



APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE MICROBOLHAS COM CÁPSULAS DE  
POLICAPROLACTONA EM ULTRASSOM

Lucas Lobianco De Matheo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque  
Pereira  
Marco Antonio von Krüger

Rio de Janeiro  
Julho de 2020

APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE MICROBOLHAS COM CÁPSULAS DE  
POLICAPROLACTONA EM ULTRASSOM

Lucas Lobianco De Matheo

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM  
ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

---

Wagner Coelho de Albuquerque Pereira (Orientador)

---

Roberto Macoto Ichinose

---

Flavia Fernandes Ferreira da Silva

---

Marcos Lopes Dias

---

Antonio Adilton Oliveira Carneiro

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

Julho de 2020

De Matheo, Lucas Lobianco

Aplicações Biomédicas de Microbolhas com Cápsulas de Policaprolactona em Ultrassom/Lucas Lobianco De Matheo. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

XVII, 104 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antonio von Krüger

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 96 - 104.

1.Ultrassonografia de Contraste. 2. Microcápsulas Poliméricas. I. Pereira, Wagner Coelho de Albuquerque *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título

« Vous ne pouvez espérer construire un monde meilleur sans améliorer les individus. À cette fin, chacun de nous doit travailler à sa propre amélioration et, en même temps, partager une responsabilité générale pour toute l'humanité, notre devoir particulier étant d'aider ceux pour qui nous pensons être le plus utile. »

- Marie Curie

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários  
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE MICROBOLHAS COM CÁPSULAS DE  
POLICAPROLACTONA EM ULTRASSOM

Lucas Lobianco De Matheo

Julho/2020

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antônio von Krüger

Programa: Engenharia Biomédica

A ultrassonografia com contraste (CEUS) é uma ferramenta importante e recente para medicina diagnóstica e terapêutica - teranóstica. Esta técnica consiste na aplicação de agentes de contraste para ultrassom (ACUs), formados por microbolhas (MBs) encapsuladas para aumentar o contraste na imagem ultrassonográfica. Além disso, os ACUs oferecem baixo risco à saúde do paciente e induzem poucos efeitos adversos, permitindo um tratamento personalizado e de baixo custo quando comparado a outros procedimentos. Este projeto visa sintetizar ACUs de ar encapsuladas com o polímero policaprolactona (PCL), um poliéster hidrofóbico biodegradável que possui aplicações biomédicas aprovadas pela *Food and Drugs Administration/USA*. Buscou-se, aqui, desenvolver e comparar ACUs poliméricas para diagnóstico ou terapia ultrassonográfica, contribuindo para o desenvolvimento da ciência, tecnologia e mercado de produtos nacionais. O projeto foi dividido em duas fases principais: Fase 1 - Produção de ACUs com o biopolímero PLC, utilizando a técnica de dupla emulsão (W / O / W) seguida de evaporação do solvente. Poli(álcool vinílico) – PVA, foi usado como

dispersante. Clorofórmio P.A. e água Option-Q como solventes, da PCL e do PVA, respectivamente. Fase 2 - Análise das propriedades acústicas das ACUs, avaliando a estabilidade destas em suspensão, retroespalhamento (pela técnica de Pulso-Eco) e resposta à pressão acústica (aplicando pressão crescente sobre as ACUs). Como resultado, todas as ACUs produzidas tiveram sua morfologia avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura, exibindo cápsulas porosas e esféricas. A homogeneidade, bem como a distribuição de tamanho das ACUs foi avaliada utilizando a difração a laser, mostrando uma distribuição homogênea e não superior a  $15\mu\text{m}$  de diâmetro em 90% da população. A concentração obtida foi suficiente para atingir a dose necessária para CEUS. Foi evidente que as ACUs porosas feitas com PCL45 foram superiores às PCL10 nas condições experimentais testadas em relação à retroespalhamento e resposta à pressão acústica, mas diferente de uma ACU fosfolipídica convencional, estas são menos responsivas à pressão acústicas incidente, sendo possivelmente, adequadas a usos com HIFU.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ULTRASOUND BIOMEDICAL APPLICATIONS OF POLYCAPROLACTONE  
SHILLED MICROBUBBLES

