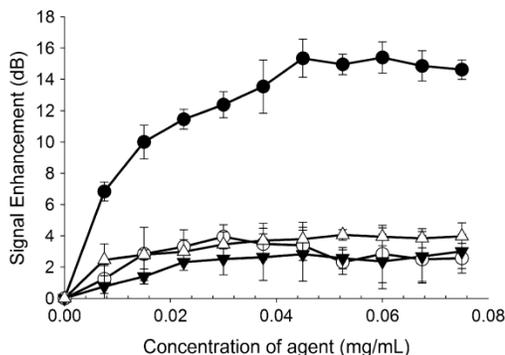


Fig. 6. Dose–response curves of the three nanoparticulate systems; air-filled nanocapsules at 10 MHz (●), air-filled nanocapsules at 5 MHz (Δ), oil-filled nanocapsules (○), PLGA nanospheres (▼), $n = 5$, error bars represent the standard deviation from the mean.

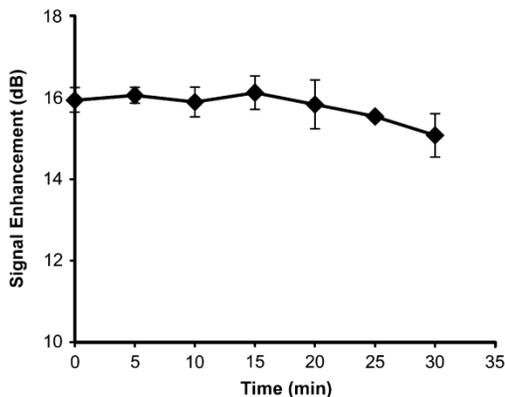


Fig. 7. Loss of signal enhancement with respect to time for air-filled nanocapsules at concentration of 0.045 mg/mL of agent. $n = 5$, error bars represent the standard deviation from the mean.

determines the echogenic power of a scatter, besides the radius and the wavenumber, the compressibility and density of the scatter play an important role, as can be evidenced by the Born approximation (Eq. (2)) [8]:

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

where σ is the SCS, k is the wave number, r is the radius, κ and ρ are the compressibility and density, respectively, of the scatter (subscript s) and the surrounding medium. In this context, the SCS of air-filled nanocapsules is expected to be greater than that of nanospheres and oil-core nanocapsules, first, because of the differences in density, and second, due to compressibility. The density term in Eq. (1) for air-core nanocapsules is 450-fold and 13-fold compared with oil-core nanocapsules and nanospheres, respectively. In addition, the compressibility of nanospheres and oil-core nanocapsules is obviously lower than that of air-filled nanocapsules as a result of the core material composition. Due to the differences in density, the number of particles was not the same in the inson-

ated dispersions, the approximately number of particles at a concentration of 0.045 mg/mL was 1.5×10^{11} , 7.5×10^{10} and 3.5×10^{10} for air-filled nanocapsules, oil-filled nanocapsules and nanospheres, respectively; this situation seems did not play an important role in the enhancement.

The difference in the enhancement of air-filled nanocapsules because the frequency, could be explained due to the behavior of air-filled nanocapsules as harmonic oscillator, is well known that bubbles can act as structures in resonance if are insonated at the correct frequency originating the increment of SCS. Considering the average size of air-filled nanocapsules the resonance frequency should be nearby 15 MHz, this frequency is covering by the transducer of 10 MHz due to the bandwidth but not by the transducer of 5 MHz, the overlap of the bandwidth of both transducer is in the frequencies below 10 MHz. The last explain why low enhancement is observed at 5 MHz in contrast with 10 MHz. We decide explore these two frequencies because cover the range of the most used in medical ultrasonography. We hope a response of air-filled nanocapsules clinically relevant by the partial or total covering of the resonance frequency with these transducers. Future work will investigate the enhancement with transducers at frequencies above 10 MHz and determine the resonance frequency of the air-filled nanocapsules.

4. Conclusions

The present study has shown the feasibility of preparing air-filled nanocapsules from a modification of the double-emulsion solvent evaporation method. The ABC included in the aqueous core nanocapsules formed allowed the generation of gas and the obtainment of air-filled nanocapsules after the lyophilization process. Air-filled nanocapsules were echogenic, which significantly increased the backscatter signal. In contrast, oil-filled nanocapsules and nanospheres showed a low enhancement, and the echogenic power was attributable to the low density of air-filled nanocapsules. Minimal signal loss with respect to time was found, indicating that the polymeric shell provides excellent elasticity and resistance to ultrasound-induced pressure changes. The potential of these nanoscale UCAs in diagnosis has been demonstrated, however, drug entrapment in the polymeric shell is also possible and it might increase the application of this structures as a “theranostics” agents. Thus, the effect of parameters like temperature, phase proportions, or polymer concentration during preparation of the air-filled nanocapsules and their repercussions in echogenicity, as well as the possibility of antineoplastic drug entrapment and protection against clearance by RES (“stealth” nanocapsules) should be tested. Additionally, further studies will aim to determine the *in vivo* behavior in experimental animals.

Acknowledgements

The authors appreciate the technical assistance from Mr. Rodolfo Robles and Mr. Jesús Espinosa in the SEM and TEM experiments, respectively. Néstor Mendoza-Muñoz acknowledges a grant from CONACYT, Mexico (Ref. 177414).

