



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS
COMO POTENCIALES AGENTES DE CONTRASTE PARA ULTRASONIDO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

LF. PAULINA FUENTES VAZQUEZ

TUTOR

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Pandiyan Sarasvathi Thangarasu
Primer vocal	Dra. María Josefa Bernad Bernad
Segundo vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Tercer vocal	Dra. Elizabeth Piñón Segundo
Secretaria	Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-323), en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. David Quintanar Guerrero.

El presente trabajo fue presentado en el XLIX Congreso Nacional y VII Internacional de Ciencias Farmacéuticas, de la Asociación Farmacéutica Mexicana (Septiembre 2016).

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, que ha sido mi segundo hogar, donde he adquirido todos los conocimientos, he crecido como ser humano y como profesional.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM, por ser la base para desarrollarme y crecer profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada 576766 para realizar mi estudios de maestría.

A los proyectos PAPIIT-2019143, CONACYT CB-221629, CONACYT INFRA 251940 y PIAPI 001 por el financiamiento otorgado durante la realización de este trabajo de investigación.

A mi tutor, el Dr. David Quintanar Guerrero, por su confianza para permitirme realizar este trabajo, gracias por su apoyo y enseñanzas que me han permitido crecer profesionalmente.

A la M. en IQ. Alicia del Real López por el apoyo proporcionado en los estudios de microscopía electrónica de barrido.

A los miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

“Por mi raza hablará el espíritu”

DEDICATORIAS

A mis padres, Enrique Fuentes Sánchez y Araceli Vázquez Fragoso, por quienes luché y sigo adelante, gracias por su amor y todas sus enseñanzas, porque con su apoyo he logrado llegar lejos. Siempre tendrán mi más grande respeto y cariño, los amo.

A mis hermanos, Ara Paola Fuentes Vázquez y Enrique Eladio Fuentes Vázquez, por ser mis compañeros de vida, por su apoyo y cariño, porque aunque soy la mayor, ustedes siempre me dan grandes lecciones de vida, los amo.

A mis abuelas Cleotilde Sánchez y Margarita Fragoso, por su gran cariño y sus enseñanzas, por su apoyo y comprensión incondicional, las amo.

A mi sobrina Grecia Fuentes García, por su cariño y su gran alegría que siempre me contagia, te quiero mucho y siempre contarás conmigo pequeña.

A Oscar Escalona Rayo, por ser mi amigo y compañero durante estos años, gracias por tu cariño, paciencia y por todos los momentos compartidos, porque también has sido mi guía y me has apoyado incondicionalmente.

A mis amigos y compañeros del laboratorio L-323, gracias por todos sus consejos, los aprecio mucho y espero que sigamos compartiendo más momentos juntos.

A Dios por permitirme seguir adelante y culminar esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
2. 1. EL SONIDO.....	2
2. 2. VELOCIDAD DEL SONIDO	3
2. 3 FENÓMENOS DE PROPAGACIÓN DE LAS ONDAS EN LOS TEJIDOS....	4
2.3.1. ATENUACIÓN	4
2.3.2. REFRACCIÓN	4
2.3.3. REFLEXIÓN	4
2.3.4. DISPERSIÓN.....	4
2.3.5. ABSORCIÓN	5
2. 4. IMPEDANCIA ACÚSTICA.....	5
2.5. EL ULTRASONIDO	5
2.5.1 LA EVOLUCIÓN DEL UTRASONIDO COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO.....	6
2.5.2. EL PRINCIPIO PULSO-ECO	6
2.5.3. TIPOS DE ULTRASONIDO	7
2.5.4. EL EFECTO PIEZOELÉCTRICO.....	9
2.5.5. EL EQUIPO DE ULTRASONIDO.....	9
2.6. ECOGENICIDAD	12
2.7. LOS AGENTES DE CONTRASTE DE ULTRASONIDO	12
2.7.1. PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ACUs.....	12
2.7.2 MECANISMO DE CONTRASTE DE LOS ACUs	13
2.7.3. TIPOS DE AGENTES DE CONTRASTE	14
2.7.4. AGENTES DE CONTRASTE EN EL MERCADO	16
2.8. LA NANOTECNOLOGÍA.....	16
2.8.1. LA APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO POR ULTRASONIDO	18
2.9. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	20
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPÓTESIS.....	23
V. OBJETIVOS.....	24

5.1 OBJETIVO GENERAL	24
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
VI. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
6.1. SELECCIÓN DE LOS MATERIALES Y EQUIPOS	25
6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	26
6.3. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS.....	27
6.3.1. SELECCIÓN DE LOS MATERIALES Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS (ETAPA I)	27
6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL (ETAPA II).....	27
6.5. OPTIMIZACIÓN Y VERSATILIDAD DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN (ETAPAS III Y IV).....	29
6.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS.....	29
6.6.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN (PDI).....	29
6.6.2 POTENCIAL ZETA	29
6.6.3 DENSIDAD	29
6.6.4 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	30
6.6.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	30
6.6.6. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ECOGENICIDAD	30
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
7. 1 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL	39
7.2. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	50
7.3 VERSATILIDAD DEL MÉTODO.....	51
7.4. CARACTERIZACIÓN DE LA DENSIDAD DE LOS SISTEMAS OPTIMIZADOS	54
7.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS.....	55
7.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	57
VIII. CONCLUSIONES	58
IX. PERSPECTIVAS	59
X. REFERENCIAS	60
XI. ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Mecanismo de generación de una onda de ultrasonido, b) características de una onda [Modificada de referencia 9].	2
Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de visualizaciones por ultrasonido. a) modo-A, b) modo-B, c) modo-M [Modificada de referencia 25].	8
Figura 3 . Partes de un transductor [Modificada de referencia 29]	10
Figura 4. Proceso de formación de imagen por ultrasonido [Modificada de referencia 11].	11
Figura 5. Agentes de contraste de ultrasonido [Modificada de referencia 37].	13
Figura 6 . Representación esquemática de nanopartículas generadoras de CO ₂ in situ mediante a) la hidrólisis de las cadenas poliméricas, b) efecto del pH [Modificada de referencias 2,49].....	15
Figura 7. Intensidades de la ecogenicidad producida por ACUs de diferente tamaño de partícula [Modificada de referencia 35].	18
Figura 8. Efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Extravasación de ACUs nanométricos a través un tumor [Modificada de referencia 59].....	19
Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento experimental.	26
Figura 10. Phantom de gelatina preparado para la evaluación de la ecogenicidad in vitro.	30
Figura 11. a) Ultrasonido Modo B (Sonolife 9668 Plus), b) medición de la ecogenicidad: phantom de gelatina con un tubo penrose en su interior conteniendo los sistemas nanoparticulados.	31
Figura 12. Software Debut Video Capture®	32
Figura 13. Software Image J (64-bit).....	32
Figura 14. Imágenes obtenidas por ultrasonido curva dosis-respuesta de NE.	37
Figura 15. Imágenes obtenidas por ultrasonido curva dosis-respuesta de NAI.....	38
Figura 16. Curva dosis respuesta NAI vs NE.	39
Figura 17. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el tamaño de partícula.....	42
Figura 18. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el índice de polidispersión.	43
Figura 19. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el potencial zeta.	44
Figura 20. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el porcentaje de mejoría de contraste (VPEG).....	45

Figura 21. Imágenes por ultrasonido modo-B, de los 18 sistemas pertenecientes al diseño experimental Box-Benhken y el blanco (buffer PBS, pH 7.4).....	46
Figura 22. Diagrama de contornos de la superficie de respuesta estimada.....	51
Figura 23. Imágenes por ultrasonido modo-B de los sistemas optimizados.....	51
Figura 24. Imágenes por ultrasonido modo-B de los sistemas obtenidos en la versatilidad del método.	52
Figura 25. Comparación del porcentaje de mejoría del contraste por ultrasonido al emplear los distintos sistemas nanoparticulados preparados en la versatilidad del método.	53
Figura 26. Marcadores de densidad en un gradiente de sílice coloidal con los valores de sus respectivas densidades.	54
Figura 27. Altura de los marcadores en función de su densidad.....	55
Figura 28. Termogramas de DSC de PLGA, PVAL, manitol, alcanfor, naftaleno, ciclotetrasiloxano y los sistemas nanoparticulados NAI, NNaf, NCiclo y NE optimizados.	56
Figura 29. Imágenes MEB de NE y NAI optimizadas.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Velocidad del sonido en diferentes medios biológicos [11].	3
Tabla 2. Ejemplos de impedancias acústicas y densidades de tejidos biológicos [18].	5
Tabla 3. ACUs desarrollados comercialmente en la actualidad [47,50].	16
Tabla 4. Materiales y equipos empleados durante el desarrollo experimental.	25
Tabla 5. Factores y niveles analizados en el diseño experimental Box-Behnken.	28
Tabla 6. Sistemas preparados de acuerdo con el diseño experimental Box-Behnken.	28
Tabla 7. Caracterización de las nanopartículas huecas a base de alcanfor (NAI) y nanoesferas de PLGA (NE), como sistemas preliminares.	35
Tabla 8. Resultados de la curva dosis-respuesta de nanoesferas de PLGA (NE).	36
Tabla 9. Resultados de la curva dosis-respuesta de las nanopartículas huecas a base de alcanfor (NAI).	37
Tabla 10. Tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y % de mejoría de contraste (VPEG) de los 18 sistemas preparados de acuerdo al diseño experimental Box-Behnken. Resultados antes y después de liofilizar.	40
Tabla 11. Coeficientes de regresión y análisis de varianza (ANOVA) de las variables de respuesta en función de los factores estudiados. (Después de liofilizar).	48
Tabla 12. Caracterización de los sistemas optimizados.	50
Tabla 13. Sistemas preparados para evaluar la versatilidad del método.	53

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la preparación de sistemas nanoparticulados huecos como agentes de contraste para ultrasonido, con el propósito de mejorar el diagnóstico oportuno de diversas patologías incluyendo el cáncer, debido a su creciente incidencia en la población. En la etapa I se prepararon nanopartículas huecas a través del método emulsificación-difusión, empleando 200 mg de PLGA, 40 mg de alcanfor como agente porógeno, 3% p/v de polivinil alcohol (PVAL) como estabilizante y 7000 rpm como velocidad de agitación, así mismo se prepararon nanoesferas de PLGA a las mismas condiciones. Los sistemas presentaron tamaños de partícula de ~300 nm, índices de polidispersión de ~0.01 y potencial zeta de ~ -29 mV. Adicionalmente, se construyó una curva dosis-respuesta para evaluar ecogenicidad, empleando un *phantom* de gelatina a las concentraciones: 2.5, 5, 10, 20, 40 y 60 $\mu\text{g/mL}$ en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 a 37°C, desgasificado, calculando el porcentaje de mejoría del contraste con respecto al blanco (buffer PBS). La dosis elegida para estudiar los sistemas posteriores fue 10 $\mu\text{g/mL}$, al ser lo suficientemente pequeña para lograr un aumento en el contraste por ultrasonido. En la etapa II, se planteó un diseño experimental Box-Benhken con tres factores y tres niveles, evaluando los efectos de la cantidad de agente porógeno (20, 40 y 60 mg), porcentaje de estabilizante (1.5, 3.0 y 4.5 % p/v) y velocidad de agitación (3500, 7000 y 10500 rpm) sobre las propiedades fisicoquímicas y la ecogenicidad de los sistemas. Se determinó que el incremento del porcentaje de estabilizante y la velocidad de agitación, da lugar a una disminución en el tamaño de partícula e índice de polidispersión de los sistemas, así mismo la disminución en la velocidad de agitación provoca que los valores de potencial zeta se vean reducidos, y el incremento de la cantidad de porógeno y concentración de estabilizante producen una mejoría en el contraste de las imágenes por ultrasonido. En la etapa III, se establecieron las condiciones óptimas de preparación de los sistemas en base al porcentaje de mejoría de contraste por ultrasonido, obteniéndose las siguientes condiciones: porógeno 60 mg, concentración de PVAL 2.4% p/v, y velocidad de agitación 8000 rpm. Estos sistemas presentaron tamaños de ~300 nm, índices de polidispersión de ~0.05, potencial zeta de ~ -24 mV y

mejoraron el contraste por ultrasonido respecto al blanco en ~ 26%. En la etapa IV, se procedió a evaluar la versatilidad del método empleando los distintos agentes porógenos: alcanfor, naftaleno y ciclotetrasiloxano en la misma proporción y condiciones de preparación que los sistemas optimizados, además se prepararon nanoesferas de PLGA, con la finalidad de comparar su ecogenicidad. Los sistemas presentaron tamaños de partícula de 280-390 nm, índices de polidispersión de 0.04-0.05 y potencial zeta de ~ -24 mV. El alcanfor se destacó como el mejor agente porógeno para el desarrollo de los sistemas nanoparticulados huecos, mostrando un porcentaje de mejoría del contraste por ultrasonido del 26.87%, mientras que para naftaleno, ciclotetrasiloxano y nanoesferas de PLGA fue del 23.82, 22.24 y 14.92% respectivamente. Posteriormente, mediante centrifugación isopícnica en un gradiente de sílice coloidal se determinó que la densidad de los sistemas nanoparticulados huecos fue menor que la de las nanoesferas de PLGA, y se comprobó por calorimetría diferencial de barrido la remoción de los agentes porógenos durante el proceso de liofilización. Finalmente, se obtuvieron micrografías por microscopía electrónica de barrido de las nanoesferas de PLGA y nanopartículas huecas a base de alcanfor optimizadas, las cuales presentaron una forma esférica y distribución de tamaño uniforme. Estos resultados indican que los sistemas desarrollados son potenciales agentes de contraste para su empleo en el diagnóstico por ultrasonido.

I. INTRODUCCIÓN

El ultrasonido es la modalidad de imagenología más utilizada en la aplicación clínica para el diagnóstico de enfermedades, debido a su habilidad para penetrar tejidos [1]. Además de ser una modalidad no invasiva y en tiempo real, es seguro, de bajo costo, de alta disponibilidad a través de dispositivos portátiles, de fácil acceso al público [2] y permite visualizar distintos cambios multidimensionales en la morfología para el diagnóstico y monitoreo del avance en la terapia [3].

La imagenología por ultrasonido se basa en el principio pulso-eco, donde pulsos cortos de ondas ultrasónicas son transmitidos al tejido objetivo, y el eco de dichas ondas es parcialmente reflejado. El desajuste de impedancia acústica entre los límites de los tejidos adyacentes, es registrado, procesado y mostrado como una imagen [4]. La capacidad de diagnóstico no sólo ha mejorado con los avances en los sistemas de ultrasonido, sino también con la introducción de agentes de contraste para ultrasonido (ACUs) [5]. Estos sistemas, consisten en microburbujas de gas encapsulado, con diámetros menores a 8 μm , los cuales son estabilizados por una pared de surfactantes, lípidos, proteínas o polímeros. Después de ser inyectados intravenosamente atraviesan los capilares pulmonares, y llegan al corazón y los órganos internos donde son capturadas las imágenes. La diferencia de impedancia acústica entre la burbuja de gas y el medio circundante, produce la reflexión de las señales ultrasónicas para la obtención de las imágenes [5-6]. Los ACUs micrométricos sólo permiten la visualización del torrente sanguíneo y órganos externos, sin embargo, los ACUs nanométricos, son incluso capaces de atravesar el endotelio vascular tumoral, permitiendo el diagnóstico y monitoreo de la terapia oncológica [7]. En el presente trabajo se propone la preparación de sistemas nanoparticulados huecos como agentes de contraste para ultrasonido, a través del método emulsificación-difusión. Se plantea un diseño experimental Box-Benhken evaluando el efecto de la cantidad de agente porógeno, porcentaje de estabilizante y velocidad de agitación sobre las propiedades fisicoquímicas y la ecogenicidad de los sistemas, los cuales representan una novedosa alternativa para mejorar del diagnóstico por ultrasonido.

II. MARCO TEÓRICO

2. 1. EL SONIDO

El sonido es una forma de energía mecánica que requiere un medio físico para propagarse, este medio debe contener moléculas (aire, agua, etc.) que son usadas para propagar el sonido. A diferencia de las ondas electromagnéticas, el sonido no puede ser transmitido en el vacío [8].

Una onda sonora es creada cuando un objeto vibrante y oscilante empuja y atrae moléculas adyacentes, causando que estas sucesivamente vibren. Esta vibración se propaga lejos de la fuente en forma de una onda longitudinal caracterizada por una serie de vibraciones de las moléculas de ida y vuelta. La dirección de esta vibración “ida y vuelta” es paralela a la dirección de propagación de la onda. La onda que es creada representa una serie de compresiones, cuando las moléculas se juntan, y rarefacciones, cuando las moléculas se separan (Figura 1, a). Si se mide la presión en diferentes puntos, en las regiones de compresión donde hay una mayor densidad de moléculas, habrá una mayor presión que la normal, y en las regiones de rarefacción (con una menor densidad de moléculas) habrá menor presión que la normal [9].

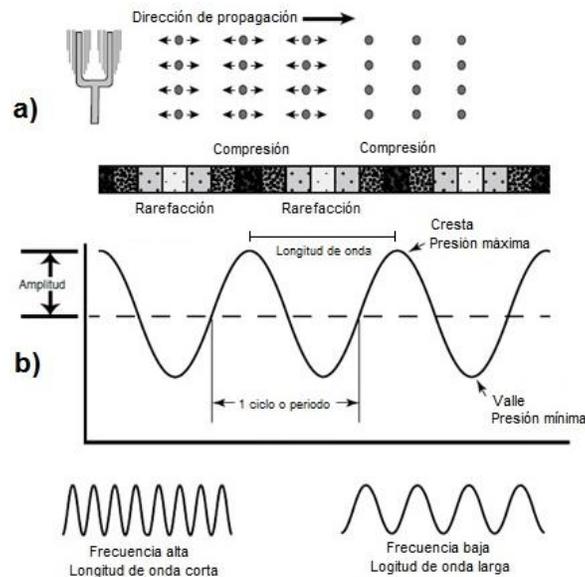


Figura 1. a) Mecanismo de generación de una onda de ultrasonido, b) características de una onda [Modificada de referencia 9].

Las características de las ondas sonoras son las siguientes: La longitud de onda (λ) es la distancia entre las crestas o valles de ondas adyacentes. La trayectoria completa recorrida por la onda se denomina ciclo. Un ciclo por segundo se denomina frecuencia y se expresa en Hertz (Hz). La amplitud de una onda es el máximo alargamiento en la dirección positiva y negativa desde la línea base y se mide en decibeles (dB). El periodo es el tiempo que toma el ciclo completo de una onda (Figura 1, b). La distribución del poder acústico por área se denomina intensidad, es la cantidad de energía distribuida por unidad de tejido y se expresa con la siguiente fórmula [10]:

$$Intensidad = \frac{Poder}{\text{Área}} = \frac{Watts}{cm^2} \dots\dots\dots Ec.1$$

2. 2. VELOCIDAD DEL SONIDO

La velocidad a la que viaja una onda de sonido se expresa como:

$$v = f \times \lambda \dots\dots\dots Ec. 2$$

Donde v es la velocidad, f es la frecuencia y λ la longitud de onda. La velocidad del sonido se expresa en m/s, y es determinada por el medio a través del cual viaja el sonido (Tabla 1). En general, la velocidad del sonido es más lenta en los gases como el aire, más rápida en los sólidos como el hueso, e intermedia en fluidos como la sangre. La velocidad del sonido está directamente relacionada con la rigidez del material e inversamente relacionada con su densidad [11].

Tabla 1. Velocidad del sonido en diferentes medios biológicos [11].

Medio	Velocidad (m/s)
Aire	330
Pulmones	500
Grasa	1,450
Agua	1,480
Tejidos blandos	1,540
Hígado, riñón	1,560
Sangre	1,570
Músculos	1,600
Tendones	1,700
Huesos	3,500

2. 3 FENÓMENOS DE PROPAGACIÓN DE LAS ONDAS EN LOS TEJIDOS

2.3.1. ATENUACIÓN

La atenuación se refiere a la pérdida de la energía debido a la absorción y al agotamiento, debido a la retrodispersión provocada por cualquier inhomogeneidad en el medio [12]. La atenuación es la medida de la energía disipada convertida en calor conforme las ondas viajan a través del material. El coeficiente de atenuación es determinado por el cambio en la amplitud de la señal acústica [13].

2.3.2. REFRACCIÓN

Cuando una onda choca con una interfase a un ángulo menor de 90° , da lugar a la refracción de la onda en dirección opuesta al ángulo de incidencia. Cuando esto sucede algunos de los ecos rebotados se pierden o atenúan. La refracción también es definida como la redirección de una parte de la onda sonora cuando esta cruza los límites de medios con diferentes impedancias acústicas [14].

2.3.3. REFLEXIÓN

La reflexión es la inversión parcial de la dirección de propagación de una onda incidente, sobre una interfase lisa entre los medios con diferente impedancia acústica. La lisura de la superficie se define con respecto a la longitud de onda de la onda incidente. Una superficie lisa tiene irregularidades en una escala mucho más pequeña que una longitud de onda. La reflexión de objetos que son lisos comparados con una longitud de onda se denomina especular. La reflexión por objetos rugosos comparados con una fracción de longitud de onda se denomina difusa. La reflexión invierte la dirección del componente de propagación de la onda incidente perpendicular a la interfase, pero no cambia el componente de propagación paralelo a la interfase [15].

2.3.4. DISPERSIÓN

La dispersión se refiere a la radiación de la onda de ultrasonido en todas las direcciones, donde sólo una pequeña proporción es reflejada de regreso. Esto ocurre cuando la onda sonora interactúa con estructuras pequeñas (menores a 1 longitud de onda) [16].

2.3.5. ABSORCIÓN

La absorción es el proceso por el cual la energía mecánica cargada por el pulso, se convierte en calor dentro de los tejidos. Los mecanismos exactos de la pérdida de energía aún no están bien entendidos, pero la absorción es la forma más significativa de atenuación en un tejido blando [17].

2. 4. IMPEDANCIA ACÚSTICA

La impedancia ocurre cuando una cierta cantidad de energía se refleja en la interfase de 2 tejidos que difieren en densidad (Tabla 2). La cantidad de energía reflejada incrementa cuando hay una gran diferencia de impedancia entre los tejidos, dando lugar a sombras acústicas. La impedancia acústica (Z) es el producto de la densidad ($\rho = \text{kg/m}^3$) y la velocidad del sonido en el tejido ($c = \text{m/s}$) [18].

Tabla 2. Ejemplos de impedancias acústicas y densidades de tejidos biológicos [18].

Tejido	Densidad (kg/m^3)	Impedancia (Rayles)
Aire y otros gases	1.2	0.0004
Tejido graso	952	1.38
Agua	1,000	1.48
Riñón y tejidos blandos	1,060	1.63
Hígado	1,060	1.64
Músculo	1,080	1.70
Huesos	1,912	7.8

2.5. EL ULTRASONIDO

El sonido se divide en infrasonido, sonido audible y ultrasonido. El infrasonido posee una frecuencia menor a 20 Hz. El sonido audible, que es el sonido que los humanos podemos escuchar, posee una frecuencia aproximada de 10 Hz a 20 kHz. Por otro lado, el sonido con una frecuencia de más de 20 KHz es inaudible al oído humano y es conocido como ultrasonido [19-20].

2.5.1 LA EVOLUCIÓN DEL UTRASONIDO COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO

El empleo del ultrasonido como herramienta de diagnóstico data de los años 1930's. Los hermanos Dussik desarrollaron un método de atenuación diferencial de transmisión para observar el cerebro, aunque su técnica nunca fue desarrollada para la aplicación clínica. Posteriormente, la patente de Firestone para la detección de fallas en metales, se considera la primera técnica de ultrasonido pulso-eco moderna y la base de la imagenología pulso-eco en la medicina. El desarrollo del ultrasonido como la herramienta de diagnóstico que conocemos hoy en día, inició en la segunda guerra mundial. A finales de 1940's y principios de 1950's, se demostró que las interfases tisulares, los tejidos y las piedras vesiculares podían ser diferenciados por ecos ultrasónicos, todos en aplicaciones de ultrasonido modo-A. Posteriormente, Howry y Bliss, y Wild y Reid, construyeron y demostraron los primeros escaneos de ultrasonido modo B. A mediados de 1950's, se descubrieron las aplicaciones del ultrasonido en ecoencefalografías, oftalmología, ecocardiografía, obstetricia y ginecología, etc. A principios de los años setenta y mediados de los ochenta ocurrió la mayor expansión de las capacidades del diagnóstico por ultrasonido. Algunos de los principales avances en la calidad de la imagen fue la introducción de la escala de grises (Kossoff y Garrett en 1972), la capacidad de mostrar imágenes en tiempo real, en el que había una serie de aproximaciones que incluían el escaneo mecánico (Griffith y Henry en 1974), la formación lineal (Bom en 1973), la formación de fase (Somer en 1968, von Ramm y Thurston en 1972), y el escáner de trayectoria de agua (Carpenter y Kossoff en 1977) [21].

2.5.2. EL PRINCIPIO PULSO-ECO

La imagenología por ultrasonido se basa en el principio pulso-eco. Este principio se refiere a lo siguiente: un pulso corto de sonido es transmitido al tejido desde un transductor enfocado, dicho pulso se propaga en el tejido y puede ser reflejado, absorbido o dispersado. Los ecos viajan de regreso al transductor que ha sido "cambiado" a un modo de recepción después de transmitir el pulso. Finalmente, el enfoque del transductor restringe la energía de la onda de sonido propagada a

aproximadamente una línea, en un cierto rango alrededor de la profundidad focal [22].

2.5.3. TIPOS DE ULTRASONIDO

Existen 4 tipos de visualizadores de imágenes ecográficas (Figura 2):

Modo A- También conocido como escaneo en modo de amplitud. En este tipo de visualización, para cada eco recibido se muestra su amplitud en una pantalla, donde la amplitud se encuentra en el eje de las Y y el tiempo en el eje de las X. Se usa cuando se desea saber la profundidad de la interfase de los tejidos y puede ser empleado terapéuticamente [23]. En esta técnica las amplitudes de las señales ecogénicas que vuelven de las interfases tisulares se muestran en un osciloscopio como una serie de deflexiones de amplitud a lo largo de un eje horizontal [24].

Modo B- También llamado “modo de brillo o luminosidad”, este convierte los ecos recibidos en una serie de puntos que varían en brillo, creando una imagen en escala de grises bidimensional. Este modo es muy empleado en la imagenología médica. En un plano dado, las ondas de sonido son enviadas y recibidas, y después integradas para producir una imagen en escala de grises, dinámica y en tiempo real. El espectro del brillo de escala de grises que es mostrado para cada eco recibido, corresponde a la amplitud de la onda.