Lucas Lobianco De Matheo

July/2020

Advisors: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antônio von Krüger

Department: Biomedical Engineering

Contrast ultrasonography (CEUS) is an important and recent tool for diagnostic and therapeutic medicine - teranostics. This technique consists basically on the application of ultrasound contrast agents (UCAs), formed by encapsulated microbubbles (MBs) to increase the contrast in the ultrasound image. In addition, UCAs offer low risk to the patient's health and induce few adverse effects, allowing for personalized and low-cost treatment when compared to other procedures. This project aims to synthesize air UCAs encapsulated with the polycaprolactone polymer (PCL), a biodegradable hydrophobic polyester that has biomedical applications approved by the Food and Drugs Administration / USA. We sought here to develop and compare, polymeric UCAs for ultrasound diagnosis or therapy, contributing to the development of science, technology and national products market. The project was divided

into two main phases: Phase 1 - Production of UCAs using PLC biopolymer, using the double emulsion (W/O/W) technique followed by solvent evaporation. Poly (vinyl alcohol) - PVA, was used as a dispersant. Chloroform P.A. and water Option-Q as solvents, from PCL and PVA, respectively. Phase 2 - Analysis of acoustic properties of UCAs, evaluating their stability in suspension, backscattering (using the Pulse-Echo technique) and response to acoustic pressure (applying increasing pressure on UCAs). As a result, all the UCAs produced had their morphology evaluated by Scanning Electron Microscopy, showing porous and spherical capsules. The homogeneity, as well as the size distribution, was evaluated using laser diffraction, showing a homogeneous distribution and not exceeding  $15\mu\text{m}$  diameter in 90% of the population. The obtained concentration was sufficient to reach the dose required for CEUS (about  $108 \text{ UCAs} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). It was evident that the porous UCAs made with PCL45 were superior to the PCL10 in the experimental conditions tested in relation to backscatter and in response to acoustic pressure, but different from a conventional phospholipid ACU, these are less responsive to incident acoustic pressure, possibly being suitable for HIFU experiments.

## LISTA DE SIGLAS

A/O - Água/óleo abreviação utilizada para descrever emulsões em que o dispersante é hidrofóbico.

A/O/A – Água/óleo/água, abreviação utilizada para descrever dupla emulsões cujo disperso inicial e dispersante final é hidrofílico.

ACs – Agentes de Contraste – Categoria que engloba todos os tipos de agentes de contraste para imagem.

ACUs – Agentes de Contraste para Ultrassom

CAGR - Taxa Composta Anual de Crescimento

CEUS – *Contrast enhanced Ultrasound* – Ultrassonografia de Contraste

DC – *Duty Cycle* - Ciclo de trabalho

DFT - *Discrete Fourier transform* - Transformada discreta de Fourier

SLS – Espalhamento de Luz Estático

DS – *Duration of Sonication* - Duração de Irradiação – tempo de exposição da amostra ao ultrassom

EPR – *Enhanced Permeability and Retention* – Efeito Permeabilidade e Retenção Acentuada, característico de nBs.

EUA – Estados Unidos da América

FDA ou FDA/EUA– *Food and Drugs Administration* dos Estados Unidos da América – Órgão responsável pela liberação de consumo e uso de produtos nos EUA.