References

- [1] R. Gramiak, P.M. Shah, Echocardiography of the aortic root, *Invest. Radiol.* 3 (5) (1968) 356–366.
- [2] M.J. Hasik, D.H. Kim, L.E. Howle, D. Needham, D.P. Prush, Evaluation of synthetic phospholipid ultrasound contrast agents, *Ultrasonics* 40 (9) (2002) 973–982.
- [3] Y.Z. Zhao, H.D. Liang, X.G. Mei, M. Halliwell, Preparation, characterization and *in vivo* observation of phospholipid-based gas-filled microbubbles containing hirudin, *Ultrasound Med. Biol.* 31 (9) (2005) 1237–1243.

- [4] K. Bjercknes, P.C. Sontum, G. Smistad, I. Agerkvist, Preparation of polymeric microbubbles: formulation studies and product characterisation, *Int. J. Pharm.* 158 (2) (1997) 129–136.
- [5] D.M. El-Sherif, M.A. Wheatley, Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent, *J. Biomed. Mater. Res. A* 66 (2) (2003) 347–355.
- [6] W. Cui, J. Bei, S. Wang, G. Zhi, Y. Zhao, X. Zhou, H. Zhang, Y. Xu, Preparation and evaluation of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 73 (1) (2005) 171–178.
- [7] S. Lavisse, A. Paci, V. Rouffiac, C. Adotevi, P. Opolon, P. Peronneau, P. Bourget, A. Roche, M. Perricaudet, E. Fattal, N. Lassau, In vitro echogenicity characterization of poly[lactide-co-glycolide] (plga) microparticles and preliminary in vivo ultrasound enhancement study for ultrasound contrast agent application, *Invest. Radiol.* 40 (8) (2005) 536–544.
- [8] E. Quaia, Contrast media in ultrasonography: basic principles and clinical applications, in: A.L. Baert, K. Sartor (Eds.), *Medical Radiology – Diagnostic Imaging and Radiation Oncology*, first ed., Springer, New York, NY.
- [9] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D.A. Berk, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size, *Cancer Res.* 55 (17) (1995) 3752–3756.
- [10] H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv. Enzyme Regul.* 41 (1) (2001) 189–207.
- [11] J. Liu, A.L. Levine, J.S. Mattoon, M. Yamaguchi, R.J. Lee, X. Pan, T.J. Rosol, Nanoparticles as image enhancing agents for ultrasonography, *Phys. Med. Biol.* 51 (9) (2006) 2179–2189.
- [12] J. Liu, J. Li, T.J. Rosol, X. Pan, J.L. Voorhees, Biodegradable nanoparticles for targeted ultrasound imaging of breast cancer cells in vitro, *Phys. Med. Biol.* 52 (16) (2007) 4739–4747.
- [13] N. Mendoza-Muñoz, E. Piñon-Segundo, A. Ganem-Quintanar, D. Quintanar-Guerrero, Preparación y evaluación in vitro de nanopartículas poliméricas biodegradables como agente de contraste para ultrasonido, *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 10 (1) (2007) 9–15.
- [14] E. Pisani, N. Tsapis, J. Paris, V. Nicolas, L. Cattel, E. Fattal, Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization, *Langmuir* 22 (9) (2006) 4397–4402.
- [15] K. Kawabata, N. Sugita, H. Yoshikawa, T. Azuma, S.-i. Umemura, Nanoparticles with multiple perfluorocarbons for controllable ultrasonically induced phase shifting, *Jpn. J. Appl. Phys.* 44 (6B) (2005) 4548–4552.
- [16] B.E. Oeffinger, M.A. Wheatley, Development and characterization of a nano-scale contrast agent, *Ultrasonics* 42 (1–9) (2004) 343–347.
- [17] Y. Wang, X. Li, Y. Zhou, P. Huang, Y. Xu, Preparation of nanobubbles for ultrasound imaging and intracellular drug delivery, *Int. J. Pharm.* 384 (1–2) (2010) 148–153.
- [18] S.H. Bloch, R.E. Short, K.W. Ferrara, E.R. Wisner, The effect of size on the acoustic response of polymer-shelled contrast agents, *Ultrasound Med. Biol.* 31 (3) (2005) 439–444.
- [19] M.A. Wheatley, J. Lewandowski, Nano-sized ultrasound contrast agent: salting-out method, *Mol. Imaging* 9 (2) (2010) 96–107.
- [20] F. Forsberg, J.D. Lathia, D.A. Merton, J.B. Liu, N.T. Le, B.B. Goldberg, M.A. Wheatley, Effect of shell type on the in vivo backscatter from polymer-encapsulated microbubbles, *Ultrasound Med. Biol.* 30 (10) (2004) 1281–1287.
- [21] M.D. Blanco, M.J. Alonso, Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 (3) (1997) 287–294.
- [22] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Poly(D,L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method-processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency, *J. Microencapsul.* 22 (2) (2005) 205–214.
- [23] D. Quintanar-Guerrero, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation, *Int. J. Pharm.* 188 (2) (1999) 155–164.
- [24] W.R. Hendee, E.R. Ritenour, *Medical Imaging Physics*, fourth ed., Wiley-Liss, xix, New York, 2002. 512p.
- [25] J.A. Straub, D.E. Chickerling, C.C. Church, B. Shah, T. Hanlon, H. Bernstein, Porous PLGA microparticles: AI-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography, *J. Control. Release.* 108 (1) (2005) 21–32.
- [26] T. Kyoung, J. Jin, D. Sung, T. Gwan, Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres, *Biomaterials* 27 (2006) 152–159.
- [27] C. Vauthier, C. Schmidt, P. Couvreur, Measurement of the Density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation, *J. Nanoparticle Res.* 1 (3) (1999) 411–418.
- [28] J. Liu, Z. Qiu, S. Wang, L. Zhou, S. Zhang, A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced in vitro anti-tumor activity, *Biomed. Mater.* 5 (6) (2010) 065002.
- [29] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 385 (1–2) (2010) 113–142.

PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES COMO AGENTE DE CONTRASTE PARA ULTRASONIDO

Néstor Mendoza-Muñoz, Elizabeth Piñón-Segundo,
Adriana Ganem-Quintanar y David Quintanar-Guerrero

*División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán, UNAM. Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54740, Estado de México.*

*E-mail: nestormm05@hotmail.com, elizabethps75@yahoo.com.mx,
ganemq@hotmail.com, quintana@servidor.unam.mx.*

RESUMEN

Los agentes de contraste para ultrasonido hasta ahora disponibles en el mercado, no permiten la detección eficiente de tumores en diversos órganos, la miniaturización de este tipo de sistemas a escala nanométrica podría resolver este problema. La finalidad de este trabajo fue la adaptación del método de desplazamiento de solvente que permitiera la preparación de nanopartículas "huecas", a partir de la encapsulación de un núcleo sublimable (naftaleno), para después caracterizarlas desde el punto de vista de tamaño, densidad y morfología, así como llevar a cabo su evaluación *in vitro* mediante un sistema de ultrasonido comercial. Las nanopartículas preparadas tuvieron un diámetro entre 50-400 nm logrando una eficiencia de atrapamiento del 66.55% de naftaleno. Mediante liofilización se retiró un 98% de la cantidad de naftaleno encapsulada, sin embargo, de acuerdo con las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido y de transmisión no se evidenció la presencia de huecos en la matriz polimérica además la densidad fue similar para las preparaciones con naftaleno y nanoesferas formadas únicamente con polímero, por otro lado, los resultados de la evaluación *in vitro* sugieren un aumento en la ecogenicidad de las preparaciones que contienen nanopartículas, en comparación con aquellas soluciones en donde no están presentes.

Palabras Clave: Agentes de contraste, desplazamiento de solvente, liofilización, nanopartículas, ultrasonido.

ABSTRACT

Ultrasound contrast agents available in the market do not allow the efficient detection of tumors in diverse organs. The miniaturization of this kind of systems on nanometric scale could solve this problem. The purpose of this work was to adapt the solvent displacement method in order to obtain the "hollow" nanoparticles from the encapsulation of a sublimate nucleus (naphthalene), characterizing them for their size, density and morphology. An *in vitro* evaluation by means of a commercial ultrasound system was also performed. Nanoparticles with a diameter of 50-400 nm and an entrapment efficiency of 66.55 % of naphthalene were obtained. Lyophilization allow to take off 98% of the encapsulated amount of naphthalene, however, the micrographs obtained by scanning electronic microscopy and transmission, did not demonstrate the presence of pores or hollows in the polymeric matrix. In addition, the density of the systems was similar for the preparations with naphthalene and nanospheres formed only with polymer. Nevertheless, *in vitro* results suggest an increase in echogenicity for those preparations containing nanoparticles, in comparison with those solutions without nanoparticles.

Key Words: Contrast agents, solvent displacement, lyophilization, nanoparticles, ultrasound.

INTRODUCCIÓN

Una de las modalidades imagenológicas con mayor aceptación y uso en el ámbito médico es el ultrasonido (US), ya que presenta diversas ventajas sobre otras como los rayos X, la resonancia magnética nuclear y la tomografía computarizada. Algunas de estas ventajas son: su bajo costo (tanto en equipo como en el costo del estudio), no es invasivo, es en tiempo real y no usa radiación ionizante¹.

Sin embargo, la principal desventaja del diagnóstico mediante US es la dificultad de diferenciar entre el tejido anormal y el saludable debido a las propiedades acústicas similares, por lo que, las señales recibidas producen imágenes que tienen bajo contraste². Esta situación ha conducido al desarrollo de los agentes de contraste para US (ACUS) los cuales están diseñados con el objetivo de aumentar la diferencia de señales entre el tejido de interés y sus alrededores. Un ACUS es un sistema capaz de alterar la absorción, reflexión o refracción de las ondas ultrasónicas³.

Los inicios de los ACUS se reportan en la publicación de Gramiak y Shah⁴ (1968), quienes al inyectar verde de indocianuro en aorta de conejo obtuvieron un mejor contraste debido a las burbujas de aire generadas por cavitación. A partir de este hecho se han propuesto diversos sistemas partiendo del principio de que los gases tienen menor densidad y mayor compresibilidad, que en su conjunto son capaces de aumentar la señal acústica reflejada. Actualmente los ACUS disponibles en el mercado se componen de micropartículas de 3 a 10 μm de diámetro "llenas" de aire u otros gases, estos sistemas reciben el nombre genérico de microburbujas.