Modo M- También conocido como “modo en movimiento”. Este obtiene una serie de señales en modo-B, las cuales son mostradas a lo largo de un eje de tiempo, permitiendo la evaluación del movimiento de la estructura observada. Por lo tanto, a profundidades específicas conocidas desde el transductor, los ecos son traducidos como movimientos de dicha estructura. Esta técnica se emplea para analizar los movimientos del corazón o en obstetricia para aislar los latidos del corazón del feto [25].

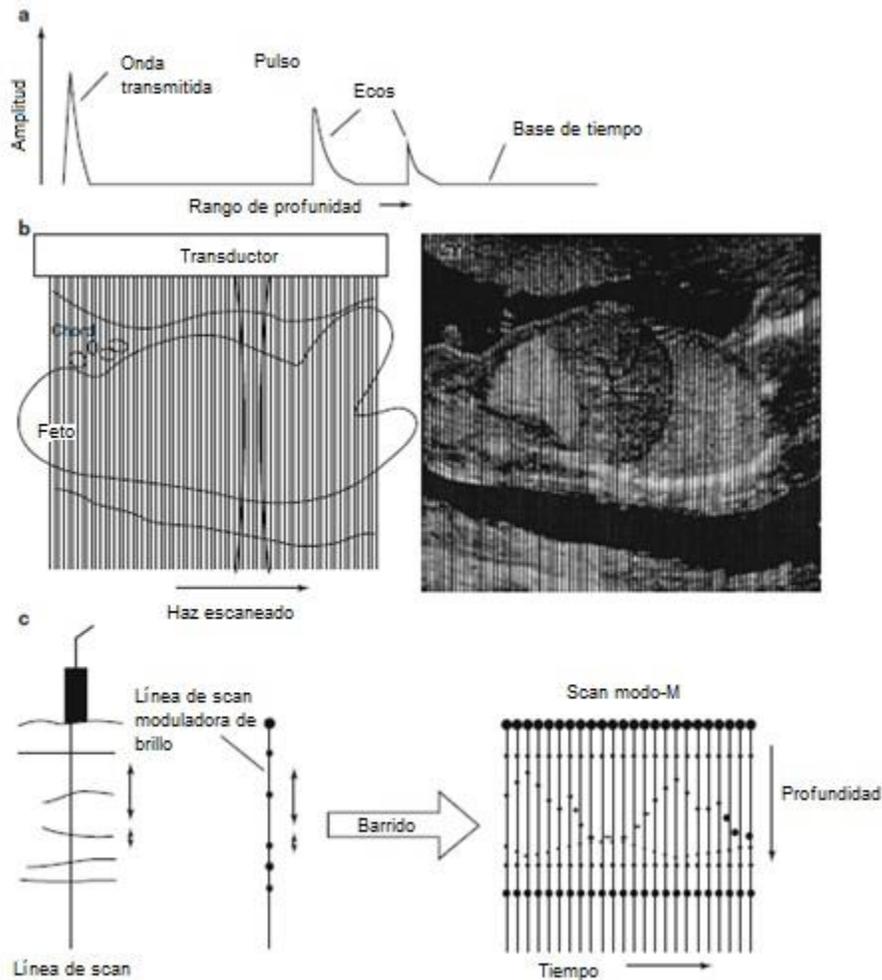


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de visualizaciones por ultrasonido. a) modo-A, b) modo-B, c) modo-M [Modificada de referencia 25].

Doppler- Se basa en el efecto del cambio de frecuencia, provocado por la propagación de la onda después de ser reflejada por un objeto en movimiento. En aplicaciones biomédicas, el haz del transductor se dirige al flujo de la sangre en arterias y venas. Los eritrocitos funcionan como los objetos en movimiento y después como una fuente móvil, por lo que el cambio de frecuencia es proporcional a la velocidad de flujo. Debido a que los eritrocitos tienen una distribución de velocidades a lo largo del ciclo cardíaco, las señales Doppler del flujo sanguíneo son una mezcla de los cambios de frecuencia, proporcional al número de células en cada velocidad. Este se clasifica en *Doppler continuo*, el cual contiene 2 elementos piezoeléctricos en el mismo transductor, uno que transmite continuamente ondas de ultrasonido y

otro que recibe los ecos correspondientes, la señal Doppler puede ser procesada y registrada, o simplemente escuchada con auriculares; y *Doppler pulsado*, en este sólo se reciben los ecos provenientes de una cierta profundidad. Los pulsos son enviados a una cierta frecuencia de repetición que es suficiente para capturar el flujo sanguíneo en diferentes momentos del ciclo cardiaco para reconstruirlo, y de la misma manera la señal puede ser registrada y procesada [26].

Las imágenes Doppler usan codificación de color, donde el rojo indica movimiento hacia el transductor y el azul indica movimiento lejos del transductor. El Doppler de potencia utiliza colores naranja donde la intensidad del color indica la amplitud de las señales de eco desde los dispersores en movimiento [27].

También, existen otros tipos de ultrasonidos novedosos donde el ultrasonido es acoplado a otras técnicas como la Tomografía computarizada con Ultrasonido, Elastografía por ultrasonido, Biomicroscopía ultrasónica, entre otras [26].

2.5.4. EL EFECTO PIEZOELÉCTRICO

El efecto piezoeléctrico lo exhiben ciertos cristales en respuesta a una presión aplicada, desarrollando voltajes a través de las superficies opuestas. Este efecto es el principio usado en los transductores para producir una señal eléctrica en respuesta a las ondas de ultrasonido incidentes. Los cristales empleados clínicamente son titanato de bario, metaniobato de plomo y titanato zirconato de plomo. La aplicación de un voltaje a través de los cristales causa su deformación, ya sea una compresión o extensión dependiendo de la polaridad del voltaje [28].

2.5.5. EL EQUIPO DE ULTRASONIDO

Una de las principales partes de un equipo de ultrasonido son los transductores, a continuación se presentan sus funciones y características.

2.5.5.1 TRANSDUCTORES

Un transductor tiene como función convertir la energía eléctrica en energía acústica, y a la inversa, convertir la energía acústica en energía eléctrica durante la recepción. Como se mencionó anteriormente, los transductores contienen cristales piezoeléctricos que permiten la conversión de sonido en energía y viceversa.

Además de esto, los transductores se componen de otros elementos como se observa en la Figura 3. La cubierta protege los componentes internos y aísla los elementos del operador, además de que está forrada con un escudo eléctrico. El aislador acústico previene las vibraciones en caso de que se induzca un voltaje eléctrico y el cable permite la conexión electrónica entre el cristal y el sistema. La capa de unión incrementa la eficiencia de la energía del sonido transferida entre el elemento y el paciente. El material amortiguador convierte las ondas sonoras en pulsos cortos ayudando a crear imágenes más precisas [29].

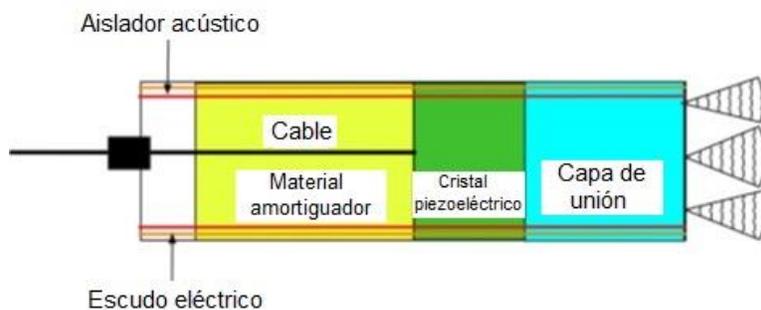


Figura 3 . Partes de un transductor [Modificada de referencia 29]

Los transductores se clasifican en 3 tipos principalmente:

- i) **Transductor lineal.** Este tipo de transductor consiste en una matriz lineal de hasta 512 elementos piezoeléctricos que se activan electrónicamente en grupos. Este envía hacia el tejido ondas de ultrasonido paralelas entre sí que producen una imagen rectangular y en cada nivel de profundidad tisular permanecen constantes el ancho de las líneas de la imagen y su densidad. Una ventaja que posee es la buena resolución espacial cercana al transductor, es por ello que los transductores lineales se utilizan preferentemente a altas frecuencias (5-10 MHz) para el diagnóstico de enfermedades de los tejidos blandos y la glándula tiroides [24].
- ii) **Transductor sectorial.** Genera una imagen en forma de abanico que es muy estrecha en las proximidades del transductor y que se va haciendo cada vez más ancha a medida que aumenta la profundidad de penetración. Este tipo de transductor trabaja a frecuencias más bajas (2-3 MHz), lo que le permite una mayor penetración, y se aplica sobre todo

en cardiología. La desventaja de este tipo de transductor es la disminución de la resolución a medida que aumenta la profundidad.

- iii) **Transductor convexo.** Es un transductor mixto entre los 2 tipos de transductores descritos anteriormente. En este caso la forma de la imagen en el monitor se asemeja a un filtro y combina una buena resolución cercana con una resolución relativamente aceptable en profundidad. La principal ventaja de la superficie de acoplamiento ligeramente convexa del transductor, reside en la posibilidad de desplazar el aire intestinal que degrada la calidad de la imagen mediante un aumento paulatino de la presión del transductor sobre la piel. Sin embargo, la resolución disminuye a medida que aumenta la profundidad. Este transductor se aplica en la ecografía de abdomen con frecuencias de 2.5-5 MHz [30].

2.5.5.2. PROCESO DE FORMACIÓN DE UNA IMAGEN POR ULTRASONIDO

El proceso para la formación de una imagen por ultrasonido conlleva diversos pasos. En primer lugar, los cristales piezoeléctricos de un transductor vibran cuando una corriente eléctrica pasa a través de este y emiten ondas sonoras de cierta frecuencia. Posteriormente, dichas ondas son transmitidas a través del cuerpo, y reflejadas de vuelta en la interfase del tejido, para ser recibidas de nuevo por los cristales del transductor, los cuales crean una corriente eléctrica para producir una imagen (Figura 4). La cantidad de sonido reflejada será proporcional a la diferencia de impedancia y el intervalo de tiempo entre el envío y recepción del eco de vuelta, lo que determina la profundidad de la interfase del tejido [31].

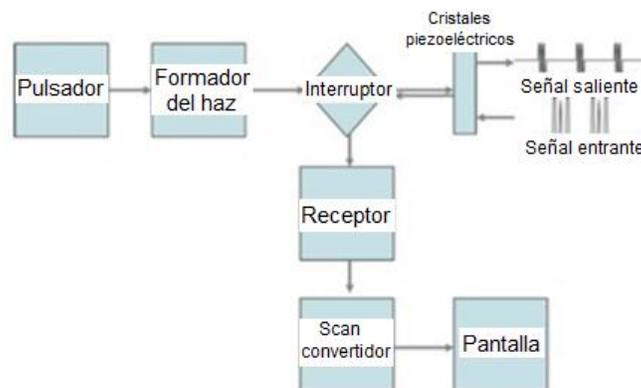


Figura 4. Proceso de formación de imagen por ultrasonido [Modificada de referencia 11].

2.5.5.3. LA FUNCIÓN DE LOS PÍXELES EN LA FORMACIÓN DE LA IMAGEN

Además de generar ondas ultrasónicas y descargar los pulsos en el medio circundante, la tarea central del sistema de ultrasonido es la conversión de las señales de eco de las ondas sonoras, en píxeles en el monitor. En esta etapa final, la energía eléctrica recuperada, crea señales en función de su intensidad en una escala de grises (tonalidades de negro y blanco). Cuanto más intensa sea la señal del eco, más brillante será el valor de gris correspondiente; una señal muy débil generará píxeles negros o gris oscuro. Finalmente, los píxeles combinados dan lugar a una imagen en el monitor [32].

2.6. ECOGENICIDAD

La ecogenicidad se define como la habilidad de reflejar las ondas de ultrasonido en el contexto de los tejidos circundantes. Siempre que exista una interfase de los tejidos con diferentes impedancias, será visible una diferencia en el contraste de la imagen observada en la pantalla. En base a la ecogenicidad, una estructura puede ser clasificada como hiperecoica (blanca), hipoecoica (gris) y anecoica (negra) [33].

2.7. LOS AGENTES DE CONTRASTE DE ULTRASONIDO

Los agentes de contraste de ultrasonido (ACUs) son herramientas para el mejoramiento de la sensibilidad del ultrasonido, a continuación se presentan sus principales propiedades y características.

2.7.1. PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ACUs

Los ACUs son definidos como partículas que contienen un gas o un precursor generador de gas en su interior. Estos son estabilizados por diferentes materiales de pared como surfactantes, proteínas, lípidos o polímeros (Figura 5), con la finalidad de prolongar el tiempo de vida del gas en el torrente sanguíneo, pues las diferencias ópticas y acústicas entre el material de la pared y el gas del interior, pueden conducir a cambios drásticos del tiempo de vida, la respuesta y el mecanismo acústico, dando lugar a la destrucción de las partículas ecogénicas.

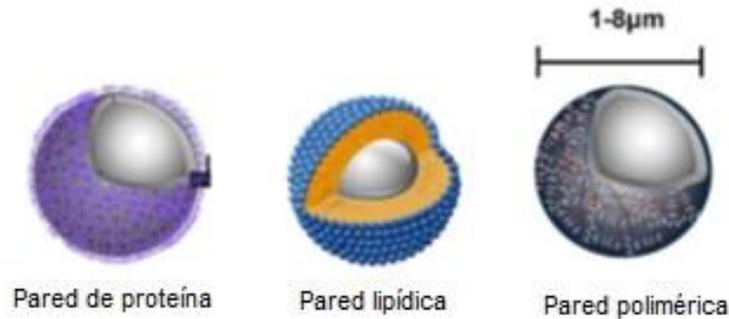


Figura 5. Agentes de contraste de ultrasonido [Modificada de referencia 37].

Los gases que contienen en su núcleo generalmente son aire o gases pesados bioinertes como perfluorocarbonos (PFCs), hexafluoruro de azufre y nitrógeno. Por lo tanto, estas partículas son ecogénicas debido a que pueden responder a la energía de ultrasonido aplicada desde el exterior, dando lugar a la amplificación de las señales de eco para generar una imagen por ultrasonido [34-36].

El tamaño de los ACUs suele ser de 1-8 μm para el uso diagnóstico; sin embargo, existe un compromiso entre el tamaño de partícula y la intensidad del eco producido. Mientras las partículas ecogénicas micrométricas presentan fuertes señales de eco, estas exhiben una persistencia del eco y tiempo de vida en el cuerpo muy cortos. Además, en ocasiones su dimensión no permite la extravasación desde el vaso sanguíneo al tejido circundante. Por otro lado, se ha determinado que las nanopartículas ecogénicas muestran una distribución deseable en el cuerpo y una extravasación efectiva, pero no pueden generar señales de eco lo suficientemente intensas para crear una buena imagen [37].

2.7.2 MECANISMO DE CONTRASTE DE LOS ACUs

Una vez administrados, los ACUs actúan como objetos que reflejan las ondas ultrasónicas, debido a la diferencia de impedancia entre los gases y la sangre, o los tejidos [38]. Una característica única de los agentes de contraste es que interactúan con las ondas sonoras, forman cavitaciones, oscilan, se contraen y expanden, y resonan a una frecuencia que depende primordialmente del tamaño de las burbujas, posteriormente éstas se vuelven transmisoras por sí mismas. Su respuesta al sonido es altamente no lineal, generando ondas de sonido armónicas y sub-armónicas. Las señales armónicas pueden ser fácilmente separadas de la señal

de retrodispersión de frecuencia de los tejidos. El análisis de estas armónicas, permite la obtención mejorada de la imagen, lo que incrementa drásticamente el contraste ACUs-tejido [39-42].

2.7.3. TIPOS DE AGENTES DE CONTRASTE

Los agentes de contraste para ultrasonido se pueden clasificar de acuerdo al tipo de núcleo que presenten:

2.7.3.1. AGENTES DE NÚCLEO LÍQUIDO

Están compuestos por un núcleo líquido generalmente de perfluorocarbonos (PFC), y estabilizados por lípidos, polímeros, surfactantes o albúmina, presentando un tiempo de circulación largo. Su mecanismo se basa en que la irradiación del ultrasonido con una suficiente presión de amplitud, o su punto de ebullición menor a la temperatura corporal, inducen el cambio de fase de líquido a gas provocando que el contraste por ultrasonido se vea mejorado satisfactoriamente [43-44]. Ejemplos de PFC son: decaflorobutano, dodecafluoropentano, perfluorohexano, octafluoropropano, etc. [45]. Estos agentes son biocompatibles debido a que los gases perfluorocarbonados son fácilmente exhalados.

Aunque las burbujas generadas tienen un tamaño de gota de aproximadamente 5 veces al diámetro inicial, su tamaño predecible cambia rápidamente debido a la difusión del gas y a la coalescencia de las burbujas, haciendo a estas partículas óptimas para la imagenología por ultrasonido [46].

2.7.3.2. AGENTES DE NÚCLEO GASEOSO

Se puede emplear un gas o la combinación de varios gases para la formación de este tipo de agentes. Generalmente se usa aire, nitrógeno, perfluorocarbonos gaseosos como octaperfluoropropano, perfluoropropano y perfluorobutano, hexafluoruro de azufre, o gases pesados, que son menos solubles al agua, asegurando un mayor tiempo de circulación [47]. Las composiciones de su pared incluyen polímeros, gelatina, fosfolípidos, lípidos, surfactantes, galactosa/ácido palmítico y albúmina [48].

2.7.3.3 AGENTES CON NÚCLEO DE GAS FORMADO *IN SITU*

Recientemente, se han desarrollado nanopartículas poliméricas generadoras de gas (Figura 6). Estos sistemas no encapsulan un gas precursor, sino que ocurre la escisión de las cadenas laterales de carbonato presentes en su superficie mediante hidrólisis, empleando poliésteres con cadenas laterales de carbonato (Poli(BL-Po)), los cuales son sintetizados por copolimerización de la γ -butirolactona y óxido de propileno. Como consecuencia, ocurre la formación de nanoburbujas de CO_2 las cuales se expanden o coalescen para formar microburbujas, y estas últimas resonan bajo un campo de ultrasonido. La generación de CO_2 , también puede ocurrir al encapsular CaCO_3 en nanopartículas de PEG-PAsp (Polietilenglicol-b-Poli(L-ácido aspártico)), que al encontrarse en un pH como el de un tejido tumoral, generan burbujas de CO_2 , permitiendo el diagnóstico [2,49].

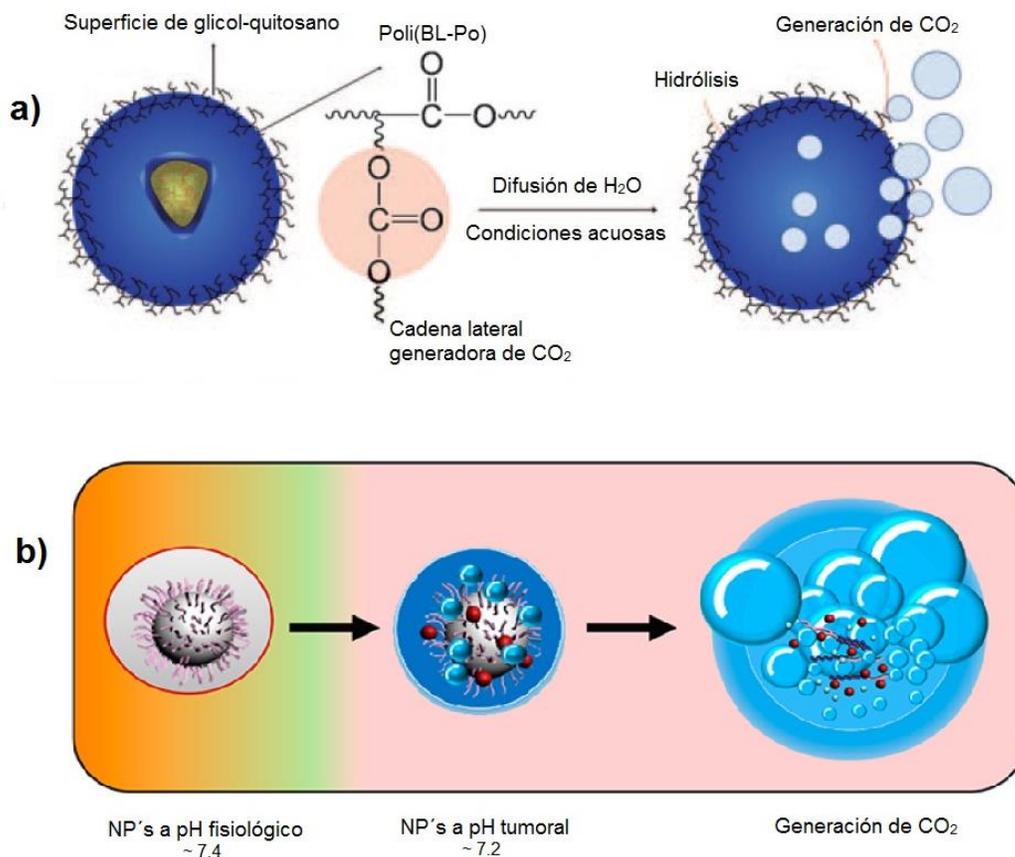


Figura 6 . Representación esquemática de nanopartículas generadoras de CO_2 *in situ* mediante a) la hidrólisis de las cadenas poliméricas, b) efecto del pH [Modificada de referencias 2,49].

2.7.4. AGENTES DE CONTRASTE EN EL MERCADO

Más de 10 diferentes agentes de contraste se han desarrollado comercialmente (Tabla 3), pero sólo Optison™ (micropartículas de albúmina que contienen perfluoropentano), Definity™ (una suspensión inyectable de micropartículas lipídicas de perfluoropentano), e Imagent® (micropartículas de fosfolípidos conteniendo perfluoropentano) han sido aprobados por FDA para su administración intravenosa y sólo en aplicaciones cardíacas [47,50].

Tabla 3. ACUs desarrollados comercialmente en la actualidad [47,50].

Agente	Pared	Núcleo	Tamaño (µM)
Albunex	Albúmina	Aire	4.5
Echogen	Surfactantes	Perfluoropentano	2-5
Sonogen	Surfactantes	Perfluoropentano	2-5
Optison™	Albúmina	Perfluoropentano	4.7
Definity™	Fosfolípidos	Perfluoropentano	1.5
Imagent®	Lípidos/Surfactantes	N ₂ /Perfluorohexano	6
Sonovue®	Fosfolípidos	Hexafluoruro de azufre	2.5
Quantison™	Albúmina	Aire	-
MP1950	Lípidos	Decafluorobutano	2
PESDA	Albúmina	Decafluorobutano	4.7
BR14	Lípidos	Perfluorobutano	2.6
Levovist	Lípidos/Galactosa	Aire	2-4
Bisphere™	Poliláctico/Albúmina	N ₂	3
Sonazoid	Lípidos/Surfactantes	Perfluorobutano	2.2
Sonavist	Cianoacrilato	Aire	-

2.8. LA NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología se refiere a la fabricación de nuevos materiales en dimensiones de nanoescala, de 1-1000 nm. La aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico o monitoreo de enfermedades ha ganado campo en la nanomedicina, y los nanosistemas que pueden ser diseñados para tener diversas composiciones, poseen propiedades físicas y biológicas únicas, que pueden ser aprovechadas para superar las limitaciones que se han presentado en la imagenología en los últimos años [51].

Las características que debe poseer un agente de contraste nanoparticulado es que debe ser dispersado fácilmente y estable en una gran variedad de ambientes *in vivo*, no debe ser afectado por polaridad de disolventes, fuerza iónica, pH o temperatura, deben exhibir enlaces no específicos y resistentes al sistema reticuloendotelial, y ser programados para los mecanismos de depuración, debe generar una buena calidad de contraste, y presentar tiempos de circulación suficientemente largos en la sangre al ser administrado intravenosamente. Idealmente, debe ejercer su efecto a dosis bajas y ser depurado de forma segura del cuerpo [52].

Una de las mayores ventajas de los ACUs nanométricos es que pueden ser capaces de extravasar a través de los capilares de tumores fenestrados, y por lo tanto, acumularse pasivamente en tejidos tumorales [53].

Las nanopartículas pueden ser clasificadas en: nanopartículas lipídicas sólidas, de pared lipídica, liposomas de pared compuesta por fosfolípidos, y nanopartículas poliméricas divididas en nanoesferas que son sistemas matriciales poliméricos, y nanocápsulas, las cuales son sistemas vesiculares en donde el agente es rodeado por una membrana polimérica [54].

Entre las ventajas de las nanopartículas poliméricas se incluye la extensión del tiempo de circulación del agente en el cuerpo, mejoran su estabilidad, logran una distribución uniforme en el sitio objetivo y una alta eficiencia de encapsulación del agente. Si son modificadas en su superficie, pueden incrementar su interacción con el sitio de acción. Pueden ser preparadas con polímeros biodegradables y biocompatibles (aprobados por FDA) y ser administrados intravenosamente de forma segura [55].

2.8.1. LA APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO POR ULTRASONIDO

Un agente de contraste ideal para uso clínico debe ser biodegradable y poseer una baja toxicidad mientras se produce una fuerte señal para la obtención de la imagen. Uno de los principales obstáculos de las nanopartículas en el diagnóstico por ultrasonido (Figura 7b), es que su tamaño compromete la intensidad de la señal ecogénica a diferencia de las micropartículas (Figura 7a), sin embargo, las nanopartículas presentan una distribución efectiva [35].

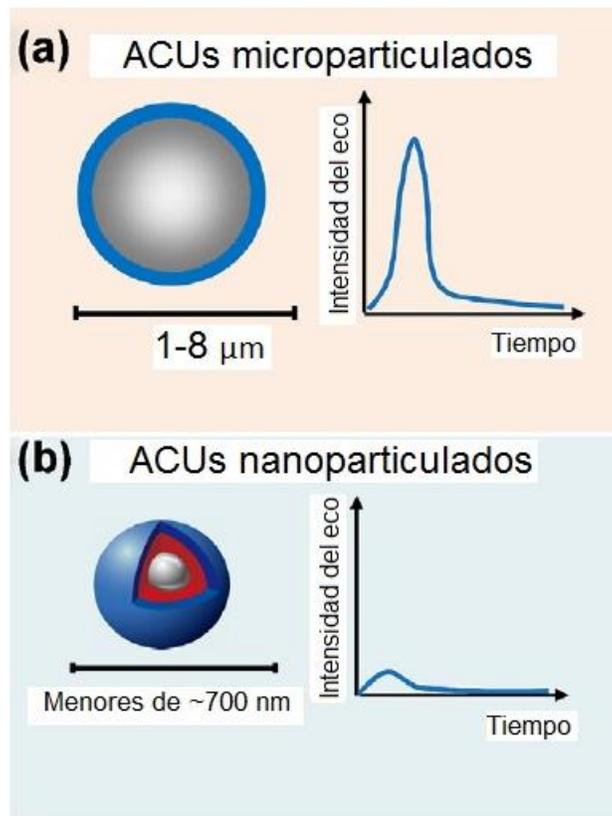


Figura 7. Intensidades de la ecogenicidad producida por ACUs de diferente tamaño de partícula [Modificada de referencia 35].