FFT – *Fast Fourier Transform* – Transformada Rápida de Fourier

$f$  – Frequência

GUI - *Graphical User Interface* – Interface Gráfica do Usuário

I.M. – Índice Mecânico

LIB - *Laboratoire d'Imagerie Biomédicale* - Laboratório de Imagens Biomédicas

LUS – Laboratório de Ultrassom

MBs - Microbolhas

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

nBs - Nanobolhas

PCL – Policaprolactona

PCR - *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

PEG – Poli(etileno glicol)

PES – Polietersulfona

PLA - Poli(ácido lático)

PME - *Premix Membrane Emulsification*

PNP – Pico de Pressão Negativa

PP – Polipropileno

PRF – Frequência de Repetição de Pulso

PRP – Período de Repetição de Pulso

PTFE – Politetrafluoretileno ou Teflon®

PVA – Álcool polivinílico

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

RF – Rádio Frequência

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RSC – Razão Sinal/Controle

US – Ultrassom

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: ACUs comerciais e algumas de suas características..</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2: Comparação entre as três principais categorias de agentes de contraste</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 3: Esquema Experimental para a análise da Resposta à Pressão Acústica.</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 4 Valores de Retroespalhamento de cada amostra em cada frequência.</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 5: Valores do retroespalhamento referente a análise de estabilidade das amostras de ACU.</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 6: Valores dos sinais de segundo harmônico das FFTs</i>	<i>82</i>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: As ACUs e suas aplicações.</i>	2
<i>Figura 2: Monômero, mero e polímero.</i>	8
<i>Figura 3: Cronologia da tecnologia relacionada as ACUs.</i>	16
<i>Figura 4: Linha do tempo do surgimento das principais ACUs comerciais.</i>	18
<i>Figura 5: Apresentação física da PCL</i>	21
<i>Figura 6: Representação da estrutura do mero da policaprolactona</i>	21
<i>Figura 7: Reflexão da onda de ultrassom incidente ao trocar de meio com impedâncias diferentes.</i>	25
<i>Figura 8: Esquema da atenuação de uma onda de ultrassom em um meio.</i>	26
<i>Figura 9: Representação do comprimento de onda em relação ao tamanho da ACU.</i>	28
<i>Figura 10: Espalhamento do ultrassom diante de partículas.</i>	28
<i>Figura 11: Comportamento de uma onda de comprimento de onda inferior ao diâmetro de um casca cilíndrica interagindo.</i>	29
<i>Figura 12: Speckle, ou interferências coerentes</i>	30
<i>Figura 13: Trade-off entre resolução e penetração.</i>	31
<i>Figura 14: Esquema de sinais dos ecos de retorno após interação de um único disparo com refletores em um meio sem atenuação.</i>	32
<i>Figura 15: Esquema da percepção da amplitude do eco de retorno e sua correspondência com o valor na escala de cinza.</i>	33
<i>Figura 16: Representação do modo-B.</i>	34
<i>Figura 17: A evolução da tecnologia de ultrassonografia.</i>	35
<i>Figura 18: Frequência de Repetição de Pulso, PRF.</i>	36
<i>Figura 19: Ciclo de Trabalho, Duty Cycle.</i>	37
<i>Figura 20: Relação do Ciclo de Trabalho com os efeitos térmicos e não térmicos.</i>	37
<i>Figura 21 Curva ilustrativa da pressão em função do tempo.</i>	40
<i>Figura 22: Comportamento de uma microbolha interagindo com uma onda de ultrassom.</i>	40
<i>Figura 23: Resumo das aplicações Terapêuticas e Diagnósticas das ACUs.</i>	44
<i>Figura 24: Resumo dos métodos a serem empregados no projeto.</i>	46