A pesar del avance que ha representado la introducción de las microburbujas para el diagnóstico ultrasónico, aún no es posible la detección eficiente de tumores; esta limitación está relacionada en parte con el actual tamaño de los ACUS comercialmente disponibles. Se ha sugerido que la miniaturización de estos sistemas podría mejorar la capacidad para detectar tumores en una gran variedad de órganos, como hígado, riñón, páncreas, etc.⁵ Por otra parte, el tener partículas relativamente grandes aumenta en mucho la posibilidad de presentar efectos adversos tales como la trombólisis y lisis celular, entre otros⁶.

Hasta la fecha, muy pocos trabajos han sido publicados acerca del desarrollo de ACUS a escala nanométrica. Wheatley y cols.⁷ (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[®] 60 y Tween[®] 80 en presencia de octafluoropropano. Sin embargo, la principal desventaja de estas "nanoburbujas" es su 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 estabilidad⁸. Asimismo, Bloch y cols.⁹ (2005) han descrito la preparación de

ACUS de 740 y 910 nm. La metodología reportada por Bloch y colaboradores consistió en una modificación de la técnica empleada y patentada por POINT Biomedical Inc. (2005) para la preparación de microburbujas de nitrógeno envueltas en una doble pared, la exterior de naturaleza proteínica y la interior compuesta por un polímero biodegradable, este ACUS se denominó biSphere[®] y el trabajo resulta muy interesante debido a la incursión de las nanopartículas poliméricas como agentes de contraste.

Por otra parte, las técnicas usadas para la elaboración de nanopartículas a partir de polímeros preformados pueden ser una alternativa para la elaboración de ACUS de tamaño nanométrico, estas técnicas son utilizadas principalmente para el desarrollo de sistemas acarreadores de fármacos. En ese sentido, el método de desplazamiento de solvente es uno de los más difundidos debido a que es fácil y simple de implementar. Esta técnica fue descrita y patentada por Fessi y cols.¹⁰ (1998), en este proceso, polímero, fármaco y, opcionalmente, un estabilizante lipofílico 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 bajo agitación magnética. Las nanopartículas son formadas instantáneamente por la rápida difusión del solvente, el cual es eliminado mediante presión reducida. El mecanismo de formación de las nanopartículas por esta técnica ha sido explicado por la turbulencia interfacial que se genera durante el desplazamiento del solvente. La violenta difusión del solvente es debida a la mutua miscibilidad entre los solventes, entonces, glóbulos de solvente probablemente de tamaño nanométrico, son formados en torno a la interfase. Estos glóbulos son rápidamente estabilizados por el agente estabilizante, hasta la difusión completa del solvente¹¹.

El objetivo de este trabajo es proponer una metodología para elaborar nanopartículas huecas las cuales puedan ser potencialmente usadas como agente de contraste en ultrasonido mediante la encapsulación de un núcleo volátil, así como llevar a cabo la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas obtenidas y su evaluación *in vitro* en un sistema de ultrasonido comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Alcohol polivinílico (PVAL) Mw 26 000 y 98% hidrolizado obtenido de Glomarza (México); copolímero de ácido láctico-co-glicólico 50:50 (PLGA); resomer[®] RG 502 H de Boehringer Ingelheim (Alemania); naftaleno grado reactivo adquirido de Merk (Alemania); percoll[®] (suspensión de sílica coloidal) obtenido de Fluka (Suiza); marcadores de densidad (consistentes de microesferas de dextrán de densidad conocida) obtenidos de Pharmacia Biotech AB (Suecia); los solventes acetona grado analítico de Fermont (México) y agua desionizada obtenida por ósmosis inversa del sistema RiOs[®] Millipore (USA). Todos los

otros reactivos fueron de grado analítico y usados sin posterior purificación.

MÉTODOS

Preparación y caracterización de las nanopartículas

Las nanopartículas se prepararon por el método de desplazamiento de solvente, para ello se disolvieron 300 mg de PLGA y la cantidad de naftaleno requerida para la preparación (37.5 mg ó 75 mg, 12.5 y 25% respectivamente) en 25 mL de acetona, posteriormente esta solución se inyectó lentamente en 50 mL de una solución acuosa de PVAL al 5%, bajo agitación magnética moderada. Después de 5 minutos de agitación, se retiró el solvente y la dispersión se concentró hasta aproximadamente 25 mL bajo presión reducida, por medio de un rotavapor. Las nanopartículas fueron separadas mediante ultracentrifugación (Ultracentrifuga Optima®LE-80K, Beckman, USA) a 30 000 rpm por 30 minutos utilizando un rotor 50.2 Ti. El sobrenadante fue desechado y la pastilla formada resuspendida en agua desionizada mediante agitación magnética durante toda la noche, este procedimiento de lavado se llevó a cabo tres veces.