La estructura neovasculatura de los tumores está caracterizada por una membrana basal incompleta, una pared delgada y alta permeabilidad debido a la ausencia de una capa de músculo liso [56].

Se ha reportado que la mayoría de los tumores tienen un tamaño de poro de <780 nm. El tamaño de poro depende del tipo de tumor. Los agentes micrométricos son inyectados parenteralmente, y al poseer un tamaño de 1-8 μm de diámetro

permanecen en la vascularización hasta que son eliminados del cuerpo por una variedad de mecanismos. Por otro lado, los agentes de contraste nanométricos tienen el potencial de ser dirigidos a tejidos cancerosos al ser lo suficientemente pequeños para atravesar los vasos que alimentan el tumor, y localizarse en el sitio de la enfermedad a través del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) (Figura 8) [57-59].

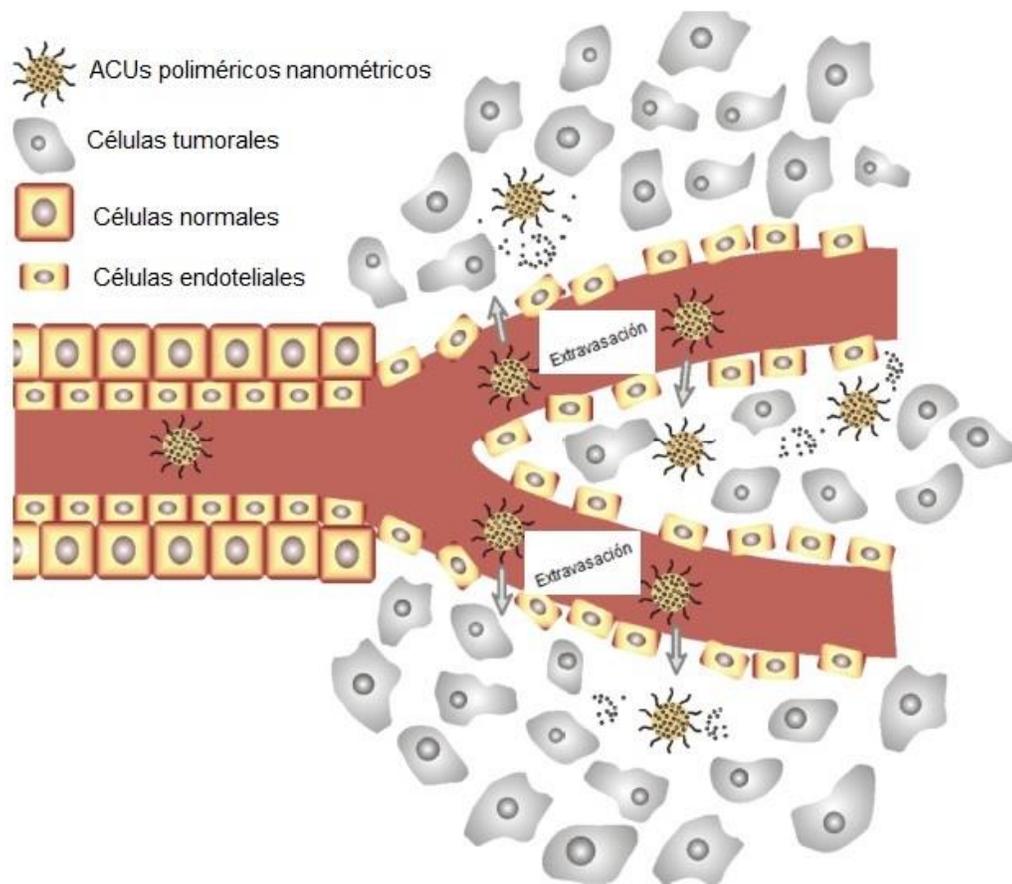


Figura 8. Efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Extravasación de ACUs nanométricos a través un tumor [Modificada de referencia 59].

2.9. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

A continuación, se describen los métodos de preparación de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros preformados más comúnmente utilizados:

- i) **Emulsificación-difusión de disolvente-** En este método el polímero es disuelto en un disolvente parcialmente miscible al agua. Las gotas dispersadas son después diluidas usando una fase acuosa que contiene al estabilizante. Posteriormente, a través de la emulsificación se producen gotas de una emulsión aceite/agua. La difusión del disolvente orgánico a partir de las gotas de la fase dispersa da lugar a la condensación de los materiales dentro de la gota, provocando la formación de las nanopartículas. Finalmente, el disolvente es eliminado por evaporación o filtración, dependiendo de su punto de ebullición, causando una disminución en el tamaño de partícula. Es un método altamente reproducible, produciendo índices de polidispersión significativamente bajos comparado con otros métodos [60].
- ii) **Nanoprecipitación-** También conocido como desplazamiento de disolvente. Este método requiere 2 disolventes que sean miscibles uno con el otro. Generalmente el polímero y el activo son solubles en la primera fase (disolvente), pero no en la segunda (no-disolvente). Cuando la primera fase es adicionada a la segunda, la rápida desolvatación del polímero da lugar a la precipitación de nanopartículas. Con este método se logra una eficiencia de encapsulación del 94-99%. Este método es rápido, simple y reproducible para sintetizar nanocápsulas y nanoesferas a una baja concentración de polímero [61].
- iii) **Emulsificación- evaporación de disolvente-** Este método se divide en:
 - a) *Método de emulsión simple*, en el cual se prepara una emulsión aceite/agua, para encapsular activos hidrófobos o poco solubles en agua. En la fase orgánica, se disuelve una cantidad apropiada de polímero en un disolvente orgánico volátil como diclorometano, cloroformo o acetato de etilo, posteriormente el activo es adicionado a esta solución, dando

lugar a una dispersión. La dispersión que contiene el polímero y el fármaco, es adicionado a una solución acuosa que se encuentra en agitación constante, la cual presenta estabilizantes como polivinil alcohol (PVAL), Polisorbato 80, Poloxámero 188, generando una emulsión estable. El disolvente orgánico es evaporado después mediante agitación magnética o mediante presión reducida.

b) *El método de doble emulsión:* en esta técnica una cantidad adecuada de activo se disuelve en la fase acuosa seguido de su adición simultánea a una fase orgánica en agitación vigorosa (compuesta por el polímero disuelto en disolventes orgánicos volátiles como acetato de etilo, cloroformo o diclorometano). Una vez formada la emulsión primaria agua/aceite, esta es adicionada a una segunda disolución acuosa, seguido de una agitación simultánea y permitiendo después la evaporación del disolvente. Ambas técnicas son escalables, son aplicables a fármacos liposolubles y requieren un exceso de energía durante la homogenización [62].

iv) **Salting out-** Se basa en la formación de una emulsión aceite/agua compuesta por una fase acuosa primaria que contiene el estabilizante y una alta concentración de sal (como cloruro de magnesio hexahidratado). El polímero es disuelto en un disolvente miscible al agua como acetona o tetrahidrofurano. Debido a la presencia de una alta concentración de sal, no hay una difusión del disolvente en la fase acuosa. La adición rápida de una gran cantidad de agua a la emulsión aceite/agua reduce la fuerza iónica y da lugar a la migración del disolvente orgánico miscible al agua hacia la fase acuosa, induciendo la formación de nanopartículas sólidas. En este método las partículas deben ser purificadas para remover la sal y el disolvente antes de ser utilizadas [63].

III. JUSTIFICACIÓN

Los agentes de contraste para ultrasonido (ACUs) son definidos como microburbujas de gas estabilizadas por una pared de lípidos, proteínas, polímeros o surfactantes, que actúan mejorando la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico por ultrasonido, mediante la reflexión acústica causada por la compresibilidad y desajuste de impedancia del gas dentro de las burbujas [64]. Los ACUs deben presentar estabilidad durante la biocirculación y acumulación específica en los tejidos, las señales de eco deben persistir el tiempo suficiente para observar la región de interés, presentar un tamaño pequeño para extravasar desde las venas a los tejidos, baja solubilidad y difusión del gas encapsulado, espesor de la pared adecuado y elasticidad para controlar el comportamiento de atenuación del ultrasonido [65].

El tamaño de partícula de estos sistemas es una característica muy importante [66]; idealmente los ACUs deben presentar un diámetro de 1-8 μm , para atravesar los pulmones, permitiendo obtener imágenes de diversas áreas. Para penetrar más allá de la vasculatura, el agente requiere tener un tamaño menor, con diámetros que alcancen el rango nanométrico. El tamaño de poro de un tumor dependiendo del tipo, localización y estado, es $<780\text{ nm}$, por lo que se ha comprobado que sólo los agentes de tamaño nanométrico pueden penetrar en el intersticio, lo que les permite ser de utilidad en el diagnóstico de cáncer y monitoreo del avance de la terapia [35, 37, 67].

Recientemente, se han desarrollado ACUs de pared a base de polímeros biodegradables, los cuales además de ser biocompatibles, están aprobados por la FDA, pues pueden ser hidrolizados en el cuerpo humano en monómeros no tóxicos [64]. Se ha comprobado que una pared polimérica les ayuda a presentar una gran estabilidad física y química, por lo que pueden preservar la ecogenicidad por un tiempo más prolongado [68]. El estudio y desarrollo de sistemas nanoparticulados como agentes de contraste tiene como propósito mejorar el diagnóstico oportuno de diversas patologías incluyendo el cáncer, debido a que su incidencia en la población ha crecido en los últimos años [53, 56, 59].

IV. HIPÓTESIS

La preparación de distintos sistemas nanoparticulados poliméricos huecos, mediante el método de emulsificación-difusión empleando diferentes agentes porógenos, que posean un tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y morfología adecuados, podrán ser empleados como agentes de contraste que mejoren el diagnóstico por ultrasonido, al evaluar su ecogenicidad *in vitro* empleando un ultrasonido modo B.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Preparar sistemas nanoparticulados poliméricos huecos mediante el método de emulsificación-difusión, empleando diferentes tipos de agentes porógenos, caracterizarlos y evaluar su ecogenicidad *in vitro* a través de un ultrasonido modo B, para analizar su uso como potenciales agentes de contraste para el diagnóstico por ultrasonido.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Elegir los materiales y el método de preparación de los sistemas nanoparticulados poliméricos huecos.
2. Optimizar las condiciones de preparación de los sistemas nanoparticulados mediante un diseño experimental Box-Behnken, con tres factores y tres niveles, para evaluar los efectos de la cantidad de agente porógeno, porcentaje de estabilizante y velocidad de agitación sobre las propiedades fisicoquímicas y la ecogenicidad de los sistemas.
3. Preparar los sistemas nanoparticulados poliméricos huecos mediante el método de emulsificación-difusión, y caracterizarlos mediante evaluaciones de tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, densidad, calorimetría diferencial de barrido, además evaluar su morfología a través de microscopía electrónica de barrido.
4. Evaluar la ecogenicidad *in vitro* de los sistemas nanoparticulados poliméricos huecos, a través de un ultrasonido modo B, para analizar su uso potencial como agentes de contraste para el diagnóstico por ultrasonido.

VI. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1. SELECCIÓN DE LOS MATERIALES Y EQUIPOS

Tabla 4. Materiales y equipos empleados durante el desarrollo experimental.

Materiales y reactivos	Equipos empleados
Polímeros	
<p>Ácido Poliláctico-co-Glicólico (PLGA 50:50, DLG 4A, Lakeshore Biomaterials, USA)</p> <p>Alcohol Polivinílico (PVAL, Mowiol[®] 4-88, P.M. 31,000 g/mol, Sigma-Aldrich, USA)</p> <p>Grenetina 250 Blooms (Droguería Cosmopolita, México)</p>	<p>Agitador magnético multiplaza (IKA[®] R010, USA)</p> <p>Balanza analítica (Boeco[®] BBC32, Germany)</p> <p>Ultraturrax[®] (IKA Labortechnik, T18 Basic, USA)</p> <p>Rotaevaporador (Laborota[®] Heidolph 4000, Germany)</p>
Reactivos y disolventes	
<p>Acetato de etilo grado analítico (Fermont[®], México)</p> <p>Agua destilada (RiOs[™] distiller, EMD Millipore, USA)</p> <p>Alcanfor sintético (PVO. DAB/BP, Droguería Cosmopolita, México)</p> <p>Naftaleno (Merck[®], Germany)</p> <p>Ciclotetrasiloxano (Droguería Cosmopolita, México)</p> <p>Manitol (J.T. Baker[®], USA)</p> <p>Aceite mineral (Droguería Cosmopolita, México)</p> <p>Fosfato monobásico de potasio (Fermont[®], México)</p> <p>Fosfato dibásico de sodio (Meyer[®], México)</p> <p>Hidróxido de sodio (Fermont[®], México)</p> <p>NaCl (Meyer[®], México)</p> <p>KCl (Meyer[®], México)</p> <p>Marcadores de densidad (Density Marker Beads[®], Pharmacia LKB, Sweden)</p> <p>Percoll[®] (Sigma-Aldrich, USA)</p>	<p>Ultracentrífuga (Optima LE-80K, Beckman Coulter[®], USA)</p> <p>Liofilizadora (Labconco[®], Freezone 6, UK)</p> <p>Contador submicrónico de partículas (Coulter[®] N4 Plus, USA)</p> <p>Zetasizer[®] (Malvern Instruments Nano HS, UK)</p> <p>Calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10, TA Instruments, USA)</p> <p>Microscopio electrónico de barrido (SEM JSM-5600 LV, Japón)</p> <p>Ultrasonido modo B (9668 Plus, Sonolife[®], Shanghai)</p>
	Otros materiales
	<p>Dialysis tubing closures (Sigma-Aldrich[®], USA)</p> <p>Tubos Pen-rose de látex estériles (19.05 mm de diámetro, Holy^{MR}, México)</p> <p>Gel conductor para ultrasonido (Ultrasonic[®], México)</p>

6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

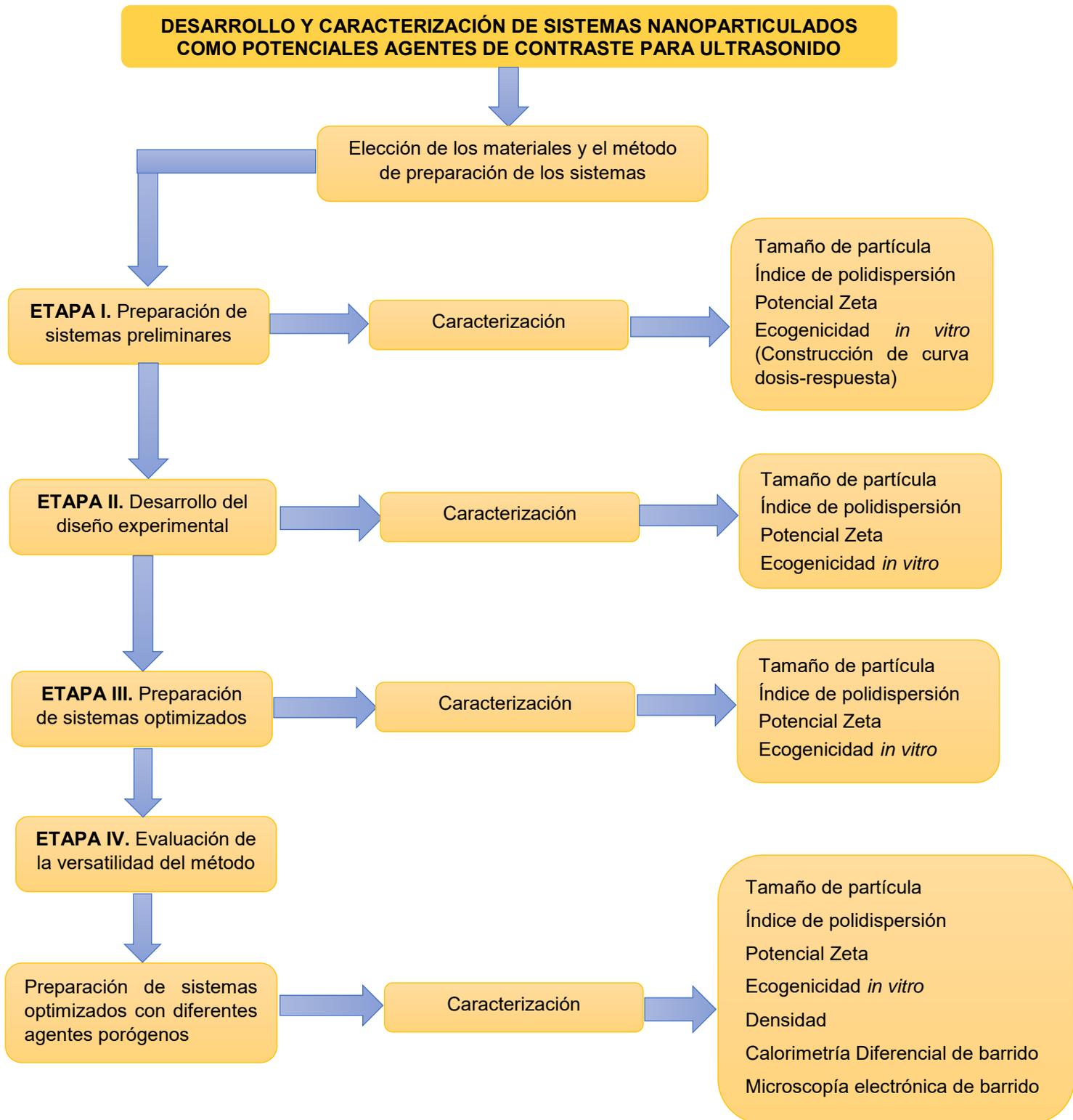


Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento experimental.

6.3. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

En el siguiente apartado se describe el método de preparación y los materiales elegidos para desarrollar los sistemas nanoparticulados huecos.

6.3.1. SELECCIÓN DE LOS MATERIALES Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS (ETAPA I)

Al realizar ensayos preliminares para seleccionar las condiciones de preparación de los sistemas nanoparticulados huecos, se eligieron los siguientes materiales: ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) como polímero, alcanfor como agente porógeno, acetato de etilo como disolvente orgánico y polivinil alcohol (PVAL) como estabilizante. Los sistemas se prepararon mediante el método de emulsificación-difusión, el cual implica el desplazamiento directo del disolvente mediante presión reducida, de acuerdo a lo reportado por Quintanar-Guerrero et al. (1998) [69]. Para llevar a cabo la preparación, el disolvente orgánico acetato de etilo (parcialmente miscible con agua) y agua destilada, fueron saturados mutuamente durante 20 minutos antes de su uso, con la finalidad de asegurar el equilibrio termodinámico de las fases. Posteriormente, 200 mg de PLGA y 40 mg alcanfor fueron disueltos en 10 mL de acetato de etilo previamente saturado, dicha solución orgánica fue emulsificada en 20 mL de una solución acuosa de PVAL al 3% p/v, empleando un agitador de alta cizalla Utraturrax® T18 a una velocidad de agitación de 7000 rpm. En seguida el sistema se llevó a un rotaevaporador, con la finalidad de inducir el desplazamiento directo del disolvente bajo presión reducida. Las nanopartículas fueron recuperadas del pellet obtenido por ultracentrifugación a 15000 rpm durante 20 min. Finalmente, las nanopartículas se liofilizaron durante 48 horas, con la finalidad de que el agente porógeno encapsulado dejara un hueco en la matriz polimérica durante el proceso de liofilización.

Se construyó una curva dosis-respuesta como una pre-evaluación de la ecogenicidad de los sistemas de acuerdo al punto 6.6.6., a las concentraciones: 2.5, 5, 10, 20, 40 y 60 µg/mL en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 a 37°C, desgasificado.

6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL (ETAPA II)

Se utilizó un diseño experimental Box-Behnken con tres factores y tres niveles, con la finalidad de conocer la influencia de los factores en las variables de respuesta

(Tabla 5), obteniendo un total de 18 corridas (Tabla 6). Los datos fueron tratados con el software Statgraphics® Centurion versión XVI.II.

Tabla 5. Factores y niveles analizados en el diseño experimental Box-Behnken.

Variables independientes (Factores)	Niveles codificados de las variables		
	Bajo	Medio	Alto
	-1	0	1
X1= cantidad de agente porógeno (mg)	20	40	60
X2= concentración de PVAL (% p/v)	1.5	3.0	4.5
X3= velocidad de agitación	3500	7000	10500
Variables dependientes (Respuestas)			
Y1= tamaño de partícula	Y2= índice de polidispersión	Y3= potencial zeta	Y4= ecogenicidad

Tabla 6. Sistemas preparados de acuerdo con el diseño experimental Box-Behnken.

DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN			
SISTEMA	POR (mg)	PVAL (% p/v)	VA (rpm)
1	40	3.0	7000
2	40	1.5	10500
3	40	4.5	10500
4	40	3.0	7000
5	40	1.5	3500
6	60	3-0	10500
7	40	3-0	7000
8	40	4.5	3500
9	20	3-0	10500
10	20	4.5	7000
11	60	3.0	3500
12	20	3.0	3500
13	20	1.5	7000
14	40	3.0	7000
15	60	4.5	7000
16	40	3.0	7000
17	40	3.0	7000
18	60	1.5	7000

6.5. OPTIMIZACIÓN Y VERSATILIDAD DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN (ETAPAS III Y IV)

Las condiciones óptimas de preparación fueron establecidas mediante el software Statgraphics® Centurion versión XVI.II. Posteriormente, se procedió a evaluar la versatilidad del método empleando los distintos agentes porógenos: alcanfor, naftaleno y ciclotetrasiloxano. Asimismo, se prepararon nanoesferas de PLGA, con la finalidad de comparar su ecogenicidad.

6.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

A continuación se presentan los métodos de caracterización de los sistemas nanoparticulados.

6.6.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN (PDI)

El tamaño de partícula de los sistemas e Índice de Polidispersión se determinaron por la técnica de dispersión dinámica de la luz mediante el uso de un contador submicrónico (Nanosizer N4 Plus) de rayos láser a un ángulo de 90° por 180 segundos y temperatura de 25°C. Las determinaciones se realizaron por triplicado, al diluir cada sistema en agua destilada.

6.6.2 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, el cual emplea un láser de He/Ne de longitud de onda de 633 nm y 4 Mw. Las lecturas se realizaron por triplicado por cada sistema, empleando como disolvente agua destilada a una temperatura de 25°C y 150-200 kcps.

6.6.3 DENSIDAD

La densidad se determinó mediante un gradiente de sílice coloidal. Se agregaron 100 µL de cada sistema a una concentración de 20 µg/mL, a 9mL de Percoll® al 45% v/v en NaCl 0.15 M. Los sistemas generados se centrifugaron a 15000 rpm durante 3 h. Como referencia, se agregaron 30 µL de los marcadores (Density Marker Beads®, Pharmacia LKB, Sweden) y estos fueron sometidos a las mismas condiciones que los sistemas nanoparticulados. La distancia de las bandas desde el menisco, fueron medidas con un vernier y graficadas, para interpolar las

distancias de cada sistema en la curva creada (Figura 27). Esta evaluación sólo se realizó a los sistemas preparados en la versatilidad del método (ETAPA IV).

6.6.4 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Los sistemas nanoparticulados fueron analizados mediante calorimetría diferencial de barrido en un equipo DSC Q10, TA Instruments, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, con corridas de 0-280°C y flujo de purga de 50 mL/min de N₂, empleando indio como patrón de calibración. Esta caracterización sólo se realizó a los sistemas preparados en la versatilidad del método (ETAPA IV), con el fin de evidenciar la eliminación de los agentes porógenos durante la liofilización.

6.6.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Se tomaron micrografías de los sistemas nanoparticulados, empleando un microscopio electrónico de barrido SEM JSM-5600 LV. Las muestras fueron recubiertas con una película de oro (~20 nm) empleando un dispersor iónico (JFC-1100, JEOL, Japón) y fueron observadas a 15kV, y 10000x, 15000x y 20000x. Sólo se observaron las nanoesferas de PLGA y nanopartículas huecas a base de alcanfor optimizadas preparadas en la versatilidad del método (ETAPA IV).

6.6.6. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ECOGENICIDAD

A continuación se describe el proceso de evaluación *in vitro* de la ecogenidad.

6.6.6.1 PREPARACIÓN DEL *PHANTOM* DE GELATINA

Para simular un tejido *in vitro*, se preparó un *phantom* hecho de gelatina de 250 blooms (20% p/v) en un recipiente de plástico, haciendo pasar un tubo de PVC (policloruro de vinilo) a través de este a 2 cm de la superficie, con la finalidad de dejar una cavidad cilíndrica en su interior al ser retirado del modelo de gelatina sólido (Figura 10).

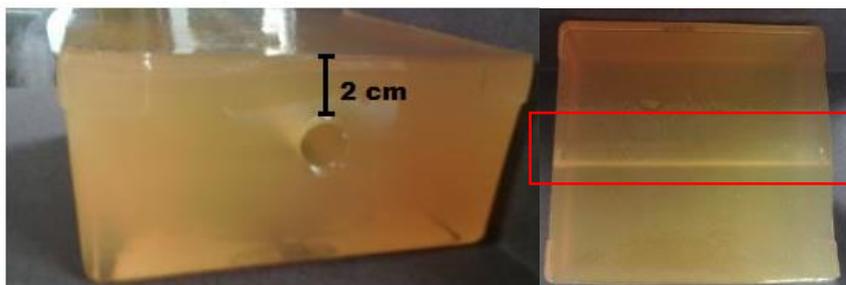


Figura 10. *Phantom* de gelatina preparado para la evaluación de la ecogenidad *in vitro*.

6.6.6.2 EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ECOGENICIDAD

Para llevar a cabo la evaluación *in vitro* de la ecogenicidad en el *phantom* de gelatina, se utilizaron tubos Pen-rose de látex estériles. Estos fueron colocados dentro de la cavidad cilíndrica y selladas por un extremo con un “Dialysis tubing closure”, una vez hecho esto, por el otro extremo se adicionaron uno a uno, los sistemas nanoparticulados a una concentración de 10 µg/mL en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 a 37°C, previamente desgasificado, hasta llenar por completo la cavidad (~40 mL) y finalmente el otro extremo del tubo Pen-rose fue sellado (Figura 11). La concentración empleada para evaluar los sistemas preparados en el diseño experimental fue determinada en la curva dosis-respuesta construida en el punto 6.3.1. de la ETAPA I.