<i>Figura 25: Imagem de um Liofilizador Liotop LI01.</i>	48
<i>Figura 26: Foto da bancada de trabalho para a produção das ACUs.</i>	49
<i>Figura 27: Imagem de um Microscópio ótico Evos XL.</i>	50
<i>Figura 28: Câmara de Neubauer</i>	51
<i>Figura 29: Imagem de um Microscópio Eletrônico JEOL.</i>	51
<i>Figura 30: Imagem de um Mastersizer Malvern 2000.</i>	52
<i>Figura 31: Esquema para filtragem das ACUs.</i>	53
<i>Figura 32: Imagem de um microscópio de força atômica JPK.</i>	54
<i>Figura 33: Processo de análise de uma região por AFM.</i>	55
<i>Figura 34: Curva de Força da AFM.</i>	55
<i>Figura 35: Equipamentos utilizados na configuração experimental para as análises de pulso-eco.</i>	57
<i>Figura 36: Configuração experimental para as análises de pulso-eco.</i>	58
<i>Figura 37: Ilustração da configuração experimental proposta para a análise das ACUs.</i>	59
<i>Figura 38: Estimando o posicionamento da janela de observação do sinal.</i>	60
<i>Figura 39: Utilizando os cem sinais de FFT para obtenção de um único sinal para análise utilizando-se a FFT das médias dos sinais.</i>	61
<i>Figura 40: Equipamentos utilizados na configuração experimental para as análises da resposta à pressão acústica.</i>	64
<i>Figura 41: Configuração experimental para as análises da resposta à pressão acústica.</i>	65
<i>Figura 42: Abordagem experimental proposta para a análise da resposta à pressão acústica.</i>	66
<i>Figura 43: Interface GUI do programa escrito em Matlab®.</i>	68
<i>Figura 44: Fotografia dos Primeiros Grupos de ACUs poliméricas.</i>	69
<i>Figura 45: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200. Grumos bastante presentes.</i>	70
<i>Figura 46: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	71
<i>Figura 47: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura exemplificando a presença de PVA aderido a cápsula de PCL das ACUs</i>	71
<i>Figura 48: Imagens dos novos grupos de ACUs.</i>	72
<i>Figura 49: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200.</i>	73

<i>Figura 50: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa das ACUs referentes aos Novos Grupos.</i>	74
<i>Figura 51: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa das ACUs feitas sob o procedimento de evaporação do solvente controlado.</i>	75
<i>Figura 52: Curva da distribuição do tamanho das ACUs.</i>	76
<i>Figura 53: Foto do filtro de náilon após a primeira filtração.</i>	77
<i>Figura 54: Filtração das ACUs.</i>	77
<i>Figura 55: Sinais de FFT típicos de cada frequência avaliada.</i>	78
<i>Figura 56: Implementação da curva Spline sobre as FFTs.</i>	79
<i>Figura 57: Curva do padrão de retroespalhamento das amostras de PCL.</i>	79
<i>Figura 58: Análise da estabilidade temporal das amostras de PCL no intervalo de uma semana.</i>	81
<i>Figura 59: Análise da estabilidade temporal da amostra de PCL45 no intervalo de 7 dias.</i>	81
<i>Figura 60: Comparação entre os sinais de FFT das ACUs e da referência.</i>	82
<i>Figura 61: Gráfico da resposta acústica das ACUs em função do I.M.</i>	83
<i>Figura 62: Ilustração descritiva da proposta de ação do campo acústico sobre as ACUs produzidas.</i>	94

## Sumário

LISTA DE SIGLAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
INTRODUÇÃO .....	1
1.1 RELEVÂNCIA DO TEMA .....	5
OBJETIVOS .....	6
REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 POLÍMEROS .....	7
3.2 BIOPOLÍMEROS .....	9
3.3 BIOPOLÍMEROS EM APLICAÇÕES MÉDICAS – VISÃO GERAL .....	10
3.4 TIPOS DE AGENTES DE CONTRASTE .....	11
3.5 POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA) .....	20
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	23
4.1 ULTRASSOM.....	23
4.2 ULTRASSONOGRÁFIA.....	31
4.4 FREQUÊNCIA E PERÍODO DE REPETIÇÃO DE PULSO – PRF E PRP .....	35
4.5 CICLO DE TRABALHO – <i>DUTY CYCLE</i> .....	36
4.6 CAVITAÇÃO .....	37