La eficiencia de entrapamiento (EE) fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación¹²:

$$EE(\%) = \frac{CN(\%)}{\text{Porcentaje inicial de naftaleno}} \times 100 \quad (1)$$

Donde CN corresponde a la cantidad cargada de naftaleno la cual se calculó de la siguiente manera¹²:

$$CN(\%) = \frac{\text{Peso de naftaleno en las nanopartículas}}{\text{Peso recuperado de nanopartículas}} \times 100 \quad (2)$$

El porcentaje inicial de naftaleno corresponde a la cantidad teórica de naftaleno cargado y fue calculado a partir del peso de naftaleno usado en la preparación dividido entre el peso del polímero usado en la preparación y el peso del naftaleno. Para retirar el naftaleno encapsulado se procedió a liofilizar las nanopartículas obtenidas, para ello la suspensión de nanopartículas fue congelada a -15°C y secada durante 72 horas a una presión $< 100 \text{ iBar}$ en un liofilizador Labconco®FreeZone® (USA). El diámetro de las nanopartículas se determinó mediante la técnica de dispersión de luz láser (Coulter N4 Plus, Coulter, USA). La longitud de onda de la luz láser (He/Ne, 10 mW) fue de 678 nm. Las mediciones fueron hechas a un ángulo de 90° durante 180 s, a una temperatura de 25°C . Las dispersiones fueron diluidas con agua desionizada para asegurar que el número de partículas contadas por segundo estuviera dentro del rango de sensibilidad del instrumento. Las medidas fueron hechas por triplicado para todos los lotes preparados. Se observó la morfología de las nanopartículas recubiertas con una película de oro de $\sim 20 \text{ nm}$ con un microscopio electrónico de barrido JEOL® JMS-25SII (Japón) a 12.5 kV , mientras que la estructura fue observada con un microscopio electrónico de transmisión JEOL®

JEM-2010 (Japón) a 200 kV . La determinación de la densidad fue llevada a cabo mediante la separación de las nanopartículas en un gradiente de silica coloidal formado *in situ* durante la ultracentrifugación en un rotor modelo 90Ti (Beckman, USA) a 5°C y $10,000 \text{ rpm}$ 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 las nanopartículas. En un tubo por separado, fueron colocados marcadores de densidad constituidos por micropartículas de diferentes densidades, 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 (altura) fue determinada mediante un Vernier (Digitex®, USA). La densidad de las nanopartículas fue situada gráficamente mediante la interpolación de su altura en una curva obtenida a partir de las alturas de los marcadores de diferente densidad.

Evaluación *in vitro*

Se construyó un dispositivo formado por un tubo de ultracentrifuga (16x76 mm) de policarbonato, el cual se perforó con la finalidad de formar dos ventanas centradas y opuestas de 10x50 mm. Posteriormente, el tubo se forró con látex (obtenido de un guante quirúrgico) y fue sellado con un tapón de baquelita. El tapón de baquelita se perforó de tal forma que se introdujo una manguera de 2 mm de diámetro la cual se conectó a una jeringa de 20 mL (Figura 1). En dicho dispositivo se inyectaron 15 mL de la dispersión de nanopartículas en una concentración de aproximadamente 5×10^8 partículas/mL determinada por medio del Nanosizer N4 Plus® (Coulter, USA). Después, el dispositivo fue sometido al ultrasonido por el lado de la ventana utilizando como amplificador una bolsa de acoplamiento (bolsa con agua) colocada debajo del dispositivo, el estudio se realizó con un equipo de US comercial en modo B marca Mitsubishi, equipado con un transductor cóncavo, trabajando a una frecuencia central de 3.5 MHz, la imagen obtenida fue impresa directamente del equipo, digitalizada y convertida en escala de grises a 8 bits utilizando un scanner Hewlett Packard Modelo 5100C a una resolución de 600 dpi. Dicha imagen fue analizada mediante el software Image v.1.35p (National Institutes of Health, USA), para ello se definió la región de interés (ROI) correspondiendo en lo posible a la ventana del dispositivo y se obtuvo el valor promedio de la escala de grises (VPEG), así como el histograma correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de las nanopartículas

El método de desplazamiento de solvente permitió preparar nanopartículas de PLGA de tamaño submicrónico con un diámetro promedio $\sim 150 \text{ nm}$ y una estrecha distribución monodispersa (50-400 nm), no se encontró diferencia significativa en el diámetro promedio entre la preparación al 12.5% y la de 25% de naftaleno. La eficiencia de encapsulamiento fue de 66.55%. Bajo las condiciones de la liofilización se logró sublimar un 98% de la cantidad total encapsulada, quedando un 2% de naftaleno

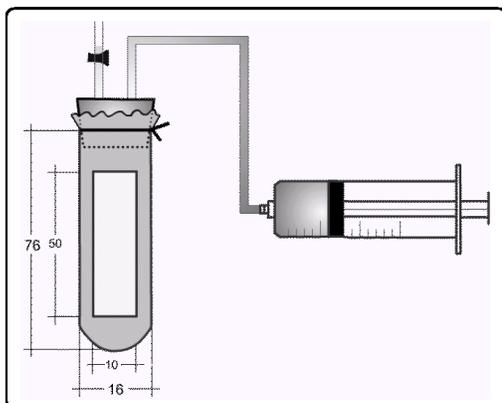


Figura 1. Esquema del dispositivo elaborado para la determinación de la ecogenicidad *in vitro* de las nanopartículas (unidades en mm).