La ecogenicidad *in vitro* fue obtenida mediante la medición cuantitativa de la mejoría de la luminosidad de las imágenes adquiridas en el ultrasonido modo B (Sonolife 9668 Plus), con respecto al blanco (buffer de fosfatos PBS pH 7.4 a 37°C, desgasificado). Se empleó un transductor lineal fijado a una frecuencia de 7.5 MHz, y se calculó el valor promedio de escala de grises dentro de una región de interés (RDI) fijada a 17000-18000 píxeles², en una escala de grises de 0-255. Asimismo, se calculó el porcentaje de mejoría del contraste con respecto al blanco (Ec. 3).

$$\% \text{ mejoría de VPEG} = \frac{(VPEG \text{ muestra} - VPEG \text{ buffer PBS})}{VPEG \text{ muestra}} \times 100 \dots \text{Ec. 3}$$

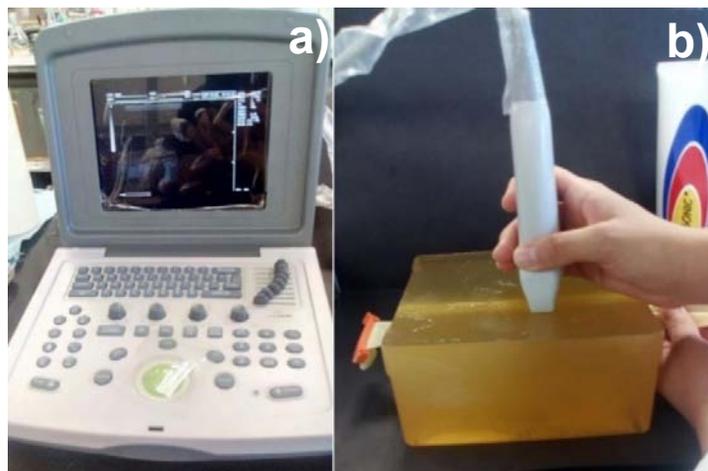


Figura 11. a) Ultrasonido Modo B (Sonolife 9668 Plus), b) medición de la ecogenicidad: *phantom* de gelatina con un tubo penrose en su interior conteniendo los sistemas nanoparticulados.

Las imágenes fueron capturadas y guardadas digitalmente mediante el software Debut Video Capture®, acoplado al ultrasonido modo B (Figura 12).

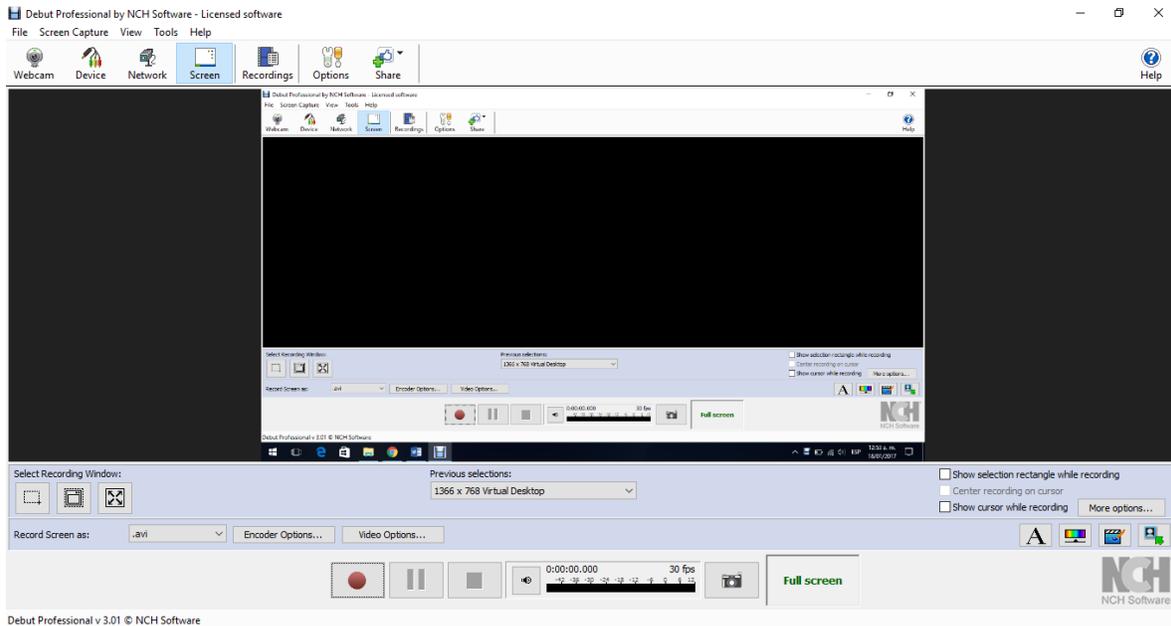


Figura 12. Software Debut Video Capture®.

Las imágenes fueron analizadas empleando el software Image J (64-bit) (National Institute of Health, USA) (Figura 13), con el cual se obtuvo el valor promedio de escala de grises (VPEG) y el histograma correspondiente a cada sistema (ver Anexos I-V).

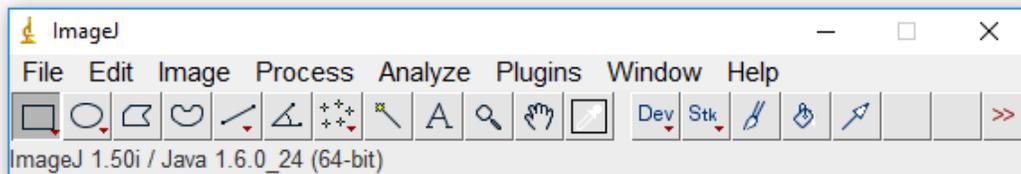


Figura 13. Software Image J (64-bit).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A diferencia de otras modalidades de diagnóstico, el ultrasonido se encuentra ampliamente disponible, es no invasivo y costo-efectivo. La pequeña diferencia de impedancia entre los tejidos impide un diagnóstico claro, por lo que los ACUs son una alternativa para mejorarlo [70].

Los ACUs micrométricos se han usado ampliamente en la imagenología. Sin embargo, estos no pueden atravesar las paredes de los vasos en los tejidos tumorales, por lo que los ACUs nanométricos han mostrado un potencial importante para la imagenología en este campo [71].

En comparación con las micropartículas, las nanopartículas ofrecen diversas ventajas para la imagenología. Su diminuto tamaño, contribuye a un mayor tiempo de circulación y permite la acumulación progresiva en el espacio intersticial de tumores a través del efecto de permeación y retención aumentada (EPR), el cual involucra la extravasación pasiva de las nanopartículas desde la microcirculación, hacia el espacio intersticial del tumor. Hasta la fecha la detección acústica de nanopartículas es un reto, ya que las secuencias de pulso personalizadas y su diseño deben ser mejorados para la detección. Se han desarrollado nanopartículas con núcleo sólido, líquido o gaseoso, encapsulados por surfactantes, lípidos, proteínas o polímeros. Para el desarrollo de un agente de contraste nanoparticulado ideal se debe tener en cuenta que este debe presentar una alta tasa de marginación, y una rápida internalización al tejido blanco. La marginación se refiere a la habilidad de las nanopartículas a escapar del flujo sanguíneo y moverse a las paredes del vaso [72-73].

Los ACUs de pared polimérica presentan muchas ventajas sobre otros materiales, por ejemplo: son más resistentes a las ondas ultrasónicas, ofrecen una estabilidad mecánica y versatilidad química, y por lo tanto un incremento en su tiempo de vida comparado con los de pared lipídica o surfactantes [74-76].

EL PLGA (ácido poli-D,L-láctico-co-glicólico) fue el polímero elegido para el desarrollo de los sistemas nanoparticulados huecos, debido a que es uno de los polímeros biodegradables y biocompatibles más empleado en el área de la

nanomedicina, se degrada en ácido láctico y ácido glicólico a través de la hidrólisis del enlace éster en su estructura, y estos ingresan al ciclo del ácido cítrico, por lo que el material no necesita ser removido después su administración [77-78]. El PLGA forma una pared rígida dando lugar a un largo tiempo de circulación a los ACUs elaborados con este polímero, brindándoles una fuerza mecánica que los hace estables y representan fuertes reflectores del sonido, mejorando el contraste en las imágenes por ultrasonido. Las nanopartículas de PLGA han sido desarrolladas por diversos métodos como emulsificación-difusión, emulsificación-evaporación de disolvente, nanoprecipitación, etc [79-80].

El método de emulsificación-difusión fue empleado para preparar los sistemas nanoparticulados huecos como agentes de contraste para ultrasonido. Este método involucra la emulsificación de una fase orgánica compuesta por un disolvente parcialmente miscible con el agua (eg. acetato de etilo, acetato de butilo, metil etil cetona, alcohol bencílico, carbonato de propileno) que contiene al polímero, y una fase acuosa conteniendo al estabilizante, empleando un homogeneizador. La subsecuente adición de agua al sistema, causa la difusión del solvente a la fase externa, lo que provoca la formación de las nanopartículas, y el desplazamiento del disolvente se lleva a cabo mediante presión reducida [69, 81-82].

Durante muchos años se ha demostrado que las partículas huecas son agentes de contraste efectivos. Existe el reporte de la fabricación de micro- y nanopartículas huecas preparadas por el método de doble emulsión, las cuales encapsulan alcanfor como agente porógeno, que cuando son sometidas al proceso de liofilización, el alcanfor sublima, dejando un hueco en su lugar [83-86]. Bajo este esquema el alcanfor fue empleado como agente porógeno, considerando la liofilización como un paso fundamental para la formación de las nanopartículas huecas.

Por otro lado, el alcohol polivinílico (PVAL) es un polímero sintético soluble en agua, el cual fue elegido como estabilizante, debido a que reduce la tensión interfacial y actúa como un coloide protector que se adsorbe en la superficie las nanopartículas durante la emulsificación, estabilizándolas [87].

Una vez hecha la selección de los materiales y el método de manufactura, se prepararon como “sistemas preliminares” nanopartículas huecas a base de alcanfor (NAI), empleando 200 mg PLGA, 40 mg alcanfor, 3% p/v de PVAL y 7000 rpm como velocidad de agitación utilizando un agitador de alta cizalla Utraturrax® T18 (ETAPA I). Así mismo, se prepararon nanoesferas de PLGA (NE) a las mismas condiciones. La Tabla 7 muestra los resultados de caracterización de ambos sistemas.

Tabla 7. Caracterización de las nanopartículas huecas a base de alcanfor (NAI) y nanoesferas de PLGA (NE), como sistemas preliminares.

SISTEMA	TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIAL ZETA (mV)
NAI	337.37 ± 13.15	0.11 ± 0.06	-29.43 ± 0.98
NE	331.90 ± 5.19	0.12 ± 0.03	-28.77 ± 0.96

Promedio ± desviación estándar (n=3)

El primer paso fue determinar su curva dosis-respuesta en base a su ecogenicidad y establecer una comparación entre ambos sistemas. Para evaluar el desempeño en la ecogenicidad por ultrasonido, se requiere un modelo de tejido artificial llamado *phantom*, el cual simula las propiedades de absorción y dispersión de los tejidos biológicos, con el propósito de crear un ambiente clínico más realista [88]. Generalmente, los *phantoms* comerciales son muy costosos, estos pueden alcanzar un precio de hasta 15000-16500 USD [89-90]. Es por ello que en la investigación se hace uso de *phantoms* preparados en el laboratorio, siendo muy útiles para mejorar las habilidades y el éxito de procedimientos de ecografía, sin la necesidad de realizarlos en humanos o animales [91]. Este tipo de *phantoms* deben ser fáciles de fabricar, no tóxicos, reproducibles, reutilizables y baratos [92-93].

En el caso del ultrasonido, es importante tomar en cuenta que las propiedades del *phantom* desarrollado sean similares a los tejidos biológicos. En este trabajo se desarrolló un modelo de gelatina de 250 blooms (unidades de fuerza de gelificación) al 20% p/v, debido a que se ha demostrado que *phantoms* elaborados a base de gelatina de ~200-300 blooms en proporciones ~ 20-30 % p/v, resultan útiles para este tipo de estudios [91, 94-96]. Además, se ha comprobado que sus propiedades como el módulo de Young (2.5-500 kPa), ancho de banda de atenuación (0.2-1.5 db/(cm MHz-)) y velocidad de propagación del sonido (1550-1650 m/s), son

similares a los que presentan los tejidos biológicos, así como un incremento de atenuación lineal con respecto a la frecuencia de ultrasonido [97-98].

Para el análisis de la ecogenicidad se utilizó un transductor lineal, el cual fue colocado en la superficie del *phantom* a 2 cm de distancia de la zona a estudiar, al igual que en otros estudios [99-100]. La frecuencia del transductor se fijó a 7.5 MHz, pues es importante considerar que la frecuencia de resonancia incrementa a medida que el tamaño de partícula disminuye [72]. Para construir la curva dosis-respuesta, las nanopartículas huecas a base de alcanfor (NAI) y las nanoesferas de PLGA (NE) fueron resuspendidas en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 a 37°C previamente desgasificado, con la finalidad de simular las condiciones fisiológicas [84-85], empleando diferentes concentraciones (Tabla 8 y 9).

Se tomaron imágenes de la zona de estudio (cavidad cilíndrica en el modelo) por triplicado, empleando el ultrasonido modo-B. La región de interés (RDI) se fijó en cuadrados de 17000-18000 píxeles² (Figuras 14 y 15). Se obtuvieron los valores promedio de escala de grises (VPEG), los cuales se refieren a las intensidades de contraste de ultrasonido (Anexos I y II) [101], usando el software Image J del National Institute of Health, USA, y se calculó como porcentaje el incremento de las intensidades de contraste en relación al blanco (buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4), como se ha reportado en otros estudios [102-104]. Los resultados se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Resultados de la curva dosis-respuesta de nanoesferas de PLGA (NE).

Concentración µg/mL	Área de RDI (píxeles ²)	VPEG	% MEJORÍA DE VPEG
Blanco (PBS pH 7.4)	17949.67 ± 137.08	75.148 ± 0.19	No aplica
2.5	18159.00 ± 205.65	85.61 ± 0.69	12.22 ± 0.71
5	17989.67 ± 494.05	85.69 ± 0.19	12.30 ± 0.20
10	18317.33 ± 609.12	86.68 ± 1.11	13.29 ± 1.11
20	18696.00 ± 317.32	87.51 ± 0.67	14.12 ± 0.66
40	18042.67 ± 539.24	88.074 ± 0.56	14.67 ± 0.54
60	18133.00 ± 409.85	87.72 ± 0.62	14.33 ± 0.60

Promedio ± desviación estándar (n=3)

Tabla 9. Resultados de la curva dosis-respuesta de las nanopartículas huecas a base de alcanfor (NAI).

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Área de RDI (píxeles ²)	VPEG	% MEJORÍA DE VPEG
Blanco (PBS pH7.4)	17949.67 \pm 137.08	75.15 \pm 0.19	No aplica
2.5	18088.67 \pm 925.45	89.89 \pm 0.60	16.39 \pm 0.56
5	18120.67 \pm 606.79	91.72 \pm 0.44	18.06 \pm 0.39
10	17951.67 \pm 821.83	94.66 \pm 1.16	20.60 \pm 0.98
20	18221.00 \pm 621.27	94.77 \pm 0.29	20.70 \pm 0.24
40	18175.33 \pm 440.39	94.45 \pm 1.05	20.43 \pm 0.88
60	17862.33 \pm 684.32	94.78 \pm 0.71	20.71 \pm 0.59

Promedio \pm desviación estándar (n=3)

Figura 14. Imágenes obtenidas por ultrasonido curva dosis-respuesta de NE.

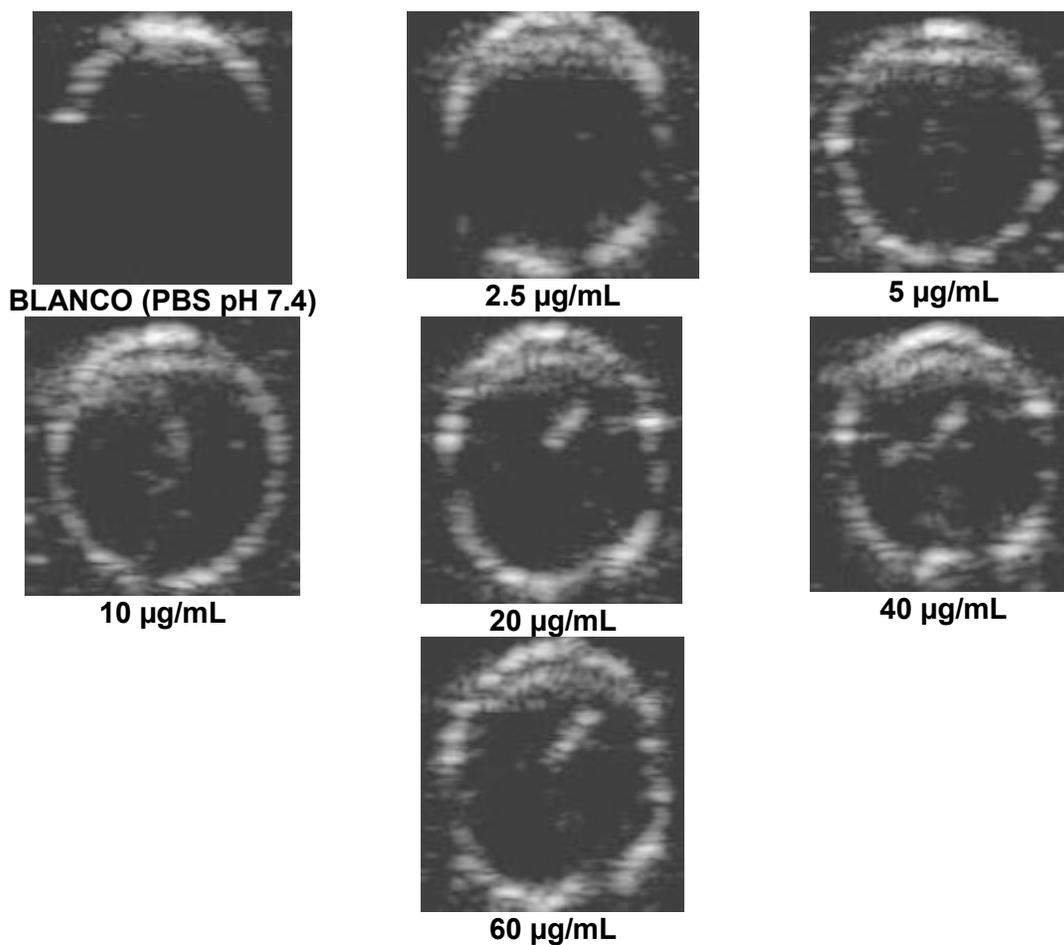
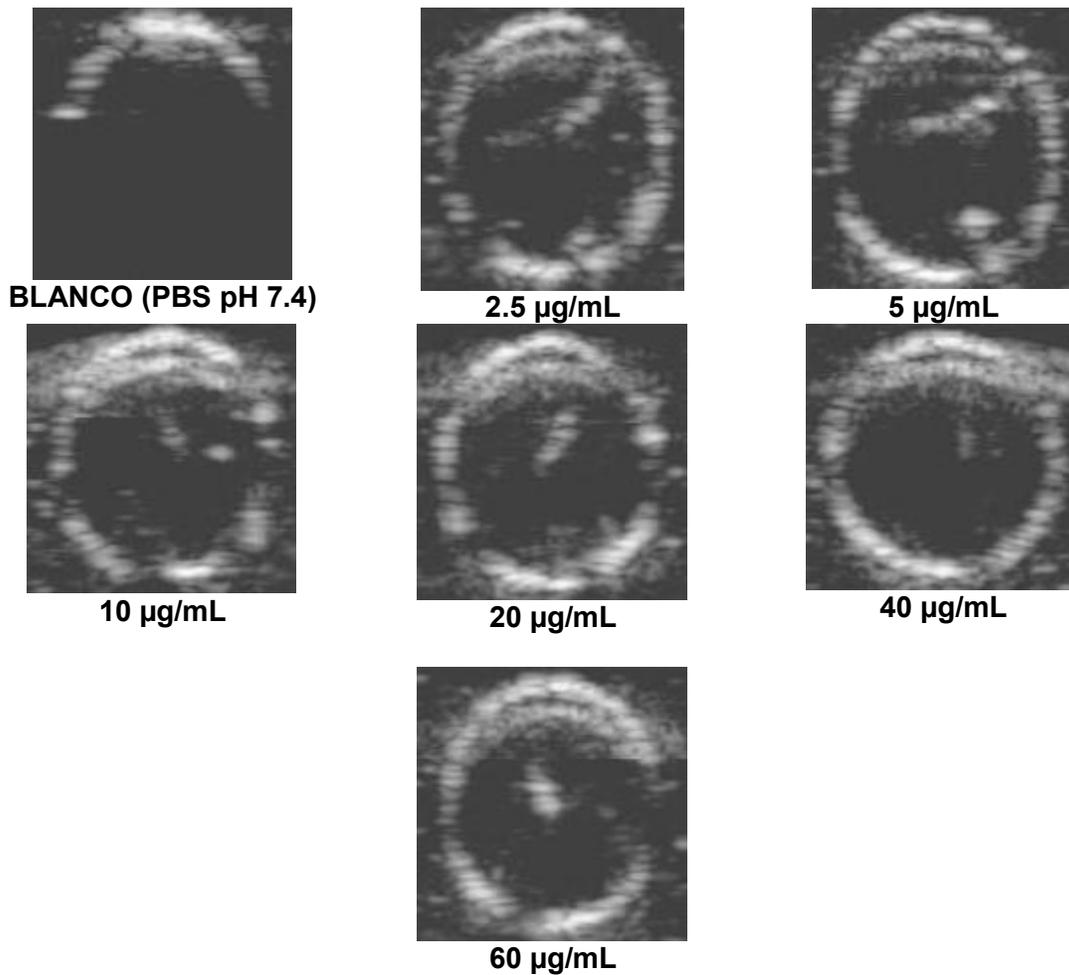


Figura 15. Imágenes obtenidas por ultrasonido curva dosis-respuesta de NAI.



La Figura 16 muestra la curva dosis-respuesta construida, se puede observar que las NE mostraron una menor mejoría del contraste en comparación con las NAI, como se tenía esperado. Además, a una concentración de 10 µg/mL, la mejoría del contraste de las NAI alcanza su punto máximo, y posteriormente se forma una meseta donde la respuesta no muestra un incremento significativo, por lo que la dosis elegida para evaluar sistemas posteriores fue 10 µg/mL, al ser lo suficientemente pequeña para lograr un aumento en el contraste por ultrasonido, ya que al ser administrados por vía intravenosa, se considera que deben ser inyectados en pequeños volúmenes (0.2-2 mL), lo cual está comprobado que es seguro para los pacientes [85,53,105].

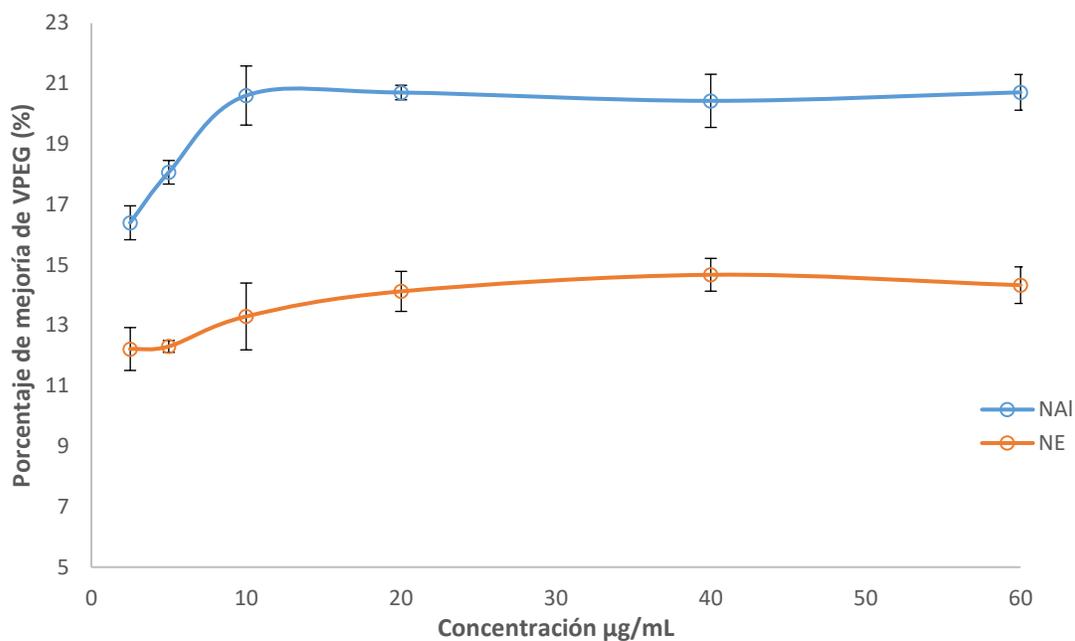


Figura 16. Curva dosis respuesta NAI vs NE.

7. 1 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se llevó a cabo un diseño experimental Box-Benken para determinar los efectos de la cantidad de agente porógeno, porcentaje de estabilizante y velocidad de agitación, en las variables de respuesta: tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y ecogenicidad de los sistemas nanoparticulados (ETAPA II).

Una de las ventajas de este tipo de diseños es que se requieren un menor número de corridas para 3 factores, se pueden evaluar los efectos de los factores en las condiciones de operación, y optimizar la respuesta [106-108]. Los resultados de las 18 corridas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y % de mejoría de contraste (VPEG) de los 18 sistemas preparados de acuerdo al diseño experimental Box-Benhken. Resultados antes y después de liofilizar.