4.7 MODO CONTRASTE EM ULTRASSONOGRAFIA - CEUS .....	43
MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
5.1 POLI(ÁLCOOL VINÍLICO), <i>POLYVINYL ALCOHOL</i> – PVA.....	46
5.2 POLICAPROLACTONA, <i>POLYCAPROLACTONE</i> – PCL .....	47
5.3 FORMAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	47
5.4 ANÁLISE PRELIMINAR DAS ACUs E CONTAGEM POR CÂMARA DE NEUBAUER .....	49
5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	51
5.6 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO (MASTERSIZER®) .....	52
5.7 PREPARO E FILTRAGEM DAS AMOSTRAS.....	52
5.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	54
5.8 ESTIMATIVA DA ESPESSURA DAS CÁPSULAS .....	56
5.9 ULTRASSOM EM MODO PULSO-ECO – AS ACUs SÃO CAPAZES DE PRODUZIR RETROESPALHAMENTO?.....	56
5.10 ESTABILIDADE TEMPORAL DAS ACUs – ESTAS PERDEM VIABILIDADE QUANDO EXPOSTAS A ÁGUA? .....	62
5.11 ANÁLISE DE RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA .....	62
RESULTADOS.....	69
6.1 OS PRIMEIRAS GRUPO DE ACUs.....	69
6.2 OS NOVOS GRUPOS DE ACUs.....	72
6.3 FILTRANDO OS ACUs .....	76

6.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPESSURA DE CÁPSULA .....	78
6.5 RETROESPALHAMENTO.....	78
6.6 ESTABILIDADE TEMPORAL .....	80
6.7 RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA .....	82
DISCUSSÃO .....	84
7.1 POR QUE POLIMÉRICA E POR QUE POLICAPROLACTONA? .....	84
7.2 PRIMEIRAS ACUs PRODUZIDAS .....	85
7.3 NOVA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DAS ACUs .....	86
7.4 ACUs PRODUZIDAS COM A NOVA ESTRATÉGIA – NOVO GRUPO .....	88
7.7 AS CARACTERÍSTICAS DO RESTROESPALHAMENTO DAS ACUs .....	90
7.8 AS CARACTERÍSTICAS DE ESTABILIDADE TEMPORAL DAS ACUs.....	92
7.9 AS CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA DAS ACUs .....	92
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	95
REFERÊNCIAS .....	97

## INTRODUÇÃO

A ultrassonografia de contraste – CEUS, com aplicação de Agentes de Contraste para Ultrassom (ACUs) é uma importante e recente ferramenta para a medicina diagnóstica e terapêutica – teranóstica, consistindo na utilização de microcápsulas de núcleo gasoso com a finalidade de elevar o contraste em imagens de ultrassom, carrear agentes terapêuticos a sítios específicos ou ambos (DIZEUX et al., 2016; JABLONOWSKI et al., 2016; KOTHAPALLI et al., 2016; MEHTA et al., 2017; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017; VERSLUIS et al., 2020). Estas possibilidades de elevar o contraste em regiões específicas, aumentam o interesse em utilizar as ACUs para estudos de perfusão e para estudos do sistema cardiovascular (CHEN et al., 2018; DOURY et al., 2017a, 2017b; VERSLUIS et al., 2020); para diagnóstico precoce e tratamento de doenças neoplásicas, tais como, câncer de pâncreas (YU et al., 2016), câncer de mama (ABOU-ELKACEM et al., 2016), câncer de próstata (HUANG et al., 2016; LEE; YOON; BAE, 2016), tumores cerebrais (FAN et al., 2016), câncer colorretal (BLOCH et al., 2015; ONJI et al., 2012), gastropatias (KIYONO et al., 2016), câncer hepático (XU et al., 2016), entre outras neoplasias, devido à neovascularização e alterações da vascularização presentes nestes tecidos (DIZEUX et al., 2016; LINDSEY; ROJAS; DAYTON, 2015). Uma vez que a técnica se mostra abrangente, pode ser considerada um campo aberto a inúmeras possibilidades de estudo e investimento. Além de ser uma técnica versátil, minimamente invasiva, de baixo risco e reduzidos efeitos colaterais, que possibilita tratamentos personalizados, com baixo custo e portátil (DIZEUX et al., 2016; FANG YANG et al., 2008; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). A Figura 1 mostra os procedimentos correntes de aplicação da técnica e os procedimentos em estudo (CHEN et al., 2018; STRIDE, 2009).