residual, estos datos muestran que los materiales volátiles o sublimables como el naftaleno, cuyo punto de sublimación bajo condiciones estándares de presión y temperatura es $< 80^{\circ}\text{C}$ ¹³, son compuestos que pueden ser fácilmente retirados. Este método ha sido ampliamente utilizado en la elaboración de micropartículas huecas¹⁴⁻¹⁶. Las imágenes obtenidas mediante MEB (Figura 2) no evidencian la presencia de poros o huecos en la matriz polimérica de PLGA, sin embargo, podemos observar que el tamaño de las nanopartículas corresponde al determinado por dispersión de luz láser. Por otro lado, las micrografías obtenidas por MET (Figura 3) tampoco muestran la presencia de estructuras que pudieran sugerir huecos o poros en las nanopartículas, éstas pueden observarse como partículas esféricas con una matriz compacta similares a las nanoesferas formadas únicamente por PLGA (sin incluir naftaleno en su preparación). De acuerdo con lo anterior, a pesar de que se lleva a cabo la encapsulación y sublimación del naftaleno que se encuentra situado en la matriz polimérica no se evidencian huecos, la hipótesis que planteamos es que el naftaleno puede encontrarse disperso en forma molecular. Se ha reportado que las sustancias encapsuladas en nanoesferas (como es nuestro caso) se encuentran dispersas en forma molecular^{17,18}. Los resultados de densidad (Figura 4) confirman el hecho que el polímero se está reacomodando porque no presenta cambios de densidad por retención de aire, ya que se encontraron densidades similares para las nanoesferas y las preparaciones de nanopartículas a las cuales se les incorporó el naftaleno. Es importante señalar que los resultados esperados eran que las preparaciones con naftaleno tuvieran una densidad mucho menor en comparación con las nanoesferas de PLGA debido a la presencia de aire producto de los huecos formados.

Evaluación *in vitro*

Primeramente, con respecto al dispositivo podemos afirmar que

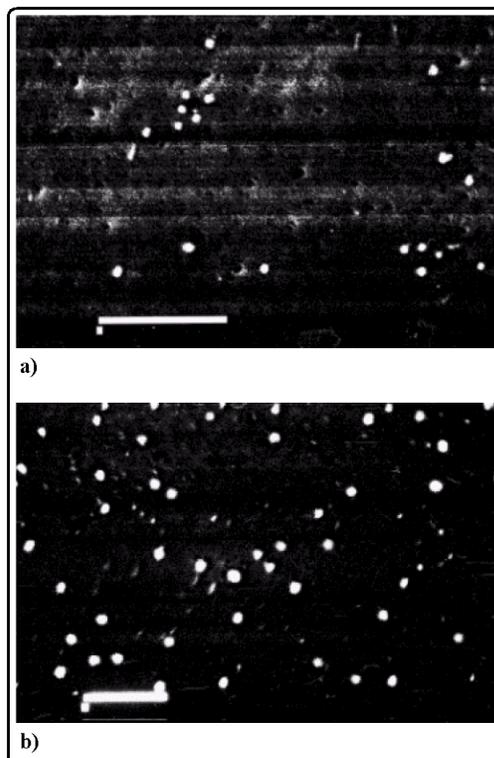


Figura 2. Micrografías obtenidas por MEB para las nanopartículas formadas por PLGA posteriores a la liofilización. a) Nanoesferas de PLGA; b) nanopartículas de PLGA formadas con 12.5% de naftaleno. 15000 x Barra= 1µm

éste cumplió con el objetivo planteado al permitir que las ondas ultrasónicas atravesaran la ventana creada y se lograra observar el líquido inyectado en su interior. En general, en las imágenes (Figura 5) se ve el dispositivo bien definido debido a que las ondas ultrasónicas rebotan principalmente en la región rígida del tubo. Entre las dos paredes que delimitan al tubo se observa una región de menor brillo la cual está constituida por el líquido inyectado, en esta sección es donde fue delimitada la RDI. La zona de alto brillo por debajo del dispositivo está 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.

El análisis de las imágenes digitalizadas 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

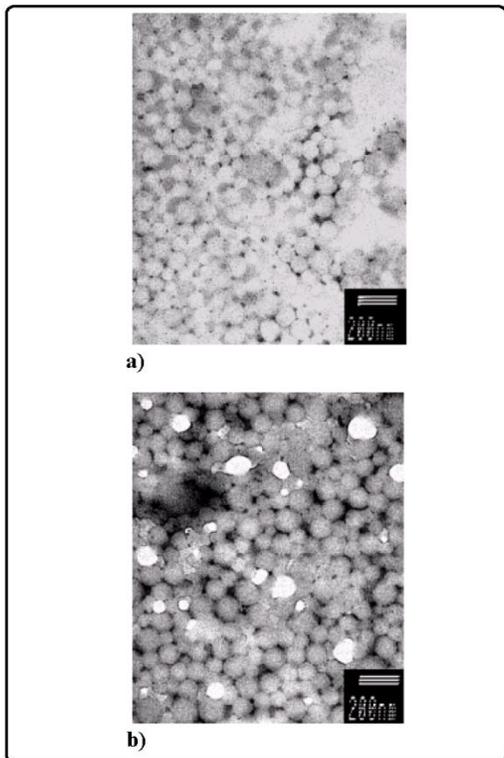


Figura 3. Micrografías obtenidas por MET para las nanopartículas formadas por PLGA posteriores a la liofilización. a) Nanoesferas de PLGA; b) nanopartículas de PLGA formadas con 12.5% de naftaleno. 20000 x.

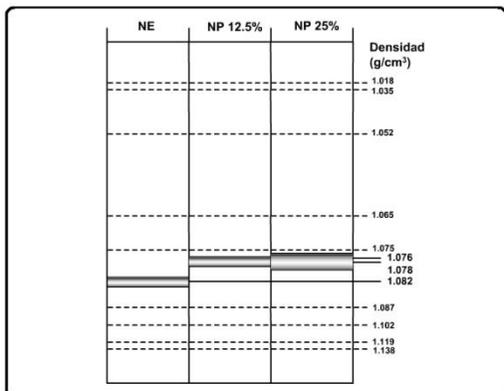


Figura 4. Bandas de las nanoesferas (NE), nanopartículas (NP) formadas con 12.5% y 25% de naftaleno y estándares externos generadas con Percoll® mediante centrifugación.