SISTEMA	ANTES DE LIOFILIZAR			DESPUÉS DE LIOFILIZAR					% de mejoría de VPEG respecto al blanco
	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	ÁREA DE RDI (píxeles ²)	VPEG	
1	306.20 ± 4.75	0.19 ± 0.08	-23.72 ± 0.61	322.87 ± 6.27	0.18 ± 0.05	-24.28 ± 0.59	17497.33 ± 739.14	94.65 ± 1.08	20.59 ± 0.90
2	265.00 ± 4.64	0.09 ± 0.08	-24.03 ± 0.96	304.07 ± 0.42	0.02 ± 0.01	-24.63 ± 0.45	17984.00 ± 670.02	91.39 ± 1.12	17.76 ± 1.01
3	217.90 ± 1.78	0.12 ± 0.08	-23.25 ± 0.79	237.30 ± 3.27	0.02 ± 0.01	-24.02 ± 0.82	17399.00 ± 336.01	91.86 ± 1.67	18.17 ± 1.48
4	325.47 ± 3.06	0.03 ± 0.01	-25.28 ± 0.39	348.77 ± 7.15	0.14 ± 0.03	-27.97 ± 0.84	17535.67 ± 402.69	93.96 ± 1.28	20.01 ± 1.09
5	1281.20 ± 14.53	1.50 ± 0.25	-27.77 ± 0.62	1724.37 ± 96.64	1.73 ± 0.39	-30.00 ± 0.91	17904.00 ± 76.63	93.13 ± 0.85	18.27 ± 0.73
6	255.30 ± 1.59	0.12 ± 0.05	-24.28 ± 0.40	273.10 ± 2.43	0.06 ± 0.01	-26.39 ± 1.22	17670.67 ± 404.08	96.03 ± 1.39	21.74 ± 1.14
7	298.00 ± 6.75	0.12 ± 0.07	-24.17 ± 0.72	320.63 ± 2.64	0.02 ± 0.01	-29.27 ± 0.84	17368.00 ± 511.44	94.84 ± 0.92	20.76 ± 0.77
8	717.30 ± 9.15	0.28 ± 0.04	-26.48 ± 1.18	830.53 ± 30.20	0.28 ± 0.04	-29.37 ± 0.33	18225.00 ± 355.67	92.66 ± 0.65	18.89 ± 0.57
9	235.17 ± 1.62	0.09 ± 0.01	-22.00 ± 0.65	240.83 ± 0.25	0.04 ± 0.03	-28.59 ± 0.89	18179.00 ± 432.88	91.09 ± 0.91	17.50 ± 0.83
10	306.00 ± 6.09	0.08 ± 0.02	-17.61 ± 0.63	288.77 ± 0.87	0.09 ± 0.08	-29.02 ± 0.69	17672.33 ± 257.50	90.96 ± 0.69	17.38 ± 0.63
11	1026.07 ± 3.04	0.29 ± 0.07	-24.86 ± 0.49	1031.23 ± 10.19	0.98 ± 0.18	-30.97 ± 0.47	17640.00 ± 606.22	95.80 ± 1.22	21.55 ± 1.00
12	1082.33 ± 6.35	0.31 ± 0.22	-22.78 ± 0.47	978.00 ± 16.92	1.24 ± 0.12	-30.28 ± 0.74	17817.00 ± 135.64	90.66 ± 1.39	17.09 ± 1.27
13	321.53 ± 2.80	0.04 ± 0.03	-29.13 ± 0.59	367.30 ± 3.98	0.11 ± 0.07	-22.67 ± 0.61	18177.00 ± 283.19	90.33 ± 0.20	16.80 ± 0.19
14	313.70 ± 4.16	0.03 ± 0.01	-24.06 ± 0.81	325.17 ± 1.36	0.03 ± 0.02	-24.53 ± 0.71	17911.33 ± 558.37	95.09 ± 1.03	20.97 ± 0.85
15	296.80 ± 6.74	0.11 ± 0.01	-25.58 ± 1.03	297.77 ± 2.22	0.18 ± 0.05	-27.04 ± 1.25	17898.00 ± 427.10	96.79 ± 0.98	22.36 ± 0.78
16	320.33 ± 4.30	0.03 ± 0.03	-28.81 ± 1.10	361.73 ± 5.55	0.11 ± 0.10	-25.68 ± 0.89	18129.67 ± 422.97	95.03 ± 1.61	20.91 ± 1.33
17	320.10 ± 4.79	0.13 ± 0.04	-25.18 ± 1.04	376.30 ± 2.13	0.05 ± 0.04	-27.46 ± 0.98	18000.00 ± 205.56	94.03 ± 0.79	20.08 ± 0.67
18	335.37 ± 2.41	0.09 ± 0.06	-28.11 ± 0.82	359.33 ± 1.22	0.07 ± 0.03	-28.11 ± 0.96	18336 ± 267.45	95.45 ± 2.09	21.24 ± 1.73

Promedio ± desviación estándar (n=3)

La liofilización fue un paso fundamental en el proceso de formación de las nanopartículas huecas. Adicionalmente, está demostrado que el “estado seco” es una condición adecuada para encapsular gases como el aire, en el núcleo de nanopartículas antes de ser resuspendidas en un acarreador líquido previo a su administración [109]. La liofilización consiste en el secado o eliminación de agua de una muestra congelada mediante procesos de sublimación y desorción bajo condiciones de vacío. Este proceso puede generar grietas y fragmentación en la muestra debido a que se produce una alta presión dentro del producto, es por ello que se empleó manitol al 5% p/v como agente crioprotector, ya que ayuda a ordenar las estructuras de agua en el producto, protege a las nanopartículas durante los procesos de congelación y secado, y está aprobado para su inclusión en productos de administración parenteral [110-111]. Así mismo, el proceso de liofilización está recomendado para mantener estables las nanopartículas durante un tiempo prolongado. Sin embargo, cuando los nanopulvos son resuspendidos, debemos asegurar que no formen agregados, y mantengan sus propiedades en la medida de lo posible [112]. Se evaluó el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta antes y después de liofilizar los sistemas nanoparticulados. De acuerdo a la tabla 10, se puede observar que el manitol ejerció su efecto como agente crioprotector, ya que después del proceso de liofilización, las propiedades de las nanopartículas no se vieron modificadas significativamente. Los datos fueron tratados estadísticamente con el software Statgraphics® Centurion versión XVI.II. Las Figuras 17, 18, 19 y 20, muestran los diagramas de superficie de respuesta 3D obtenidos, los cuales se utilizan para lograr una mejor comprensión de las interacciones entre los factores y determinar el nivel óptimo de cada factor para la obtención de la mejor respuesta. Los diagramas trazan las respuestas como una función de 2 de los factores (variables independientes), manteniendo el tercero constante [106], lo que nos muestra el efecto de la cantidad de porógeno, concentración de estabilizante (PVAL) y la velocidad de agitación en las respuestas (tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y % de mejoría de contraste). Adicionalmente, la Figura 21 y el anexo III, muestran las imágenes conseguidas a través del ultrasonido modo-B, y las intensidades de contraste de

ultrasonido, respectivamente, pertenecientes a los 18 sistemas del diseño experimental Box-Benhken y el blanco (buffer PBS, pH 7.4). Los datos VPEG fueron empleados para la obtención de los porcentajes de mejoría de contraste (Tabla 10).

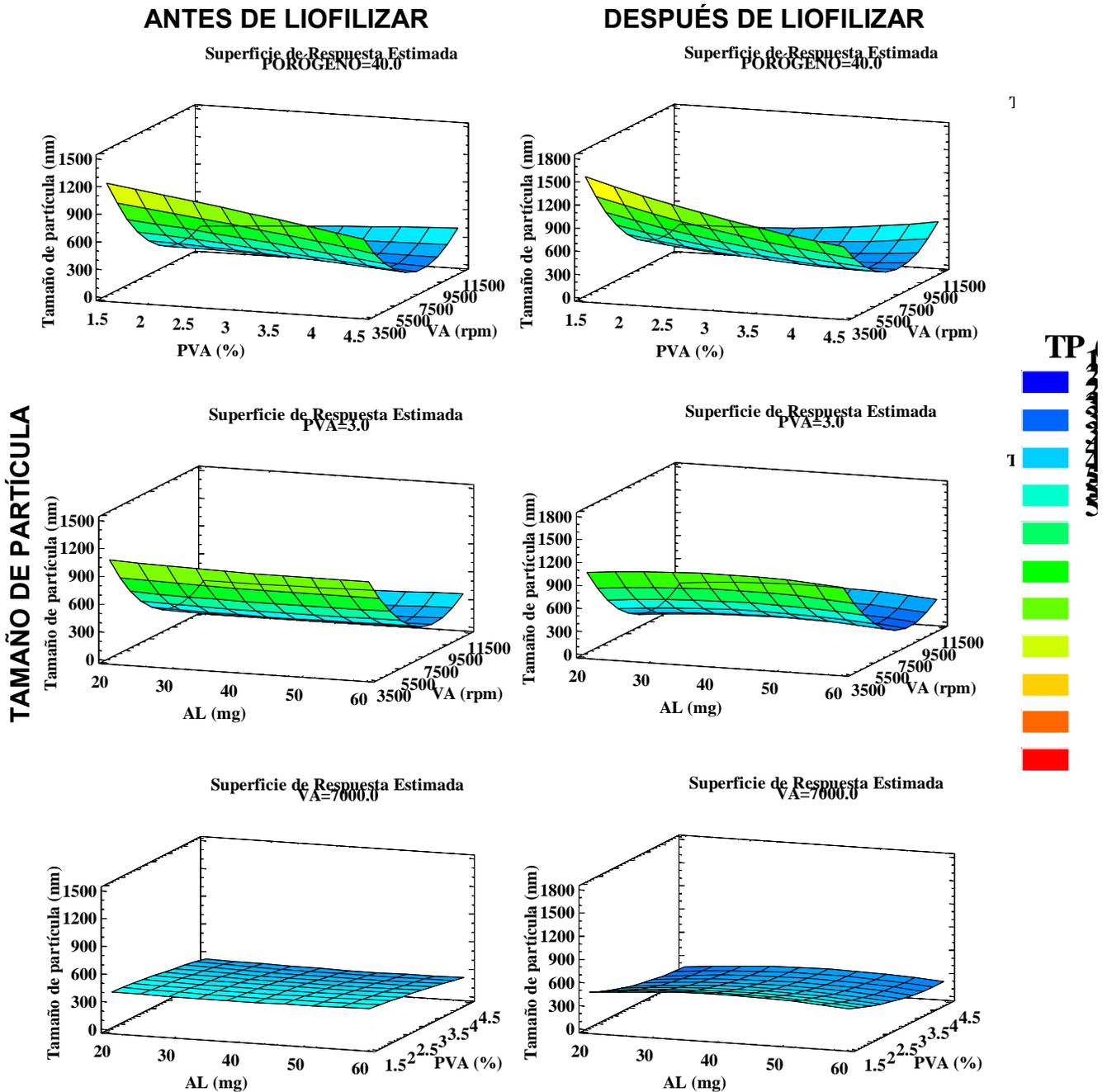


Figura 17. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el tamaño de partícula.

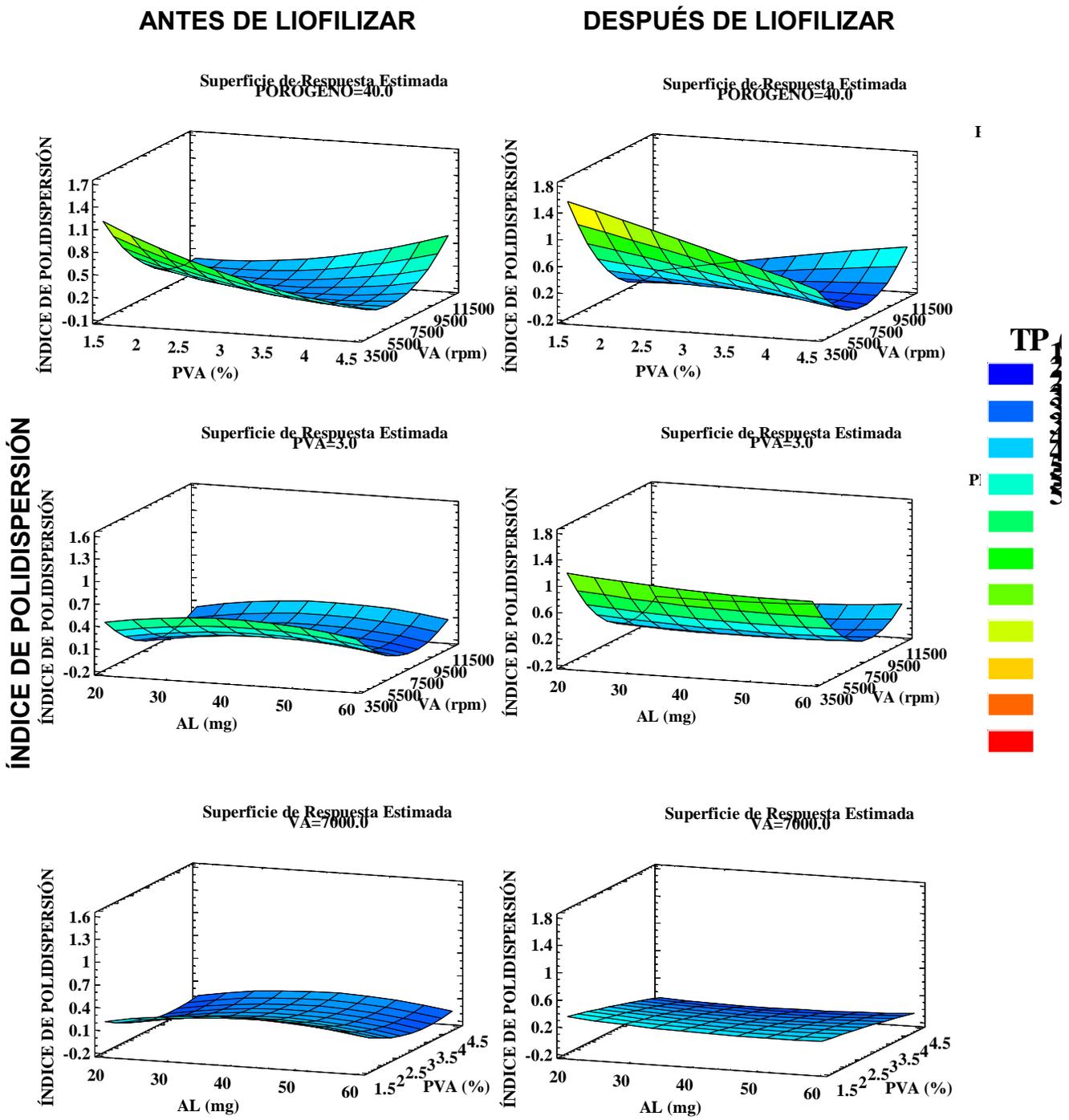


Figura 18. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el índice de polidispersión.

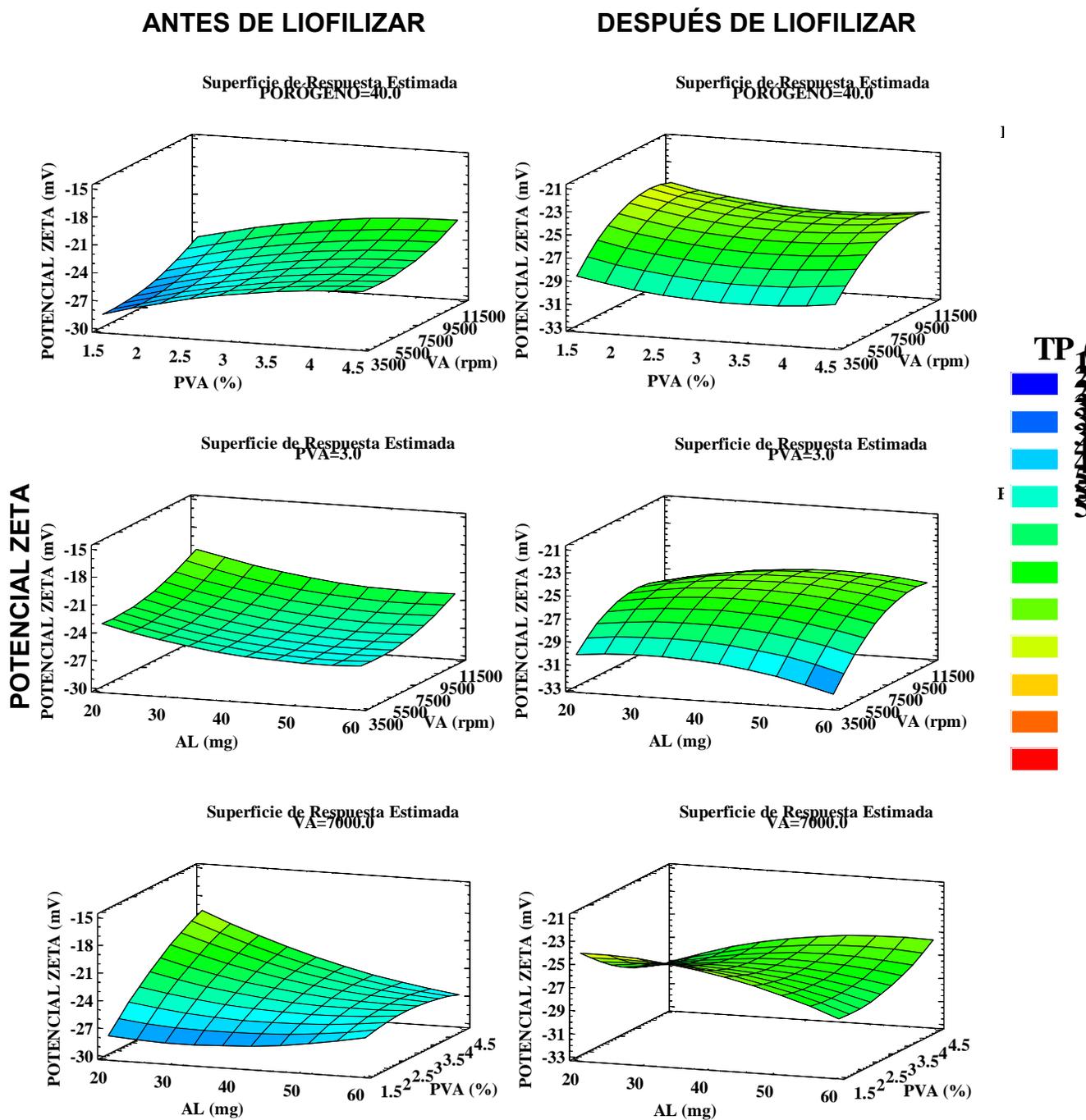


Figura 19. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el potencial zeta.

DESPUÉS DE LIOFILIZAR

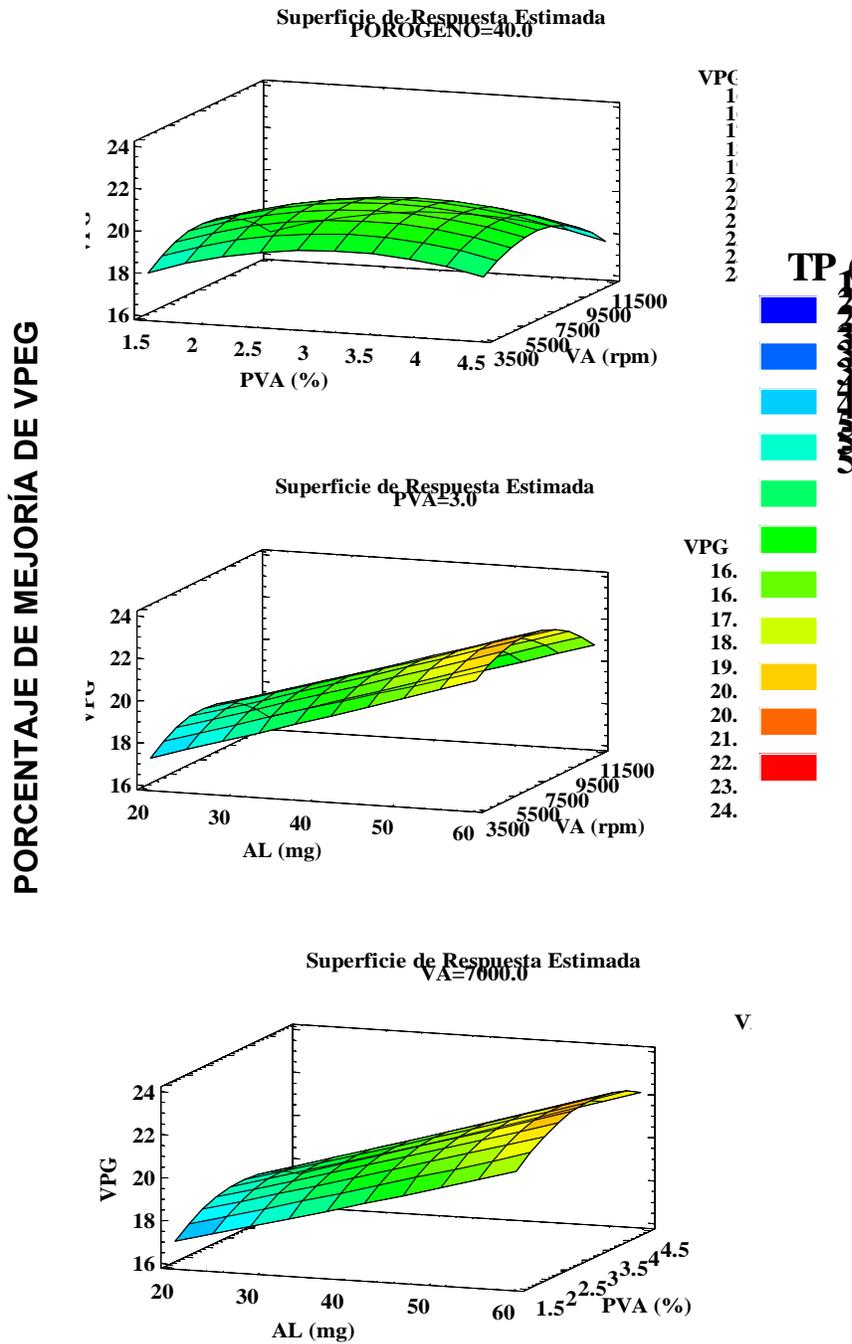
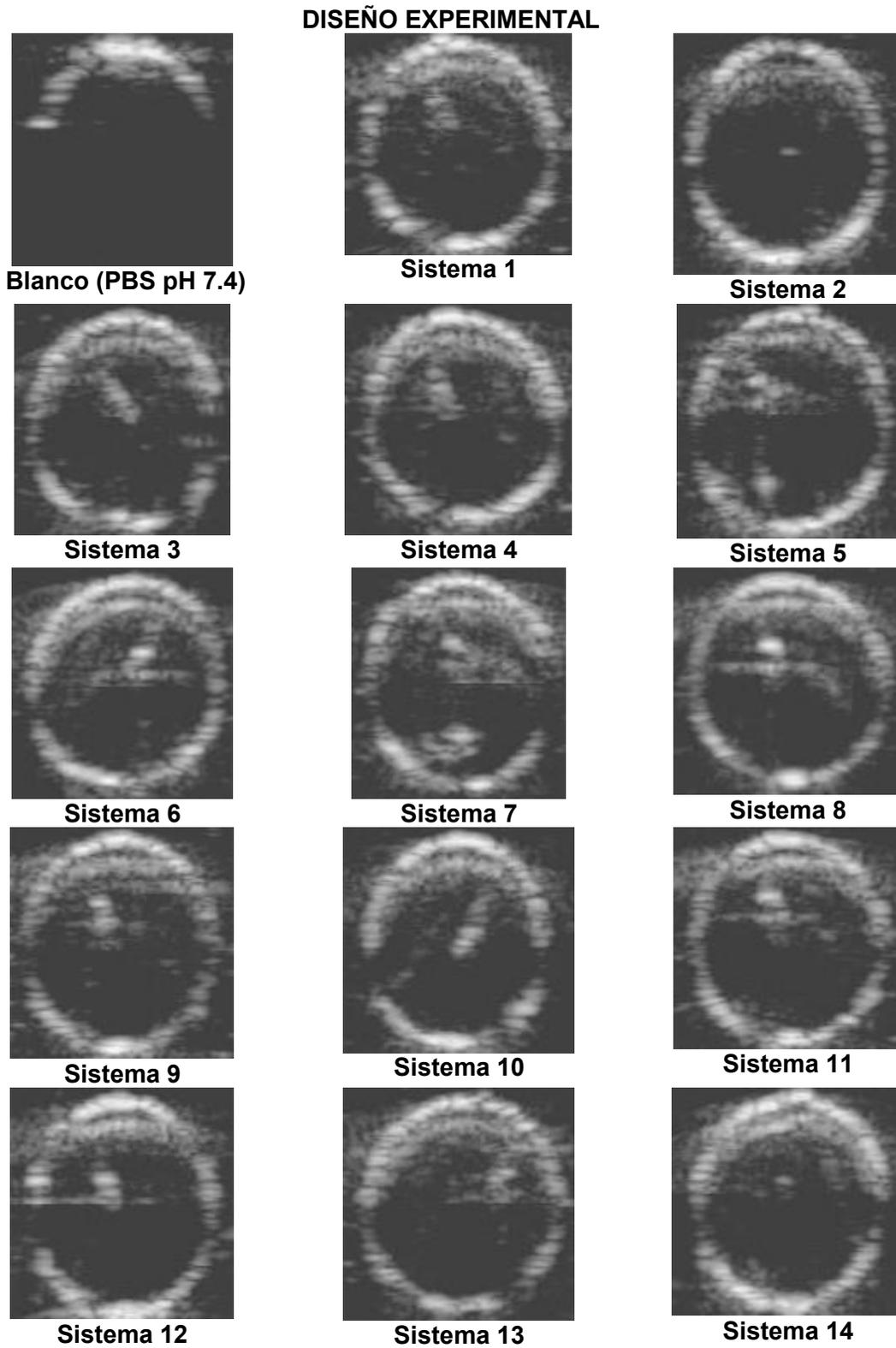
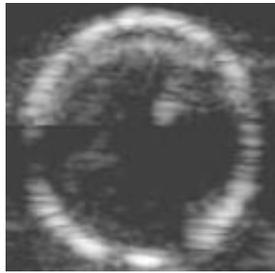


Figura 20. Gráficos 3D de superficie de respuesta estimada donde se muestra la influencia de las variables independientes en el porcentaje de mejoría de contraste (VPEG).

Figura 21. Imágenes por ultrasonido modo-B, de los 18 sistemas pertenecientes al diseño experimental Box-Benhken y el blanco (buffer PBS, pH 7.4).

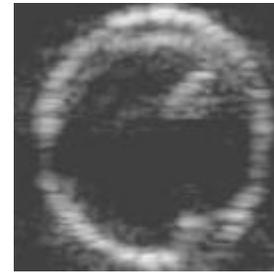




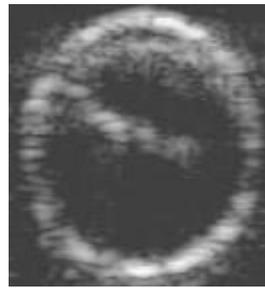
Sistema 15



Sistema 16



Sistema 17



Sistema 18

Los diseños de experimentos también describen las respuestas (y) con respecto a los factores (x), mediante las ecuaciones de polinomios de regresión. El diseño de superficies de respuesta y la estrategia de análisis supone que la media de la variable de respuesta μ_y está en función de los niveles de los factores cuantitativos representados por las variables x_1, x_2, \dots, x_k . Los modelos polinomiales se usan como aproximaciones prácticas a la función de respuesta verdadera o real. En general, la función real se desconoce y las funciones polinomiales con frecuencia proporcionan buenas aproximaciones en zonas relativamente pequeñas de los niveles de los factores cuantitativos [113]. De acuerdo a los resultados obtenidos de los coeficientes de regresión y análisis de varianza de las variables de respuesta en función de los factores en estudio (Tabla 11), los diagramas de superficie de respuesta antes mencionados, son las representaciones gráficas de las ecuaciones de regresión cuadrática obtenidas para cada respuesta (Ec. 4, 5, 6 y 7), donde y es la respuesta medida, y se expresa el valor de β como los coeficientes estimados para cada factor x . Los coeficientes x_1, x_2 y x_3 corresponden a los efectos lineales, x_1x_2, x_1x_3 y x_2x_3 a los coeficientes de interacción, y los coeficientes x_1^2, x_2^2 y x_3^2 , pertenecen a los efectos cuadráticos [114].