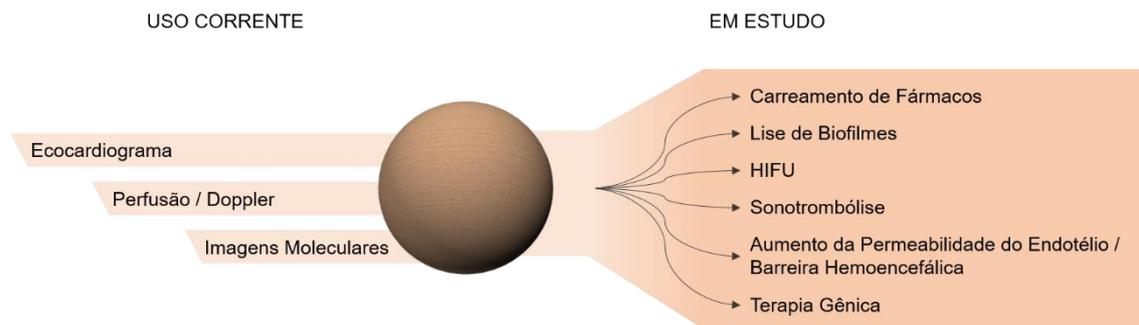


Figura 1: As ACUs e suas aplicações. As ACUs comerciais são usadas principalmente para o setor de cardiologia e na realização de estudos de perfusão. Com as diferentes possibilidades de uso, as ACUs estão em testes para diversos outros procedimentos, mas ainda sem autorização de uso pelos órgãos reguladores nestes procedimentos.

No mercado e nos laboratórios de pesquisa encontram-se diferentes tipos de ACUs, que possuem características diferentes entre si, dependendo do material que as constitui e do modo de fabricação empregado. Por isso, deve-se explorar e entender como cada tipo de ACU interage com as ondas de ultrassom e com o tecido biológico (HYVELIN et al., 2013). Os fatores fundamentais para este entendimento estão diretamente relacionados à estrutura das ACUs, como, tamanho, uniformidade, composição da cápsula, do conteúdo interno, espessura da cápsula, razão entre a espessura da cápsula e o seu respectivo raio, estabilidade, densidade, compressibilidade, frequência de ressonância, cavitação, ponto de ruptura, atenuação, espalhamento, (AMMI et al., 2006; HYVELIN et al., 2013; LINDSEY; ROJAS; DAYTON, 2015), ligantes de superfície, citotoxicidade (ABE et al., 2010), eliminação sistêmica (HYVELIN et al., 2013)<sup>1</sup>, entre outras. Como o uso de ACUs comerciais não permite que alterações estruturais nas cápsulas sejam realizadas, são necessárias novas abordagens que permitam a síntese de agentes de contraste para ultrassonografia, viabilizando estudos sistematizados sobre os fatores listados. Uma vez que entender estes fatores e como influenciam nos comportamentos das ACUs quando expostas ao campo de ultrassom é de suma importância para os avanços do conhecimento na área de ultrassonografia de contraste.

<sup>1</sup> Este projeto não contempla uma fase de testes para ligantes de superfície, citotoxicidade e eliminação sistêmica, mas conta com dados teóricos que indicam a PCL como candidata a exibir bons resultados em testes deste tipo.