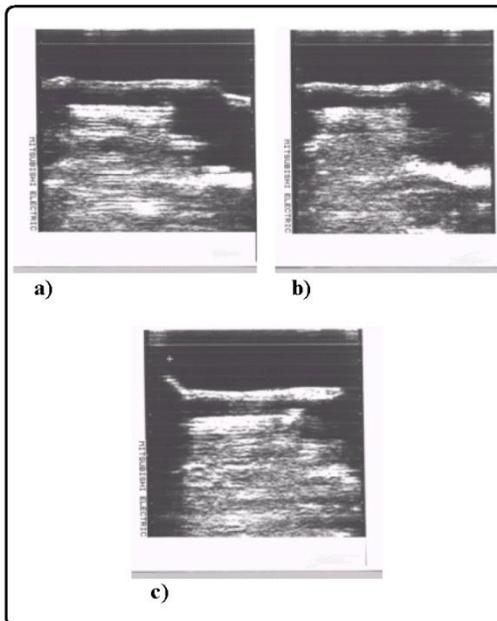


Figura 5. Ultrasonogramas digitalizados de los diferentes sistemas probados. a) Blanco (agua desionizada), b) nanoesferas; c) nanopartículas elaboradas con 25% de naftaleno.

0 corresponde al negro puro y 255 al blanco puro; de esta manera el VPEG es el tono promedio de los pixeles analizados. Es importante mencionar que el software utilizado, Image v.1.35p (National Institute of Health, USA), es un programa desarrollado para el análisis de imágenes médicas utilizado en técnicas como son: el US, la resonancia magnética nuclear, la tomografía computarizada, entre otras. 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 y, 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 trabajos de investigación^{19,20}. La Figura 6 muestra los histogramas de frecuencia de la escala de grises para cada uno de los sistemas evaluados y en la Tabla I se reporta el VPEG. De manera general las tendencias de los sistemas analizados son en todos los casos distribuciones sesgadas hacia la izquierda. Además una característica importante es que contienen nanopartículas que presentan una distribución bimodal en donde una de estas modas corresponde al valor para el blanco puro. Por otra parte se observa que el VPEG del sistema blanco presenta el menor valor numérico, sin embargo, este valor puede

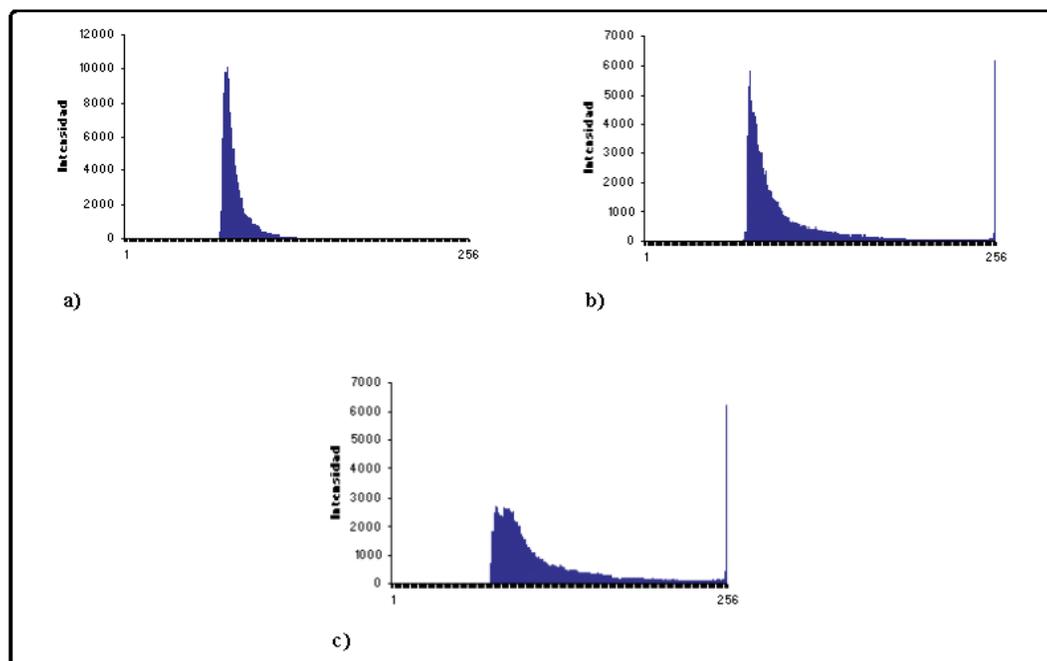


Figura 6. Histograma de distribución del valor asignado en la escala de grises para la RDI de cada uno de los ultrasonogramas analizados. a) Sistema blanco. b) nanoesferas; c) nanopartículas elaboradas con 25% de naftaleno.