Tabla 11. Coeficientes de regresión y análisis de varianza (ANOVA) de las variables de respuesta en función de los factores estudiados. (Después de liofilizar).

Termino	TP (nm)		PDI		PZ (mV)		% MEJORÍA VPEG RESPECTO AL BLANCO	
	Coef.	Valor-P	Coef.	Valor-P	Coef.	Valor-P	Coef.	Valor-P
β_0	3707.3300		5.2543		-25.3467		6.6857	
β_1	16.3965	0.8102	-0.0211	0.7419	-0.0469	0.7356	0.0959	0.0000
β_2	-545.1140	0.0134	-0.5828	0.0458	-5.3022	0.4895	3.1897	0.0501
β_3	-0.6599	0.0000	-0.0009	0.0001	0.0018	0.0159	0.0013	0.5992
β_{11}	-0.1969	0.2182	0.0001	0.6318	-0.0027	0.2713	0.0001	0.8274
β_{12}	0.1417	0.9467	0.0011	0.7615	0.0618	0.0967	0.0046	0.5327
β_{13}	-0.0001	0.9345	0.0000	0.5053	0.0000	0.4846	-7.8571 E-7	0.7994
β_{22}	28.6704	0.3058	-0.0097	0.8275	0.4165	0.3499	-0.5121	0.0004
β_{23}	0.0394	0.0100	0.0001	0.0069	-9.5238 E-7	0.9961	-0.0000	0.8047
β_{33}	0.0000	0.0003	3.6405 E-8	0.0017	-1.1514 E-7	0.1735	-9.1946 E-8	0.0005
R^2	95.3666		92.0549		69.8352		97.4983	
R^2 -Adj.	90.1540		83.1167		35.8998		94.6839	

β_0 = Coeficiente de regresión, β_i = Coeficiente lineal, β_{ii} = Coeficientes cuadráticos y β_{ij} = Coeficientes de interacción. Termino no significativo ($p > 0.05$), Termino significativo ($p < 0.05$).

Y_1 = Tamaño de partícula, Y_2 = Índice de polidispersión, Y_3 = Potencial Zeta, Y_4 = % Mejoría de VPEG

$$Y_1 = 3707.3300 - 545.1140 x_2 - 0.6599 x_3 + 0.0000 x_3^2 + 0.0394 x_2 x_3 \dots\dots\dots Ec. 4$$

$$Y_2 = 5.2543 - 0.5828 x_2 - 0.0009 x_3 + 3.6405 E-8 x_3^2 + 0.0001 x_2 x_3 \dots\dots\dots Ec. 5$$

$$Y_3 = -25.3467 + 0.0018 x_3 \dots\dots\dots Ec. 6$$

$$Y_4 = 6.6857 + 0.0959 x_1 + 3.1897 x_2 - 0.5121 x_2^2 - 9.1946 E-8 x_3^2 \dots\dots\dots Ec. 7$$

Dentro de la caracterización de las nanopartículas, el tamaño de partícula y el índice de polidispersión son parámetros fundamentales para evaluar la estabilidad física. Además se ha demostrado que la opsonización y el reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear, están fuertemente relacionados con el tamaño de las nanopartículas [115]. La espectroscopía de correlación de fotones es una de las técnicas más empleadas para medir el tamaño y la distribución de tamaño de partículas pequeñas suspendidas en un medio líquido [116]. De acuerdo a los

resultados obtenidos en la Tabla 10, el tamaño de partícula de los sistemas se encuentra entre ~230-1700 nm, con índices de polidispersión de ~0.02-1.73. Entre más pequeño sea su tamaño presentarán una tasa de depuración más lenta y por lo tanto, tiempos de circulación más prolongados [54]. Por otro lado, índices de polidispersión (PDI) con valores de 0.1-0.25 indican una distribución de tamaño estrecha, cuando el valor de PDI es mayor a 0.5 se refiere a una distribución de tamaño amplia [116].

En base a la Tabla 11, se determinó que el porcentaje de estabilizante y la velocidad de agitación, influyen en el tamaño e índice de polidispersión de los sistemas. El incremento de estos factores da lugar a una disminución de dichas respuestas (valores $p < 0.05$). Por otro lado, su interacción y el término cuadrático de la velocidad de agitación provocan un crecimiento en su valor (valores $p < 0.05$).

La electroforesis láser Doppler es una técnica comúnmente empleada para medir el potencial zeta. Esta técnica evalúa la movilidad electroforética de partículas suspendidas en un medio. El potencial zeta de los sistemas preparados en el diseño experimental presentaron valores de ~ -24 a -30 mV. Es una regla general que valores cercanos a -30 mV resultan en una buena estabilidad [117]. Conforme a los resultados de la Tabla 11, la disminución en la velocidad de agitación, provoca que los valores de potencial zeta se vean reducidos (valores $p < 0.05$), dando lugar a una buena estabilidad.

Cuando se aplica un campo de ultrasonido a los ACUs, estos oscilan debido a la compresibilidad del gas del núcleo y las propiedades elásticas de la pared. Dicho comportamiento oscilante es el principal recurso de la fuerza de reflexión de estos agentes, lo que los hace ideales para proveer el contraste adecuado en las imágenes para el diagnóstico por ultrasonido [118].

De acuerdo con la finalidad de este estudio, la respuesta que fue considerada con mayor importancia fue el % de mejoría del contraste de las imágenes obtenidas por ultrasonido (Figura 21). Según los datos de los sistemas nanoparticulados preparados en el diseño experimental (Tabla 11), a mayor cantidad de porógeno y concentración de estabilizante, así como los términos cuadráticos de la

concentración de estabilizante y velocidad de agitación producen una mejoría en el contraste de las imágenes, lo que da lugar a un mejor diagnóstico en la práctica clínica.

Finalmente, las R^2 indican que el modelo explica la variabilidad del tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y mejoría del contraste en un 95.3666, 92.0549, 69.8352, 97.4983 % respectivamente. Los valores de R^2 -ajustadas obtenidos, los cuales son más adecuadas para comparar modelos con diferentes números de variables independientes [87], fueron 90.1540, 83.1167, 35.8998 y 94.6839 % respectivamente.

7.2. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Los datos obtenidos en el diseño experimental Box-Benhken fueron tratados con el software Statgraphics® Centurion versión XVI.II., se establecieron las condiciones óptimas de preparación (ETAPA III) en base al porcentaje de mejoría de contraste por ultrasonido, y se midió el tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y porcentaje de mejoría del contraste por ultrasonido de los sistemas. Las condiciones óptimas de preparación estimadas fueron cantidad de agente porógeno (alcanfor) 60 mg, concentración de estabilizante (PVAL) 2.4% p/v, y velocidad de agitación 8000 rpm (zona roja de Figura 22). Los sistemas nanoparticulados optimizados se prepararon por triplicado, estos presentaron tamaños de ~300 nm, índices de polidispersión de ~0.05, potencial zeta de ~ -24 mV y mejoraron el contraste por ultrasonido respecto al blanco en ~ 26% (Tabla 12, Figura 23 y Anexo IV), dichos resultados presentaron un porcentaje de error <10%.

Tabla 12. Caracterización de los sistemas optimizados.

DESPUES DE LIOFILIZAR						
SISTEMA	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	ÁREA DE RDI (píxeles ²)	VPEG	% de mejoría de VPEG respecto al blanco
PBS pH 7.4	No aplica	No aplica	No aplica	17949.67 ± 137.08	75.148 ± 0.19	No aplica
NAI₁	304.20 ± 2.40	0.05 ± 0.01	-23.49 ± 0.88	18088.00 ± 267.01	101.87 ± 1.36	26.22 ± 0.98
NAI₂	307.00 ± 2.90	0.05 ± 0.03	-23.80 ± 1.14	17535.33 ± 238.08	102.76 ± 1.23	26.87 ± 0.87
NAI₃	308.30 ± 1.10	0.05 ± 0.01	-23.94 ± 0.85	17959.00 ± 671.01	102.56 ± 0.12	26.72 ± 0.08

Promedio ± desviación estándar (n=3)

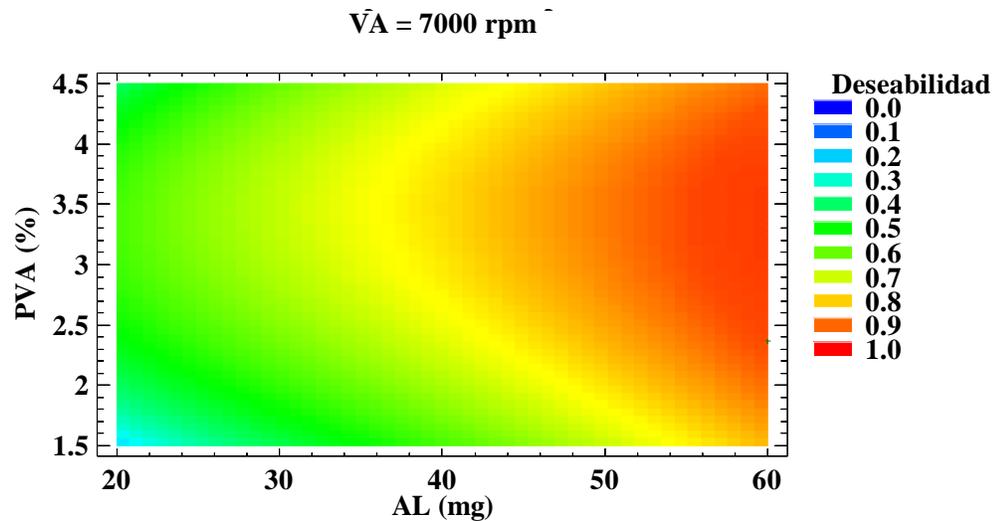


Figura 22. Diagrama de contornos de la superficie de respuesta estimada.

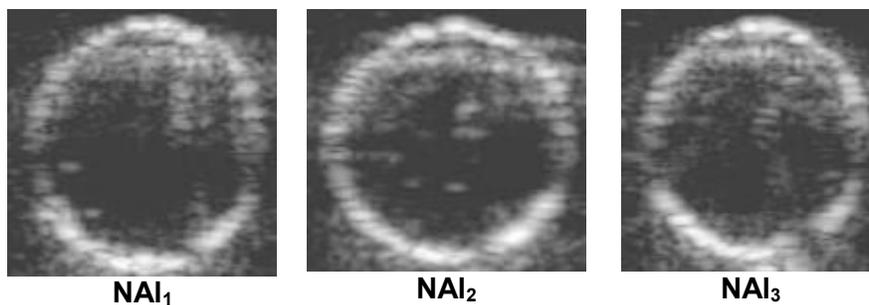


Figura 23. Imágenes por ultrasonido modo-B de los sistemas optimizados.

7.3 VERSATILIDAD DEL MÉTODO

Una vez obtenidos los sistemas optimizados, además de emplear alcanfor como agente porógeno (NAI), se utilizó naftaleno (NNaf) y ciclotetrasiloxano (NCiclo) en la misma proporción y condiciones de preparación, para evaluar la versatilidad del método (ETAPA IV), así mismo se prepararon nanoesferas de PLGA (NE).

La elección de dichos materiales, fue debido a que ambos presentan presiones de vapor bajas, por lo que, al ser encapsulados se esperó que de igual manera formaran sistemas nanoparticulados huecos a través del proceso de liofilización. El naftaleno es un compuesto orgánico sólido a temperatura ambiente con una presión de vapor de 0.085 mmHg a 25°C [119-122]. El ciclotetrasiloxano es un fluido de

silicona no tóxica, con una presión de vapor de 0.99 mmHg a 25°C, por lo que en el proceso de liofilización se pretendió que fuera eliminado por completo [123-126].

En la Tabla 13 se pueden observar los resultados de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta de los sistemas preparados en la versatilidad del método. El alcanfor se destacó como el mejor agente porógeno para el desarrollo de los sistemas nanoparticulados huecos, puesto que en el proceso de evaluación *in vitro* del porcentaje de mejoría del contraste por ultrasonido, es el que muestra mejores resultados con un 26.87%, mientras que NNaf y NCiclo mostraron una mejoría del 23.82 y 22.24% respectivamente (Figura 24 y 25, Anexo V), y NE de 14.92% respecto al blanco.

Así mismo, se comprueba que el método de emulsificación-difusión puede ser empleado satisfactoriamente empleando otros agentes porógenos como naftaleno y ciclotetrasiloxano. Finalmente, a través de un análisis de varianza (Anexo VI) y prueba de Tukey (Anexo VII) se determinó que existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de mejoría de contraste entre todos los sistemas nanoparticulados ($p < 0.05$), excepto entre NNaf y NCiclo.

Figura 24. Imágenes por ultrasonido modo-B de los sistemas obtenidos en la versatilidad del método.

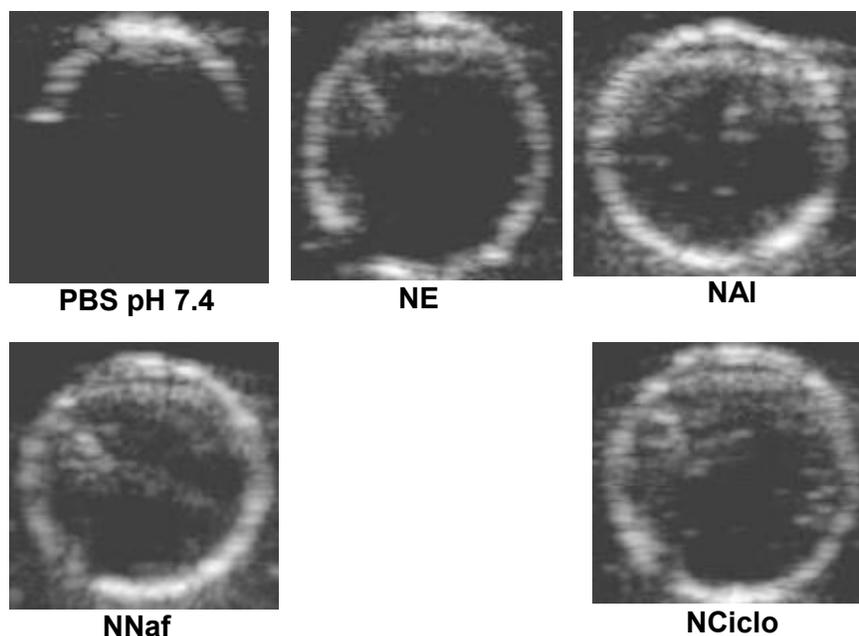


Tabla 13. Sistemas preparados para evaluar la versatilidad del método.

SISTEMA	ANTES DE LIOFILIZAR			DESPUES DE LIOFILIZAR					% de mejora de VPEG respecto al blanco
	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	ÁREA DE RDI (pixeles ²)	VPEG	
PBS pH 7.4	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	17949.67 ± 137.08	75.148 ± 0.19	No aplica
NAI	284.40 ± 0.60	0.07 ± 0.05	-22.23 ± 0.31	307.00 ± 2.90	0.05 ± 0.03	-23.80 ± 1.14	17535.33 ± 238.08	102.76 ± 1.23	26.87 ± 0.87
NE	278.50 ± 5.10	0.05 ± 0.04	-23.00 ± 0.73	286.50 ± 4.00	0.05 ± 0.02	-24.73 ± 0.63	18078.00 ± 350.92	88.33 ± 0.61	14.92 ± 0.58
NNaf	292.70 ± 3.20	0.05 ± 0.03	-22.17 ± 0.44	317.60 ± 2.00	0.05 ± 0.03	-23.89 ± 0.85	18002.00 ± 539.41	98.65 ± 1.24	23.82 ± 0.96
NCiclo	277.00 ± 5.60	0.09 ± 0.02	-21.66 ± 0.49	392.80 ± 1.10	0.04 ± 0.03	-24.73 ± 1.07	18443.00 ± 287.68	96.64 ± 0.79	22.24 ± 0.63

Promedio ± desviación estándar (n=3)

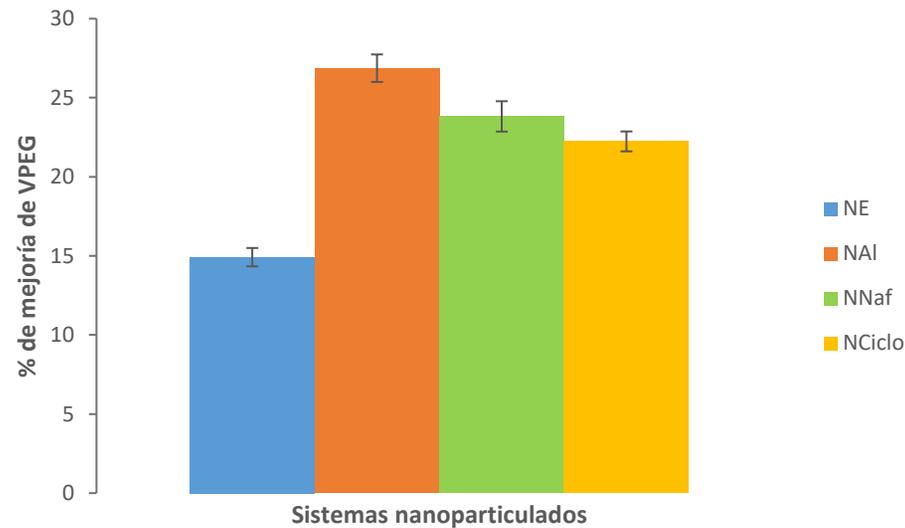


Figura 25. Comparación del porcentaje de mejora del contraste por ultrasonido al emplear los distintos sistemas nanoparticulados preparados en la versatilidad del método.

7.4. CARACTERIZACIÓN DE LA DENSIDAD DE LOS SISTEMAS OPTIMIZADOS

La centrifugación isopícnica en un gradiente de sílice coloidal, se utiliza para la separación de moléculas, y se basa en un gradiente de densidad y ultracentrifugación para separar partículas de acuerdo a sus diferencias de densidad [127-128].

Esta caracterización sólo fue realizada a los sistemas preparados en la versatilidad del método (ETAPA IV). De acuerdo a los resultados experimentales, las NE formaron un pellet posterior a la centrifugación, por lo que su densidad no pudo ser determinada. Los sistemas NAI, NNaf, y NCiclo optimizados formaron bandas, lo que fue indicativo de la formación de las nanopartículas huecas, ya que su densidad fue menor que las NE como se tenía esperado. Sin embargo, su densidad fue mayor a los marcadores, por lo que su valor experimental no pudo ser determinado debido a que los resultados se encontraron fuera del rango de la curva construida que fue de 1.018-1.138 g/cm³ (Figura 26 y 27).

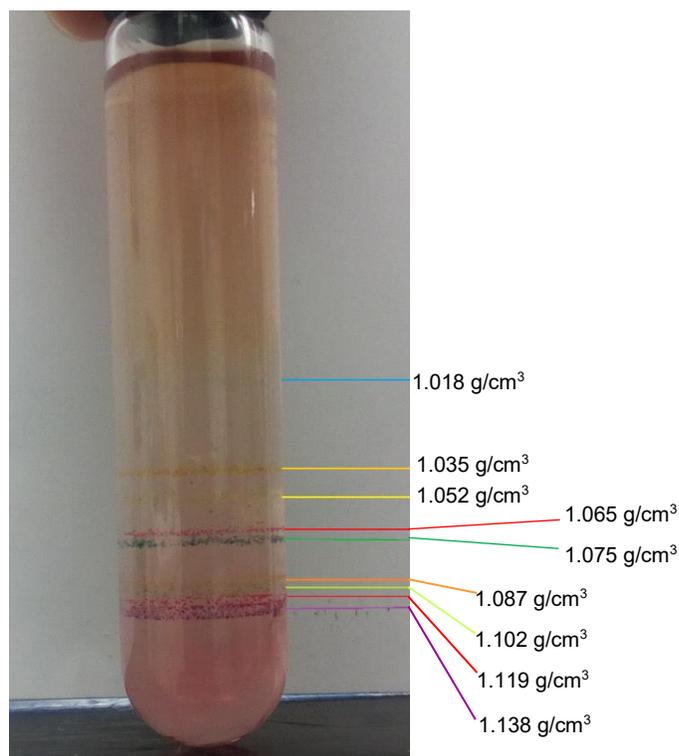


Figura 26. Marcadores de densidad en un gradiente de sílice coloidal con los valores de sus respectivas densidades.

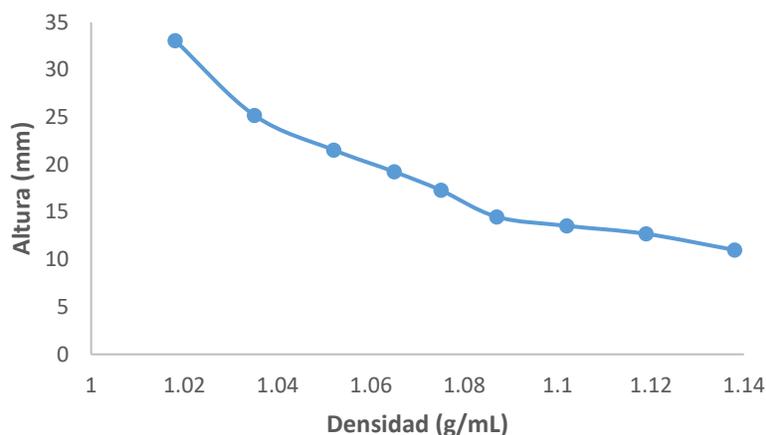


Figura 27. Altura de los marcadores en función de su densidad.

7.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica empleada para analizar el comportamiento térmico de los materiales, como temperaturas de transición vítrea, puntos de fusión, cambios polimórficos, etc. El DSC nos brinda datos cuantitativos precisos de la energía que es absorbida (endotérmica) o liberada (exotérmica) por la muestra durante la medición [129]. Esta caracterización sólo fue realizada a los sistemas preparados en la ETAPA IV. La Figura 28 muestra los termogramas de los materiales empleados para la formación de los sistemas nanoparticulados (PLGA, PVAL, manitol, alcanfor, naftaleno, ciclotetrasiloxano) y los sistemas preparados en la evaluación de la versatilidad del método (NAI, NNaf, NCiclo y NE). Se empleó la calorimetría diferencial de barrido como método de caracterización, con la finalidad de comprobar la remoción de los agentes porógenos durante el proceso de liofilización de los sistemas. De acuerdo a los resultados obtenidos, se aprecia la temperatura de transición vítrea del PLGA $\sim 45^{\circ}\text{C}$ y los picos de fusión pertenecientes a PVAL $\sim 180^{\circ}\text{C}$, manitol $\sim 165^{\circ}\text{C}$, alcanfor $\sim 218^{\circ}\text{C}$, naftaleno $\sim 79^{\circ}\text{C}$, ciclotetrasiloxano $\sim 40^{\circ}\text{C}$, donde se observa que los picos de fusión de los agentes porógenos están ausentes en los termogramas de los sistemas correspondientes (NAI, NNaf, NCiclo), lo que sugiere que estos fueron eliminados satisfactoriamente durante el proceso de liofilización, formando sistemas huecos.

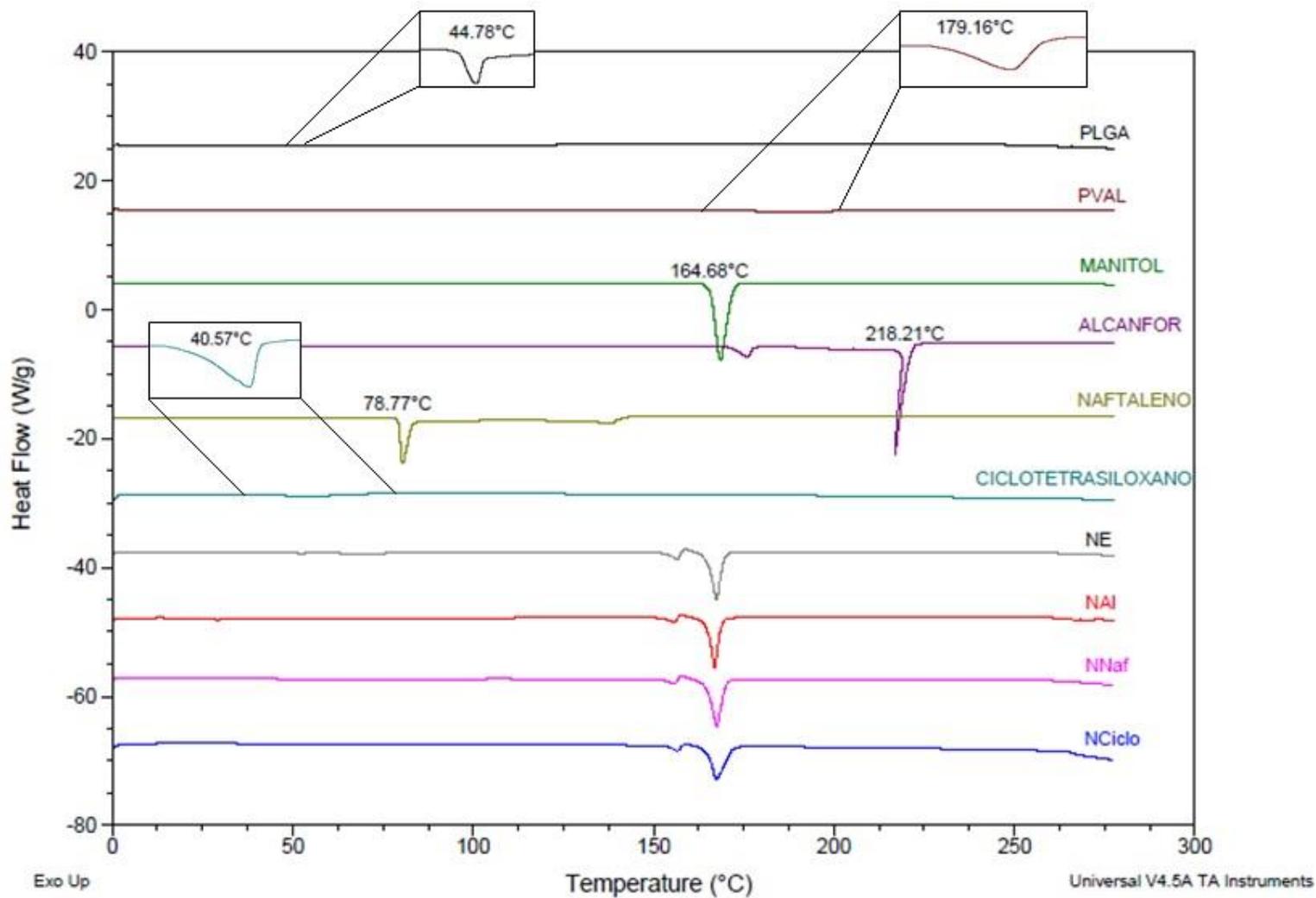


Figura 28. Termogramas de DSC de PLGA, PVAL, manitol, alcanfor, naftaleno, ciclotetrasiloxano y los sistemas nanoparticulados NAI, NNaf, NCiclo y NE optimizados.