Um dos principais fatores acústicos que afetam o comportamento das ACUs quando em interação com o campo de ultrassom é o Índice Mecânico (I.M.) da onda incidente, pois este, está ligado diretamente à estabilidade e ao ponto de ruptura, que por sua vez dependem do tipo da cápsula e de sua espessura (AMMI et al., 2006; SHEERAN et al., 2011). O efeito da pressão negativa exercida pela onda de ultrassom tem impactos importantes sobre os tecidos biológicos e sobre as ACUs. Podendo provocar efeitos deletérios ao organismo quando ultrapassado um limite máximo e, portanto, todo equipamento de ultrassonografia deve exibir o valor do I.M. aplicado ao tecido (o item 4.6 CAVITAÇÃO volta a falar deste tema com mais detalhes).

O polímero selecionado para este projeto é a policaprolactona (PLC), um polímero poliéster biodegradável, hidrofóbico, com aplicações biomédicas, aprovado pela *Food and Drugs Administration* dos Estados Unidos da América (FDA/EUA) (ANDRÉA C. BERTOLINI, 2007), o item 3.5 POLI(ε-CAPROLACTONA), trata sobre o polímero com mais detalhes.

Uma potencial aplicação clínica destas ACUs recai sobre o diagnóstico da endometriose, uma doença que se caracteriza pelo crescimento do tecido endometrial em regiões externas à cavidade uterina, constituindo um tecido vascularizado em processo de neovascularização, assim como ocorre em tumores, além de ser a segunda doença ginecológica de maior prevalência entre as mulheres, cuja taxa de incidência estima-se atingir 10% da população feminina. Porém, mesmo com incidência elevada, é uma doença de diagnóstico difícil e demorado, uma vez que esta tarda a apresentar sintomas e quando os apresentam são comumente confundidos com dores menstruais (ENDOMETRIOSIS UK, 2018; HAASE MOEN, 2017; PRENTICE, 2001; REIS; MONTEIRO; CARNEIRO, 2017). Como o único método diagnóstico efetivo ainda é a videolaparoscopia, o diagnóstico em pacientes com a doença só ocorre em casos avançados, em que os órgãos afetados podem estar comprometidos, incentivando pesquisadores a buscar métodos não invasivos para o diagnóstico da doença (REIS; MONTEIRO; CARNEIRO, 2017). Ainda, estima-se que o tempo entre os primeiros

sintomas, quando existentes, e o diagnóstico dure em média 7,5 anos e custe 8,2 bilhões de Libras somente à economia da Inglaterra (ENDOMETRIOSIS UK, 2018). Entre as mulheres no mundo, em média, o intervalo de tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas, em geral ocorrem logo após a menarca e para se ter o diagnóstico temos uma variação de cinco a doze anos (HAASE MOEN, 2017; HUSBY; HAUGEN; MOEN, 2003), elevando despesas com cuidados pessoais, com planos de saúde, com a ausência ou queda de rendimento no trabalho, com tratamentos físicos e psicológicos específicos, entre outros transtornos.

Tratando de números mercadológicos e economia, segundo dados da página de internet (<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/contrast-media-market-911.html>), pesquisado em 04 de janeiro de 2018, o aumento das aprovações para o uso de agentes de contrastes (ACs) junto aos centros de diagnóstico públicos e privados, que visam melhorar a qualidade dos seus serviços, são fatores que impulsionam o mercado, que quando somados aos produtos já disponíveis no mercado, associados aos estudos em andamento para a aplicação destes e a elaboração de novas técnicas e abordagens, criam expectativas para o mercado de contrastes. Com isso, o mercado global de ACs projeta alcançar 5,53 bilhões de dólares americanos até 2022, partindo dos 4,57 bilhões que o segmento possuía em 2017. O segmento dos ACs para ultrassom (ACUs) é o que mais se espera crescer na CAGR, impulsionado principalmente pelos mercados Europeu, Norte Americano e Japonês. Quanto aos pedidos de patente, ocorreu um aumento neste tipo de atividade para ACUs, mas apenas menos de 25% destes pedidos foram para ACUs poliméricos na última década, evidenciando um espaço para o crescimento deste setor (METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Os equipamentos de ultrassonografia comerciais possuem funções dedicadas à abordagem com ACUs, o que evidencia o interesse diagnóstico e comercial do produto (FOSTER et al., 2002). Ainda, o valor estimado para a técnica de ultrassonografia de contraste é em geral mais barata que outras técnicas de imagem vigentes, sendo um outro fator econômico a ser considerado (HYVELIN et al., 2013).