Sistema	Área de RDI (píxeles ²)	VPEG
Blanco	111496	81.364
Nanoesferas	112047	96.998
Nanopartículas formadas con 25% de naftaleno	116960	123.686

Tabla 1. VPEG para cada uno de los sistemas analizados mostrando también el área de la RDI.

considerarse alto teniendo en cuenta que se trata únicamente de 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 nanoesferas, presentan un ligero grado de ecogenicidad que es indicado por el aumento del VPEG en comparación con el sistema blanco. Esto puede considerarse normal, ya que las nanoesferas también pueden comportarse como dispersores acústicos. De igual manera se observa una ecogenicidad superior a la de las nanoesferas para el caso de las nanopartículas elaboradas con

25% de naftaleno, siendo ésta la que presenta el mayor valor numérico de VPEG. Si bien es cierto que los resultados de VPEG reflejan que las nanopartículas preparadas con naftaleno presentan una mayor ecogenicidad en comparación con las nanoesferas, estos datos deberán de tomarse con cierta reserva y es que de acuerdo con la ecuación para la frecuencia de resonancia (f)²¹:

$$f = \frac{6500}{d} \quad (3)$$

La frecuencia de resonancia es inversamente proporcional al diámetro (d) y en ese sentido, considerando que las NP's obtenidas son de 150 nm, la frecuencia de resonancia calculada corresponde a 40 MHz, la cual es una frecuencia fuera del rango médico. Considerando que el utilizado en este trabajo fue de 5 MHz, nos indica que la frecuencia de insonificación no fue lo suficiente para que el sistema entrara en resonancia. Existen reportes que los ACUS de tamaño submicrónico siguen estas ecuaciones^{22,23}, sin embargo, otros autores consideran que la relación entre la respuesta ultrasónica generada y el tamaño de partícula submicrónico de este tipo de ACUS no está del todo comprendida, inclusive Wheatley y cols.²⁴ (2006) ha encontrado que los valores experimentales de frecuencia de resonancia

corresponden a la mitad de los valores teóricos calculados.

Como puede observarse, el uso de los ACUS de tamaño submicrónico aún está en desarrollo y 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.

CONCLUSIONES

Se lograron preparar nanopartículas con una buena eficiencia de encapsulamiento de naftaleno, el cual pudo ser retirado eficientemente mediante liofilización, sin embargo, no se evidencian poros o huecos en la matriz polimérica, debido quizás a que el naftaleno se encuentra disperso molecularmente en la matriz. Las preparaciones con nanopartículas presentaron una mayor ecogenicidad en comparación con el agua, sin embargo, consideramos que la evaluación en un rango mayor de frecuencias podría evidenciar aún mejor la diferencia en la respuesta generada por las nanopartículas en comparación a medios acuosos sin dispersores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Tec. Rodolfo Robles y al IQ Iván Puente por su asistencia en la Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión, respectivamente.

REFERENCIAS

- Lewin, P.A. *Quo vadis* medical ultrasound? *Ultrasonics* **42**, 1-7 (2004).
- Nayaran, P. Development and characterization of hollow polymeric microcapsules for use as contrast agent for diagnostic ultrasound. Ph.D. Thesis, Drexel University (1999).
- Morawski, A.M., Lanza, G.A. & Wickline, S.A. Targeted contrast agent for a magnetic resonance imaging and ultrasound. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 1-4 (2005).
- Gramiak, P.M. & Shah, P.M. Echocardiographic of the aortic root. *Invest. Radiol.* **3**, 356-366 (1968).
- Goldberg, B. Contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.* **26**, S33-S34 (2000).
- Hwang, J., et al. Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments *in vivo*. *Ultrasound Med. Biol.* **31**, 553-564 (2005).
- Wheatley, M.A. & Oeffinger, B.E. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics* **42**, 343-347 (2004).
- 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**, 83-93 (2006).
- 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**, 439-444 (2005).
- Fessi, H., Devissaguet, J.P. & Puisieux, F. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d' une substance, sous forme de nanocapsules. *Eur. Patent* EP 274 961 (1998).
- 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**, 1113-1117 (1998).
- Leroux, J., Alléman, E., Doelker, E. & Gurny, R. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur J Pharm Biopharm.* **41**, 14-18 (1995).
- The Merck Index. 17th ed. CD-ROM
- El-Sherif, D. & Wheatley, W.A. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J. Biomed. Mater. Res.* **66A**, 347- 355 (2003).
- Cui, W., et al. 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**, 171-178 (2005).
- Straub, J.A., et al. Porous PLGA microparticles: AI-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography. *J. Control. Release* **108**, 21-32 (2005).
- Teixeira, M., Alonso, M.J., Pinto, M.M.M. & Barbosa, C.M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* **59**, 491-500 (2005).
- Chawla, J.S. & Amiji, M.M., Biodegradable poly(o-caprolactone) nanoparticles tumor targeted delivery of tamoxifen. *Int. J. Pharm.* **249**, 127-138 (2002).
- Goddi, A., et al. *In vitro* analysis ultrasound second generation contrast agent diluted in saline solution. *Radiol. Med.* **104**, 569-579 (2004).
- Bekeredjian, R., et al. Potential of gold-bound microtubules as a new ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.* **28**, 691-695 (2002).
- Jong, N., Hoff, L., Skotland, T. & Born, N. Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: Theoretical considerations and some measurements. *Ultrasonics* **30**, 95-103 (1992).
- Wheatley, M.A. & Oeffinger, B.E. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics* **42**, 343-347 (2004).
- Couture, O., et al. Investigating perfluorohexane particles with high frequency ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* **32**, 73-82 (2006).
- 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**, 83-93 (2006).