7.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopía electrónica de barrido es una de las técnicas más versátiles para la examinación y el análisis de la morfología de micro- y nano-estructuras [130-132]. En esta técnica, un haz de electrones enfocado, es enviado a la muestra. Los electrones primarios interactúan con los átomos en la muestra, produciendo varias señales que pueden ser detectadas y contienen información acerca de la topografía superficial y composición de la muestra. Las imágenes MEB son producidas por la detección de los electrones secundarios, los cuales son emitidos desde la superficie de la muestra debido a la excitación del haz de electrones primario, seguido de procesos de dispersión elástica. Dicho haz de electrones es escaneado, y la posición del haz se combina con la señal detectada para producir una imagen [133-134]. En la Figura 29, se muestran las micrografías MEB de las nanoesferas de PLGA (NE) y nanopartículas huecas a base de alcanfor (NAI) preparadas en la ETAPA IV, a un aumento de 10000x, 15000x y 20000x. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar claramente que los sistemas nanoparticulados presentan una forma esférica y distribución de tamaño uniforme, lo que indica su obtención exitosa. Sin embargo, a través de esta técnica no fue posible evidenciar su hueco interior.

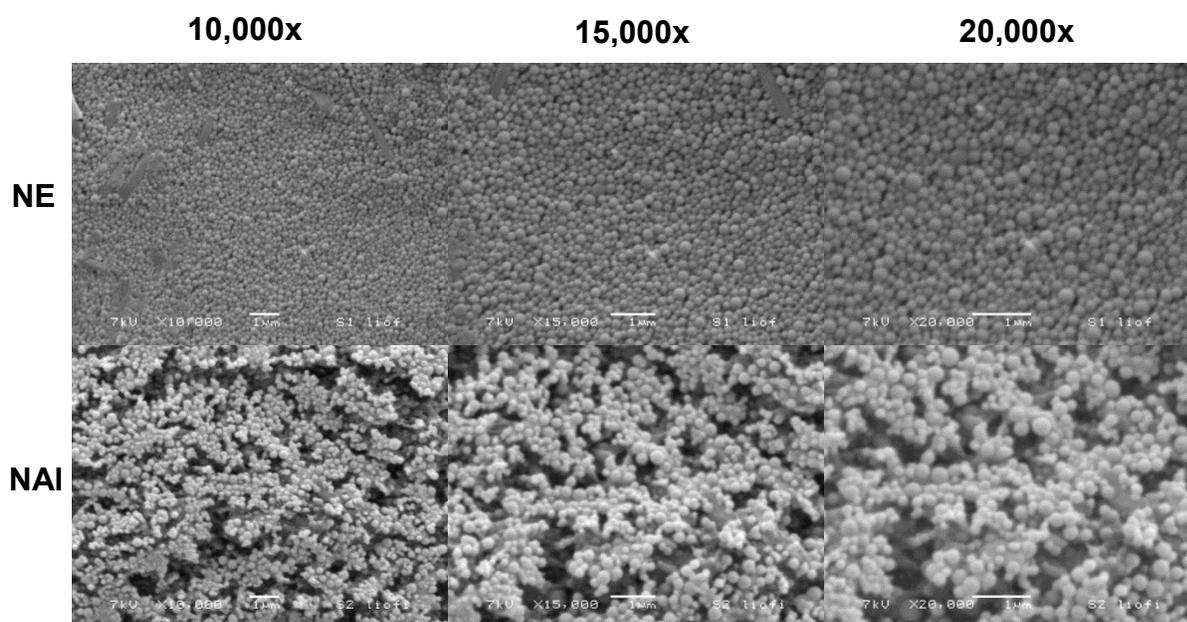


Figura 29. Imágenes MEB de NE y NAI optimizadas.

VIII. CONCLUSIONES

- a) A través del presente trabajo fue posible obtener sistemas nanoparticulados huecos de PLGA a través del método de emulsificación-difusión, como potenciales agentes de contraste para ultrasonido.
- b) Se definieron las siguientes condiciones óptimas de preparación de los sistemas nanoparticulados poliméricos huecos: agente porógeno 60 mg, velocidad de agitación 8000 rpm y concentración de PVAL del 2.4% p/v, por medio de un diseño experimental Box-Behnken, empleando alcanfor, naftaleno y ciclotetrasiloxano como agentes porógenos.
- c) Los sistemas nanoparticulados poliméricos huecos optimizados presentaron tamaños de ~ 300 nm y poblaciones unimodales monodispersas con índices de polidispersión de 0.04-0.05, así como un potencial zeta de ~ -24 mV dando lugar a una buena estabilidad.
- d) Mediante calorimetría diferencial de barrido se comprobó la eliminación de los agentes porógenos durante el proceso de liofilización, dando lugar a la formación de sistemas nanoparticulados huecos, lo que les permite ser ecogénicos. Dichos sistemas presentaron una densidad menor al de sus respectivas nanoesferas, lo que fue indicativo de su obtención exitosa, y a través de imágenes MEB se demostró su morfología esférica y distribución de tamaño uniforme.
- e) La aplicación de estos sistemas nanoparticulados poliméricos huecos como agentes de contraste para ultrasonido, fue comprobada a través de evaluaciones *in vitro*, empleando como modelo un *phantom* de gelatina y un ultrasonido modo-B, a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con lo cual se obtuvieron mejorías de contraste del 22% hasta casi un 27% en las imágenes obtenidas, comprobando su efectividad.

IX. PERSPECTIVAS

- a) Realizar estudios de estabilidad de las propiedades fisicoquímicas y ecogenicidad *in vitro* de los sistemas nanoparticulados obtenidos.
- b) Incluir un fármaco en los sistemas nanoparticulados desarrollados, con el fin de cumplir ambos propósitos, terapia y diagnóstico (teragnosis).
- c) Realizar estudios *in vivo* de la ecogenicidad de los sistemas nanoparticulados, así como evaluar su toxicidad, para ampliar el conocimiento de su comportamiento.
- d) Funcionalizar la superficie de los sistemas nanoparticulados con la finalidad de dirigirlos al sitio donde sea requerido el diagnóstico.

X. REFERENCIAS

1. Kazuaki N, Kyohei N, Chiaki O, et al. Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO₂ nanoparticles: Its application to targeted sonodynamic therapy. *Ultrason Sonochem* 2014;21(1):289-94.
2. Min KH, Min HS, Lee HJ, et al. pH-controlled gas-generating mineralized nanoparticles: A theranostic agent for ultrasound imaging and therapy of cancers. *ACS Nano* 2015;9(1):134-45.
3. Jia C, Huang SW, Jin Y, Seo CH et al. Integration of photoacoustic, ultrasound, and magnetomotive system. *Proc SPIE* 2010;7564:756416.
4. Wilson K, Homan K, Emelianov S. Synthesis of a dual contrast agent for ultrasound and photoacoustic imaging. *Proc SPIE* 2010;7576.
5. Olbrich C, Hauff P, Scholle F, et al. The in vitro stability of air-filled polybutylcyanoacrylate microparticles. *Biomaterials* 2006;27(19):3549-59.
6. Krasovitski B, Kimmel E, Sapunar M, Adam D. Ultrasound attenuation by encapsulated microbubbles: Time and pressure effects. *Ultrasound Med Biol* 2004;30(6):793-802.
7. Ma J, Xing LX, Shen M, et al. Ultrasound contrast-enhanced imaging and in vitro antitumor effect of paclitaxel-poly(lactic-co-glycolic acid)-monomethoxypoly (ethylene glycol) nanocapsules with ultrasound-targeted microbubble destruction. *Mol Med Rep* 2015;11(4):2413-20.
8. Levine RA. *Thyroid Ultrasound Physics*. En: Baskin, HJ, Duick DS, Levine RA. *Thyroid Ultrasound and Ultrasound-Guided FNA*. Second edition. New York: Springer;2013:9-26.

-
9. Wong PC. Science of Ultrasound and Echocardiography. En: Wong PC, Miller-Hance WC. Transesophageal Echocardiography for Congenital Heart Disease. London: Springer-Verlag;2014:1-48.
 10. Gilbert BR, Fulgham PF. Physical Principles of Ultrasound of the Male Genitalia. En: Gilbert BR. Ultrasound of the Male Genitalia. New York: Springer;2015:29-74.
 11. Abellera Blair JE, Rigolin VH. Echocardiography. En: Goldberger JJ, Jason NG. Practical Signal and Image Processing in Clinical Cardiology. London: Springer;2010:187-217.
 12. Zeqiri B, Scholl W, Robinson SP. Measurement and testing of the acoustic properties of materials: A review. Metrologia 2010;47:S156–S171.
 13. Lionetto F, Maffezzoli A. Polymer characterization by ultrasonic wave propagation. Adv Polym Tech 2009;27(2):63-73.
 14. Schrope BA, Goel N. Physical Principles of Ultrasound. En: Hagopian EJ, Machi J. Abdominal Ultrasound for Surgeons. New York: Springer;2014:7-15.
 15. Feleppa, EJ. Basic Physics of Diagnostic Ultrasound. En: Porter CR, Wolff, EM. Prostate ultrasound: Current practice and future directions. New York: Springer;2015:31-56.
 16. Murthi SB, Ferguson M, Sisley AC. Ultrasound Physics and Equipment. En: Frankel HL, deBoisblanc BP. Bedside Procedures for the Intensivist. USA:Springer;2010:57-80.
 17. Venables H. How does ultrasound work? Ultrasound 2011;19:44–49.

-
18. Fulgham PF. The Physics and Technique of Ultrasound. En: Chan L, Tse V, The S, Stewart P. Pelvic Floor Ultrasound: Principles, applications and case studies. Switzerland: Springer;2015:1-24.
 19. Huang SL, McPherson DD. Ultrasound for Drug/Gene Delivery. En: Chen X, Wong S. Cancer Theranostics. USA: Elsevier; 2014: 269-283.
 20. Maulik, D. Physical principles of doppler ultrasonography. En: Maulik D, Zalud I. Doppler ultrasound in Obstetrics and Gynecology. USA: Elsevier;2005:9-17.
 21. Ghoshal G, Oelze ML, O'Brien WD. Quantitative Ultrasound History and Successes. En: Quantitative Ultrasound in Soft Tissues. Netherlands: Springer;2013:21-42.
 22. Schmitz G. Biomedical Sonography. En: Biomedical Imaging: Principles and Applications. USA: Elsevier; 2012: 331-367.
 23. Karlsson G. The Physics of Ultrasound and Some Recent Techniques Used. En: Contemporary Interventional Ultrasonography in Urology. London: Springer;2009:103-112.
 24. Schmidt G. 2007. Ecografía. De la imagen al diagnóstico. Editorial Médica Panamericana. Madrid. p. 3-4.
 25. Rosen JC, Nicolay L, Palmer JS. Principles of Ultrasound. En: Palmer LS, Palmer JS. Pediatric and Adolescent Urologic Imaging. New York: Springer;2014:13-29.
 26. Coelho de Albuquerque Pereira W, Bittencourt Machado C, Alther Negreira C, Canett R. Ultrasonic Techniques for Medical Imaging and Tissue

-
- Characterization. En: Piezoelectric Transducers and Applications. Berlin: Springer;2008:433-465.
27. Feleppa EJ, Alam SK, Deng CX. Emerging Ultrasound Technologies for Early Markers of Disease. *Dis Markers* 2002;18(5-6):249-268.
28. Hendeel WR, Ritenour ER. *Medical Imaging Physics*. New York: John Wiley & Sons;2002:511.
29. Shriki J. Ultrasound physics. *Crit Care Clin* 2014;30(1):1-24.
30. Curso Básico de Ecografía. Manual de iniciación. Matthias Hofer, Tatjana Reihs. 5ª ed. 2008. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 6-12.
31. O'Neill J. Introduction to Imaging. En: O'Neill J. *Essential Imaging in Rheumatology*. New York: Springer;2015:3-31.
32. Einhaus F, Greim CA. *Allgemeine Grundlagen der Sonographie, Teil 1*. *Anaesthesist* 2015;64:795-809.
33. Ilnatsenka B, Boezaart AP. Ultrasound: Basic understanding and learning the language. *Int J Shoulder Surg* 2010;4(3):55-62
34. Hughes MS, Marsh JN, Fuhrhop RW, et al. Comparison of ultrasound scattering properties of Optison® with a liquid perfluorocarbon nanoparticle contrast agent. *IEEE* 2001:1675-1678.
35. Son S, Min HS, You DG, et al. Echogenic nanoparticles for ultrasound technologies: Evolution from diagnostic imaging modality to multimodal theranostic agent. *Nanotoday* 2014;9(4):525-540.

-
36. Winterhalter M, Sonnen AFP. Stable air bubbles--Catch them if you can! *Angew Chem Int Ed Engl* 2006;45(16):2500-2502.
37. Maresca D, Emmer M, van Neer PLMJ, et al. Acoustic sizing of an ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med Biol* 2010;36(10):1713-21.
38. Braden B, Ignee A, Hocke M, et al. Diagnostic value and clinical utility of contrast enhanced ultrasound in intestinal diseases. *Dig Liver Dis* 2010;42(10):667-74.
39. Rossi S, Szíjjártó C, Gerber F, et al. Fluorous materials in microbubble engineering science and technology-Design and development of new bubble preparation and sizing technologies. *J Fluorine Chem* 2011;132(12):1102-1109.
40. Migaleddu V, Quايا E, Scano D, Virgilio G. Inflammatory activity in Crohn disease: Ultrasound findings. *Abdom Radiol* 2008;33(5):589-97.
41. Hughes M, Caruthers S, Tran T, et al. Perfluorocarbon Nanoparticles for Molecular Imaging and Targeted Therapeutics. *Proc IEEE* 2008;96(3):397-415.
42. Schutt EG, Klein DH, Mattrey RM, Riess JG. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003;42(28):3218-35.
43. Strohm E, Rui M, Gorelikov I, et al. Optical droplet vaporization of micron-sized perfluorocarbon droplets and their photoacoustic detection. *Proc SPIE* 2011;7899:78993H1-7.

-
44. Wilson K, Homan K, Emelianov S. Photoacoustic and ultrasound imaging contrast enhancement using a dual contrast agent. *Proc SPIE* 2010;7564:75642P.
 45. Sheeran PS, Luo SH, Mullin LB, et al. Design of ultrasonically-activatable nanoparticles using low boiling point perfluorocarbons. *Biomaterials* 2012;33(11):3262-9.
 46. Wilson KE, Wang TY, Willmann JK. Acoustic and photoacoustic molecular imaging of cancer. *J Nucl Med* 2013;54(11):1851-4.
 47. Palekar-Shanbhag P, Chogale MM, Jog SV, Gaikwad SS. Microbubbles and their applications in pharmaceutical targeting. *Curr Drug Deliv* 2013;10(4):363-73.
 48. Flegg MB, Poole CM, Whittaker AK, et al. Rayleigh theory of ultrasound scattering applied to liquid-filled contrast nanoparticles. *Phys Med Biol* 2010;55(11):3061-76.
 49. Kang E, Min HS, Lee J, et al. Nanobubbles from gas-generating polymeric nanoparticles: Ultrasound imaging of living subjects. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010;49(3):524-8.
 50. Sboros V. Response of contrast agents to ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(10):1117-36.
 51. Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int J Cancer* 2007;120(12):2527-37.

-
52. Hahn MA, Singh AK, Sharma P, et al. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: Current status and future perspectives. *Anal Bioanal Chem* 2011;399(1):3-27.
53. Bosselmann S, Williams RO. Has nanotechnology led to improved therapeutic outcomes? *Drug Dev Ind Pharm* 2012;38(2):158-70.
54. Saha RN, Vasanthakumar S, Bende G, Snehalatha M. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Mol Membr Biol* 2010;27(7):215-31.
55. Moritz M, Geszke-Moritz M. Recent Developments in the Application of Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers. *Adv Clin Exp Med* 2015;24(5):749-58.
56. Fan X, Wang L, Guo Y, et al. Experimental investigation of the penetration of ultrasound nanobubbles in a gastric cancer xenograft. *Nanotechnology* 2013;24(32):325102.
57. Oeffinger BE, Wheatley MA. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics* 2004;42(1-9):343-7.
58. Chapman S, Dobrovolskaia M, Farahani K, et al. Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise. *Nanotoday* 2013;8(5):454-460.
59. Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, et al. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine* 2011;6:877-95.
60. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Mater Sci Eng C* 2014;41:178-195.

-
61. Jeevanandam J, Chan YS, Danquah MK. Nano-formulations of drugs: Recent developments, impact and challenges. *Biochimie* 2016;128-129:99-112.
 62. Sharma S, Parmar A, Kori S, Sandhir R. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical. *Trends in Analyt Chem* 2016;80:30-40.
 63. Lu ZR, Sakuma S. *Nanomaterials in Pharmacology*. London: Springer;2016:485.
 64. Teraphongphom NT, Wheatley MA, Chhour P, Cormode DP. Multimodal Polymeric Contrast Agents. *IEEE* 2013:131-132.
 65. Cavalieri F, Hamassi AE, Chiessi E, Paradossi G. Stable polymeric microballoons as multifunctional device for biomedical uses: Synthesis and characterization. *Langmuir* 2005;21(19):8758-64.
 66. Min HS, Son S, Lee TW, et al. Liver-Specific and Echogenic Hyaluronic Acid Nanoparticles Facilitating Liver Cancer Discrimination. *Adv Funct Mater* 2013;23(44):5518-5529.
 67. Tang MF, Lei L, Guo SR, Huang WL. Recent progress in nanotechnology for cancer therapy. *Chin J Cancer* 2010;29(9):775-80.
 68. Brismar TV, Grishenkov D, Gustafsson B, et al. Magnetite Nanoparticles Can Be Coupled to Microbubbles to Support Multimodal Imaging. *Biomacromolecules* 2012;13(5):1390-1399.
 69. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res* 1998;15(7):1056–62.

-
70. Díaz-López R, Tsapis N, Santin M, et al. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials* 2010; 31(7):1723-31.
71. Cai WB, Yang HL, Zhang J, et al. The Optimized Fabrication of Nanobubbles as Ultrasound Contrast Agents for Tumor Imaging. *Nature* 2015;5:13725.
72. Jafari S, Diou O, Mamou J, et al. High-frequency (20 to 40 MHz) acoustic response of liquid-filled nanocapsules. *IEEE Trans Ultrason Eng* 2014;61(1):5-15.
73. Toy R, Bauer L, Hoimes C, et al. Targeted nanotechnology for cancer imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;76:79-97.
74. Wang YJ, Strohm EM, Sun Y, et al. PLGA/PFC Particles Loaded with Gold Nanoparticles as Dual Contrast Agents for Photoacoustic and Ultrasound Imaging. *Proc SPIE* 2014;8943:89433M.
75. Sciallero C, Grishenkov D, Kothapalli SV, et al. Acoustic characterization and contrast imaging of microbubbles encapsulated by polymeric shells coated or filled with magnetic nanoparticles. *J Acoust Soc Am* 2013;134(5):3918-30.
76. Villa R, Cerroni B, Viganò L, et al. Targeted doxorubicin delivery by chitosan-galactosylated modified polymer microbubbles to hepatocarcinoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;110:434-42.
77. Doiron AL, Homan KA, Emelianov S, Brannon-Peppas L. Poly(Lactic-co-Glycolic) Acid as a Carrier for Imaging Contrast Agents. *J Pharm Drug Res* 2009; 26(3):674-682.
78. Guo C, Jin Y, Dai Z. Multifunctional Ultrasound Contrast Agents for Imaging Guided Photothermal Therapy. *Bioconjug Chem* 2014;25(5):840-854.

-
79. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;75(1):1-18.
80. Sanna V, Pintus G, Bandiera P, et al. Development of polymeric microbubbles targeted to prostate-specific membrane antigen as prototype of novel ultrasound contrast agents. *Mol Pharm* 2011;8(3):748-57.
81. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24(12):1113–28.
82. Quintanar-Guerrero D, Tamayo-Esquivel D, Ganem-Quintanar A, et al. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *Eur J Pharm Sci* 2005;26(2):211–8.
83. Jablonowski LJ, Alfego D, Andorko JI, et al. Balancing stealth and echogenic properties in an ultrasound contrast agent with drug delivery potential. *Biomaterials* 2016;103:197-206.
84. Wheatley MA, Forsberg F, Oum K, et al. Comparison of in vitro and in vivo acoustic response of a novel 50:50 PLGA contrast agent. *Ultrasonics* 2006;44(4):360-7.
85. El-Sherif DM, Wheatley MA. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(2):347-55.
86. Wang CW, Yang SP, Hu H, et al. Synthesis, characterization and in vitro and in vivo investigation of C₃F₈-filled poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as an ultrasound contrast agent. *Mol Med Rep* 2015;11(3):1885-90.

-
87. Ahmed TA. Preparation of finasteride capsules-loaded drug nanoparticles: Formulation, optimization, in vitro, and pharmacokinetic evaluation. *Int J Nanomedicine* 2016;11:515-27.
 88. Saidatul I, Akihiro T, Takaaki M. Development of Non-Deterioration-Type Skin Tissue Phantom Using Silicone Material. *Optical Review* 2014;21(3):353-358.
 89. Li C, Ang SP, Liu J, Yu H. A Dynamic Liver Phantom for Ultrasound Image Guided Biopsy. *IFMBE Proceedings* 2014;43:152-153.
 90. Zerth H, Harwood R, Tommaso L, Girzadas DV Jr. An inexpensive, easily constructed, reusable task trainer for simulating ultrasound-guided pericardiocentesis. *J Emerg Med* 2012;43(6):1066-9.
 91. Sultan SF, Lohom G, Shorten G. A Novel Phantom for Teaching and Learning Ultrasound-guided Needle Manipulation. *J Med Ultrasound* 2013;21(3):152-155.
 92. Gerstenmaier JF, McCarthy CJ, Brophy DP, Cantwell CP. Evaluation of the particulate concentration in a gelatin-based phantom for sonographically guided lesion biopsy. *J Med Ultrasound* 2013;32(8):1471-5.
 93. Othman NS, Jaafar MS, Rahman AA, et al. Ultrasound Speed of Polymer Gel Mimicked Human Soft Tissue within Three Weeks. *Int J Biosci Biochem Bioinforma* 2011;1(3):223-225.
 94. Cook JR, Bouchard RR, Emelianov SY. Tissue-mimicking phantoms for photoacoustic and ultrasonic imaging. *Biomed Opt Express* 2011;2(11):3193-3206.

-
95. Alvarez S, Ormachea J, Lavarello R, Castañeda B. Characterization of Gelatin Phantoms Using Crawling Wave Sonoelastography. IFMBE Proceedings 2014;49:349-352.
 96. Aristizabal S, Amador Carrascal C, Kinnick RR, et al. Ultrasound-based shear wave evaluation in transverse isotropic tissue mimicking phantoms and muscle. Proc Meet Acoust 2013;20(1):075004.
 97. Hunt A, Ristolainen A, Ross P, et al. Low cost anatomically realistic renal biopsy phantoms for interventional radiology trainees. Eur J Radiol 2013;82(4):594-600.
 98. Doyle TE, Cervantes M, Thompson LA, et al. Determining breast pathology in surgical margins with high-frequency ultrasound: Phantom and numerical simulations. J Acoust Soc Am 2013;133(5):3541.
 99. Pandya A, Doganay O, Xu Y. Ultrasound-mediated study of the electrokinetic effects in gelatin phantoms. IFMBE Proceedings 2012;39:1109-1112.
 100. Chao SL, Chen KC, Lin LW, et al. Ultrasound phantoms made of gelatin covered with hydrocolloid skin dressing. J Emerg Med 2013;45(2):240-3.
 101. Milgroom A, Intrator M, Madhavan K, et al. Mesoporous silica nanoparticles as a breast-cancer targeting ultrasound contrast agent. Colloids Surf B Biointerfaces 2014;116:652-7.
 102. Brüssler J, Marxer E, Becker A, et al. Correlation of structure and echogenicity of nanoscaled ultrasound contrast agents in vitro. Colloids Surf B Biointerfaces 2014;117:206-15.

-
103. Guo G, Lu L, Yin L, et al. Mechanical and dynamic characteristics of encapsulated microbubbles coupled by magnetic nanoparticles as multifunctional imaging and drug delivery agents. *Phys Med Biol* 2014;59(22):6729-47.
 104. Liu J, Levine AL, Mattoon JS, et al. Nanoparticles as image enhancing agents for ultrasonography. *Phys Med Biol* 2006;51(9):2179-89.
 105. Wilson SR, Burns PN. Microbubble-enhanced US in Body Imaging: What Role? *Radiology* 2010;257(1):24-39.
 106. Hosseini SA, Mashaykhi S, Babaei S. Graphene oxide/zinc oxide nanocomposite: A superior adsorbent for removal of methylene blue-statistical analysis by response surface methodology (RSM). *S Afr J Chem* 2016;69:105-112.
 107. Pakdil NB. Examination of poultry slaughterhouse wastewater sludge conditioning using microwave irradiation. *J Appl Poult Res* 2016;25(2):247-255.
 108. Montgomery DC. *Diseño y análisis de experimentos*. Segunda edición. New York: John Wiley & Sons;2004:686.
 109. Tzvetkov G, Paradossi G, Tortora M, et al. Water-dispersible PVA-based dry microballoons with potential for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2010;30(3):412-416.
 110. Bjerknes K, Dyrstad K, Smistad G, Agerkvist I. Preparation of polymeric microcapsules: Formulation studies. *Drug Dev Ind Pharm* 2000;26(8):847-56.

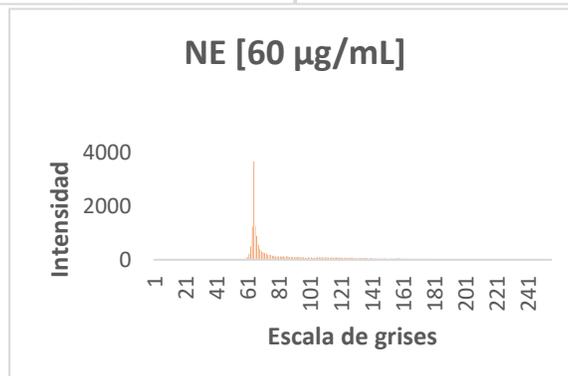
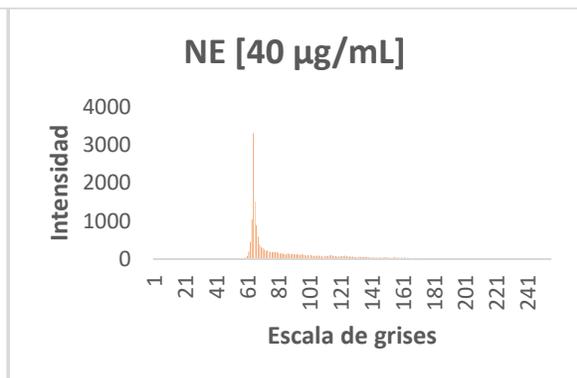
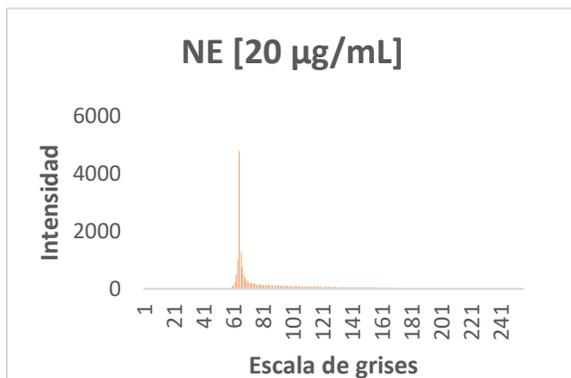
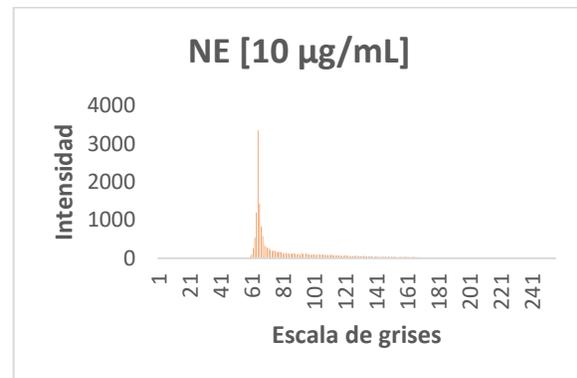
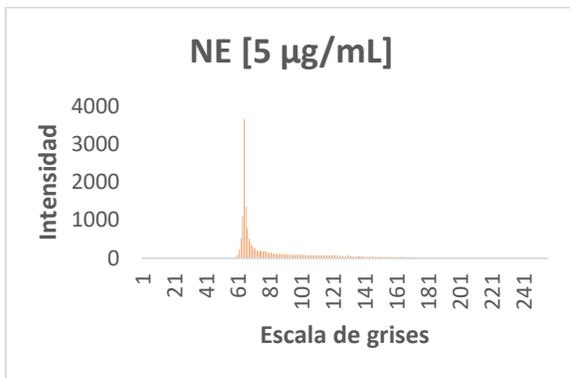
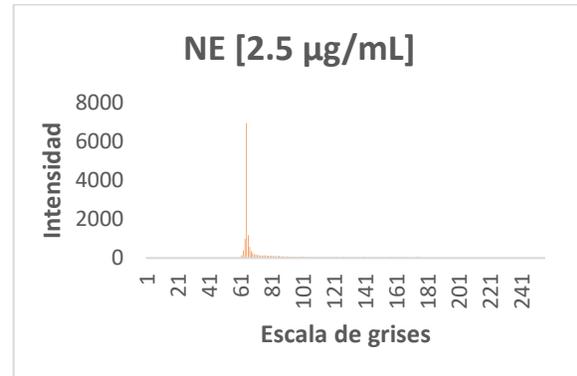
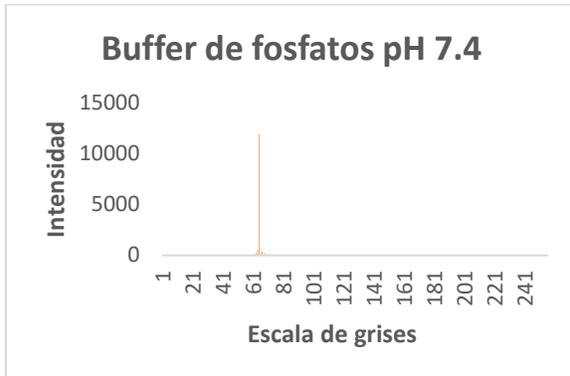
-
111. Alihosseini F, Ghaffari S, Dabirsiaghi AR, Haghghat S. Freeze-drying of ampicillin solid lipid nanoparticles using mannitol as cryoprotectant. *Braz J Pharm Sci* 2015; 51(4):797-802.
112. Tanaka Y, Inkyo M, Yumoto R, et al. Nanoparticulation of poorly water soluble drugs using a wet-mill process and physicochemical properties of the nanopowders. *Chem Pharm Bull* 2009;57(10):1050-7.
113. Kuehl RO. *Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. México: International Thomson Editores;2001:680.
114. Yadav KS, Sawant KK. Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation. *Curr Drug Deliv* 2010;7(1):51-64.
115. Owens DE III, Peppas NA. Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymer nanoparticles. *Int J Pharm* 2006.307:93-102.
116. Patravale VB, Date AA, Kulkarni RM. Nanosuspensions a promising drug delivery strategy. *J Pharm Pharmacol* 2004;56: 827-840.
117. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(6):456-69.
118. Casciaro S, Soloperto G, Greco A, et al. Multi-frequency differential image enhancement of nanosized ultrasound contrast agents. *IEEE* 2014;64: 2136-2145.
119. Yetti E, Thontowi A, Yopi. Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from the Indonesian Marine Environment. *Biodiversitas* 2016;17(2):857-864.

-
120. de Kruif CG, Kuipers T, van Miltenburg JC, et al. The vapour pressure of solid and liquid naphthalene. *J Chem Soc Trans* 1981;13(11):1081-1086.
121. Ambrose D, Lawrenson IJ, Sprake CHS. The vapour pressure of naphthalene. *J Chem Soc Trans* 1975;71:35-41.
122. Sinke GC. A method for measurement of vapor pressures of organic compounds below 0.1 Torr Naphthalene as a reference substance. *J Chem Soc Trans* 1974;6(4):311-316.
123. Octamethylcyclotetrasiloxane (D4). *Toxicol Ind Health* 2017;(33-1):2-15.
124. Flaningam OL. Vapor pressures of poly(dimethylsiloxane) oligomers. *J Chem Eng Data* 1986;31(3):266–272.
125. Dekant W, Scialli AR, Plotzke K, Klaunig JE. Biological relevance of effects following chronic administration of Octamethylcyclotetrasiloxane Biological relevance of effects following chronic administration of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) in Fischer 344 rats. *Toxicol Lett* 2017;S0378-4274(17):30010-3.
126. Acree W, Chickos JS. Phase Transition Enthalpy Measurements of Organic and Organometallic Compounds and Ionic Liquids. Sublimation, Vaporization, and Fusion Enthalpies from 1880 to 2015. Part 2. C11–C192. *J Phys Chem Ref Data* 2017;46(1):013104.
127. Sun X, Tabakman SM, Seo WS, et al. Separation of Nanoparticles in a Density Gradient: FeCo@C and Gold Nanocrystals. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48(5):939-942.

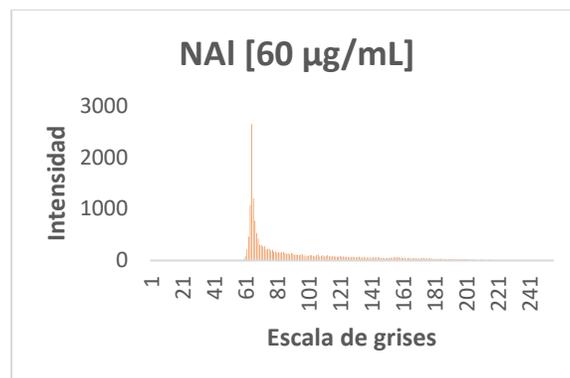
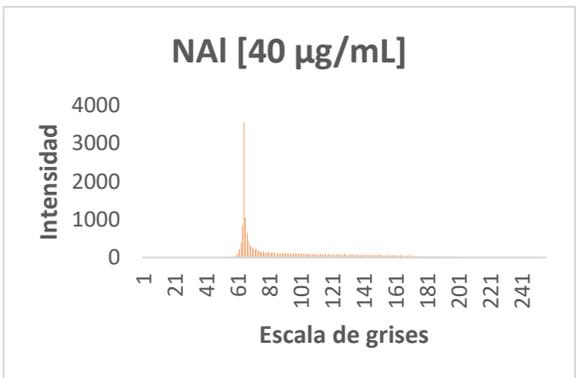
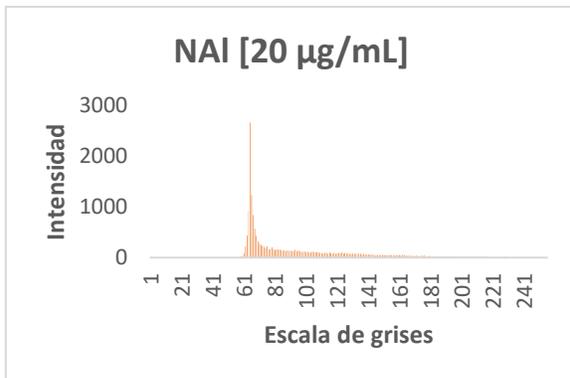
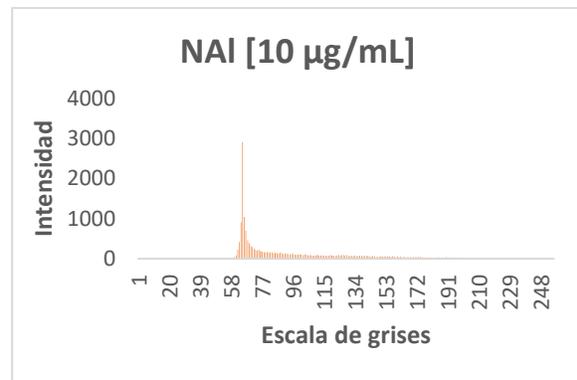
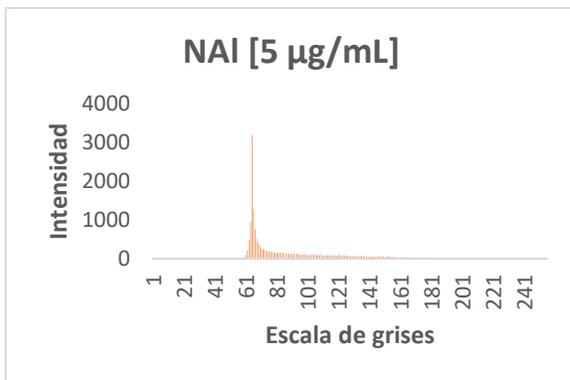
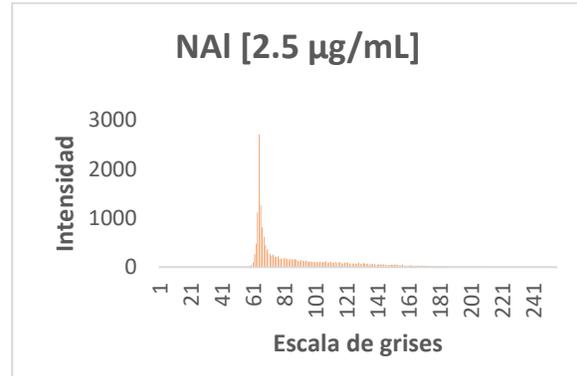
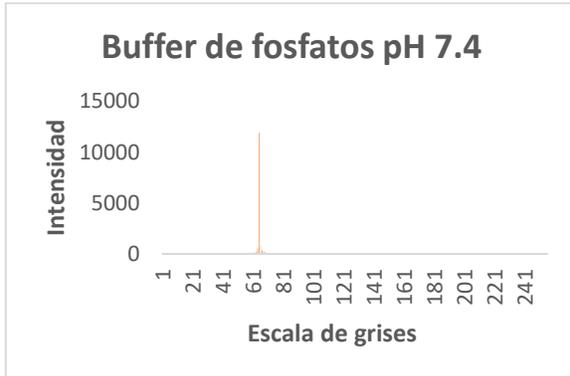
-
128. Mosqueira VC, Legrand P, Pinto-Alphandary H, et al. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J Pharm Sci* 2000;89(5):614-26.
129. Peltonen L, Hirvonen J. Physicochemical Characterization of Nano- and Microparticles. *Curr Nanosci* 2008;4(1):101-107.
130. Zhu H, Zhang Y, Jieni Y, Bin L. Measurement Methods of Nanoparticles and Development Trends. *J Nanosci Nanotechnol* 2016;16(8):8228-8236.
131. Ortega-Oller I, Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, et al. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *Biomed Res Int* 2015;2015:415289.
132. Zhou W, Wang ZL. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. New York: Springer;2007:522.
133. Pathak Y, Thassu D. *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. New York: Informa Health Care;2009:416.
134. Vauthier C, Ponchel G. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines: A Guide for their Design, Preparation and Development*. Switzerland: Springer;2016:641.

XI. ANEXOS

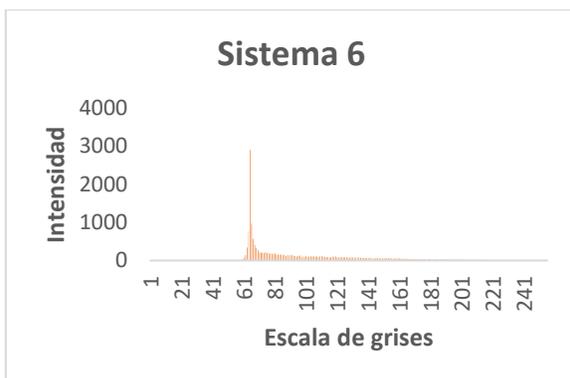
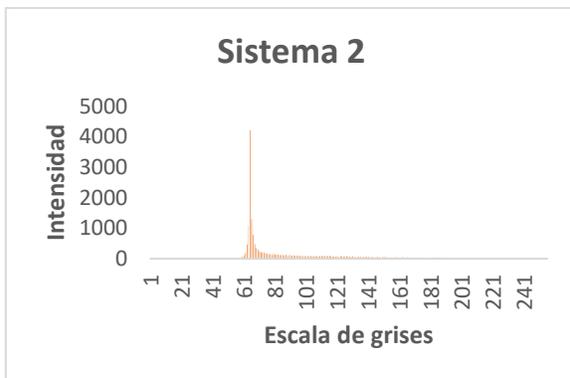
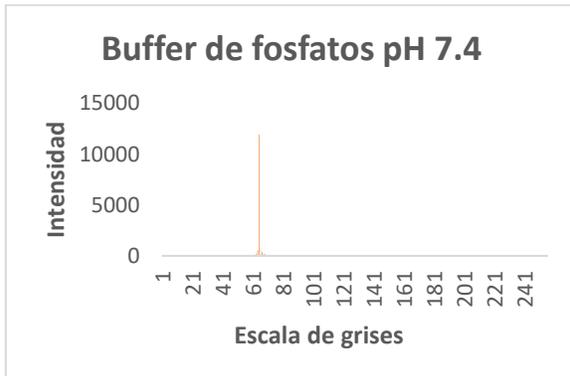
I. HISTOGRAMAS DE VPEG CURVA DOSIS-RESPUESTA NE vs BLANCO (BUFFER DE FOSFATOS pH 7.4)

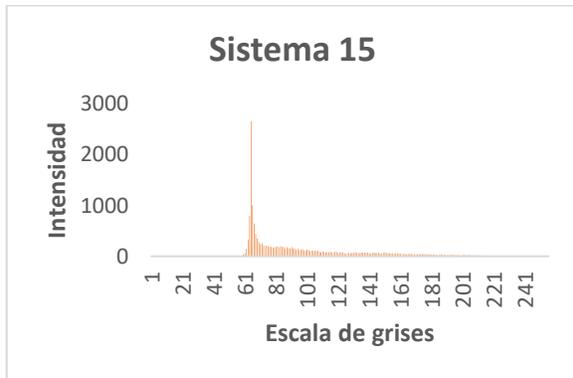
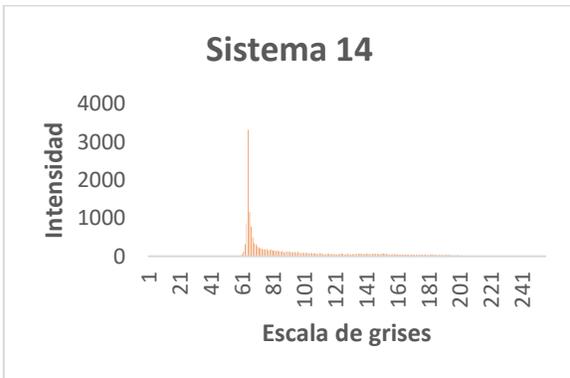
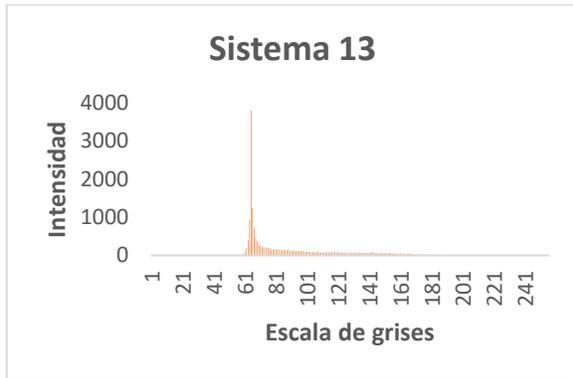
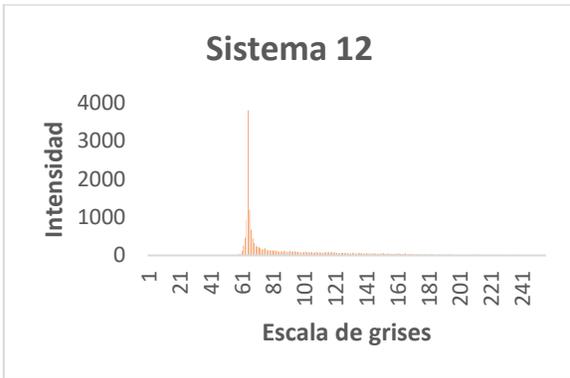
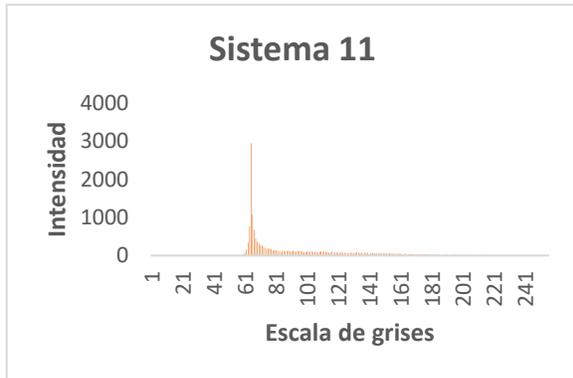
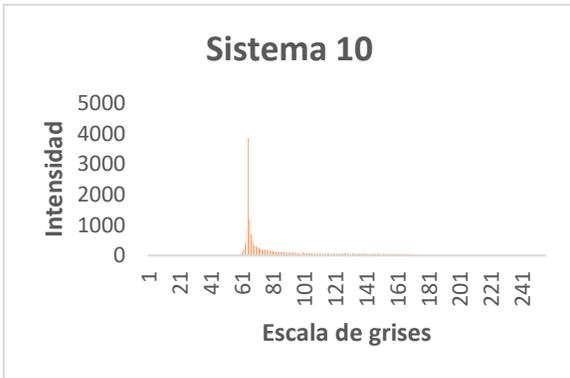
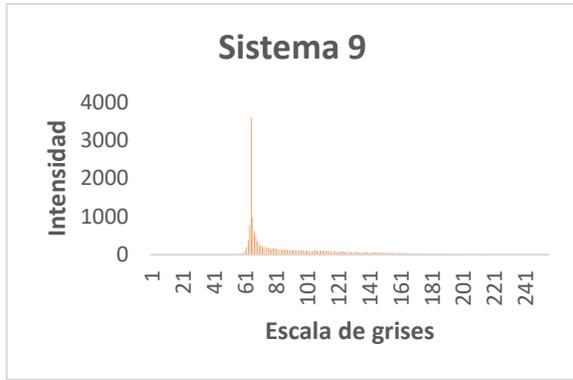
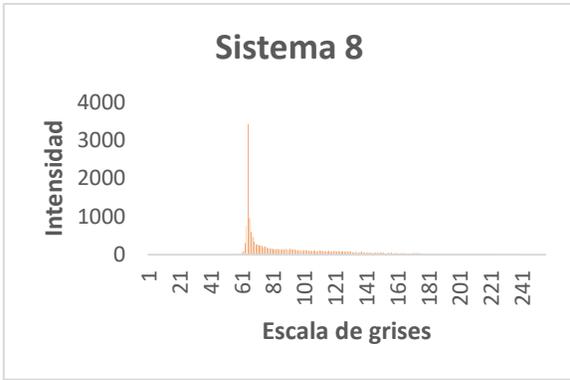


II. HISTOGRAMAS DE VPEG CURVA DOSIS-RESPUESTA NAI vs BLANCO (BUFFER DE FOSFATOS pH 7.4)



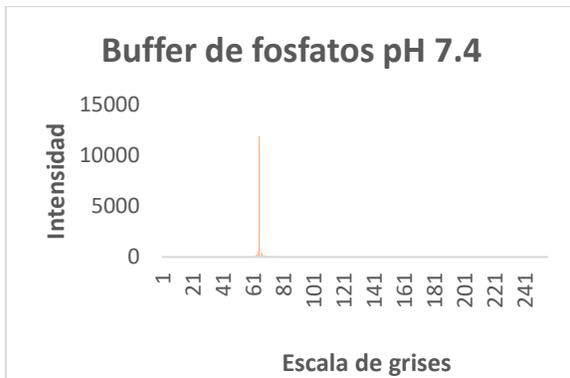
III. HISTOGRAMAS DE VPEG DE LOS SISTEMAS OBTENIDOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL vs BLANCO (BUFFER DE FOSFATOS pH 7.4)

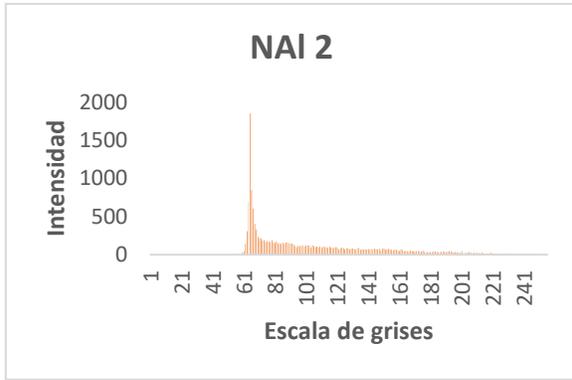




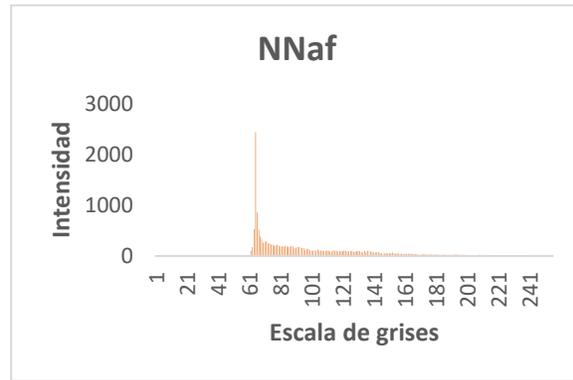
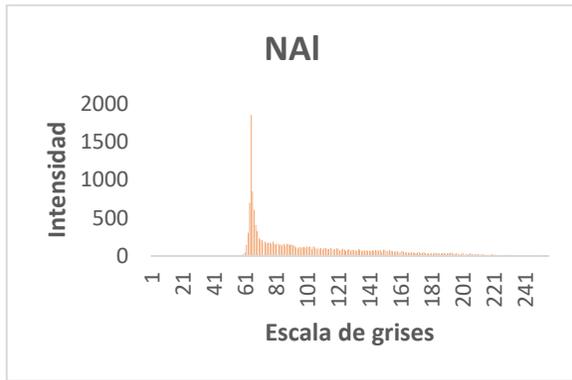
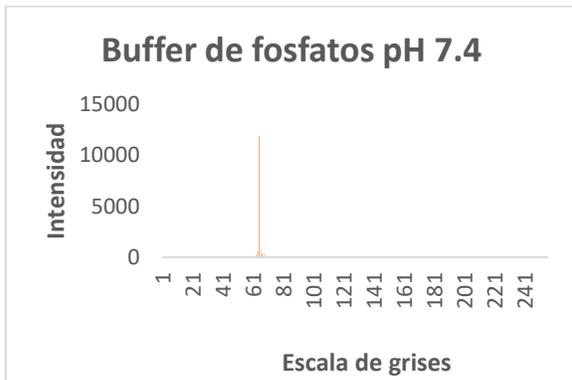


IV. HISTOGRAMAS DE VPEG DE LOS SISTEMAS OPTIMIZADOS vs BLANCO (BUFFER DE FOSFATOS pH 7.4)





V. HISTOGRAMAS DE VPEG DE LOS SISTEMAS PREPARADOS EN LA VERSATILIDAD DE MÉTODO vs BLANCO (BUFFER DE FOSFATOS pH 7.4)



VI. ANOVA DE UN FACTOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MEJORÍA DE CONTRASTE POR ULTRASONIDO, DE LOS SISTEMAS PREPARADOS EN LA VERSATILIDAD DEL MÉTODO.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	231.2977487	3	77.09924956	126.7906	4.39401E-07	4.06618055
Dentro de los grupos	4.864665532	8	0.608083191			
Total	236.1624142	11				

Nivel de confianza del 95%

VII. PRUEBA DE TUKEY PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MEJORÍA DE CONTRASTE POR ULTRASONIDO, DE LOS SISTEMAS PREPARADOS EN LA VERSATILIDAD DEL MÉTODO.

		Diferencia de cuadrados entre grupos	
HSD	2.03947823	NAI vs NE	11.9414
qα	4.53	NAI vs NNaf	3.0471
Cuadrado del error medio	0.60808319	NAI vs NCiclo	4.6265
n	3	NE vs NNaf	8.8943
		NE vs NCiclo	7.3149
		NNaf vs NCiclo	1.5793

Nivel de confianza del 95%