Considerando os dados de saúde e os mercadológicos apresentados, mostra-se evidente a necessidade de investimento na área de contrastes para ultrassom.

### **1.1 RELEVÂNCIA DO TEMA**

Este projeto colabora para desenvolver e aperfeiçoar no Brasil tecnologias já dominadas em países do Hemisfério Norte, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da pesquisa científica brasileira e para o incremento de nossos estudos. O projeto também contribui para a valorização do mercado brasileiro e dos produtos nacionais, com tecnologia genuinamente brasileira, possibilitando a produção de cápsulas que podem sofrer alterações estruturais de acordo com os objetivos futuros de cada pesquisador, diferentemente das comerciais disponíveis, oferecendo mais opções para pesquisas diferenciadas e ampliando resultados de imagens para conhecimento e estudo de doenças. Por fim, o projeto ainda utiliza uma técnica diferente, minimamente invasiva, de baixo risco e de reduzidos efeitos colaterais, proporcionando inúmeras possibilidades de estudo e de investimentos, além de tratamentos personalizados, com baixo custo e portátil.

## OBJETIVOS

Este projeto visa produzir e caracterizar agentes de contraste com cápsulas porosas e poliméricas à base de PCL destinados à ultrassonografia de contraste, com vista a elucidar aspectos importantes destas ACUs em sua interação com o ultrassom, obtendo cápsulas que podem, futuramente, sofrer alterações estruturais de acordo com os objetivos específicos de cada pesquisador, diferentemente das comerciais disponíveis. Sendo, ainda, uma alternativa às disponíveis no mercado.

Como objetivos específicos, foram desenvolvidos microcápsulas de PCL de 10.000 e 45.000g/mol de massa molecular, com poros; em seguida, estas foram analisadas e comparadas quanto a:

- (1) características morfológicas e estruturais da cápsula;
- (2) intensidade do sinal refletido de volta ao transdutor de emissão por Pulso-Eco (retroespalhamento);
- (3) estabilidade temporal; e
- (4) resposta a pressão acústica (Cavitação).

## REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 POLÍMEROS

Dentre as áreas da química, a ciência de polímeros pode ser considerada um campo recente do conhecimento, pois foi no ano de 1920 que, o químico Hermann Staudinger, sugeriu uma nova forma de mostrar como partículas poderiam estar ligadas entre si, propondo que estas eram constituídas por uma longa camada de átomos ligados entre si por ligações covalentes no que ficou conhecido como polímeros (poli: muitos; mero: unidade), dando origem aos estudos das macromoléculas (SAGANUWAN, 2018). Polímeros são, portanto, formados por um conjunto de moléculas que juntas definem um conjunto unitário característico. Com esta definição ampla é possível pensar em inúmeros exemplos de estruturas e objetos que fazem parte deste conjunto, como as borrachas, tecidos, ceras, embalagens não metálicas, fibras, DNA, proteínas entre outros. De fato, todos esses são polímeros, porém, cada um em uma determinada categoria (MORENO RAJA et al., 2019). Muitos destes materiais fazem parte do dia a dia do ser humano a muitos séculos, ou até mesmo fazem parte dele. Mas foi apenas no final dos anos de 1920, quando Staudinger publicou um de seus trabalhos, que se alcançou uma forma de entender e trabalhar de maneira sistemática com estes materiais (DONALD R. ASKELAND; WENDELIN J. WRIGHT, 2014; SEBASTIAN KOLZENBURG; MICHAEL MASKOS; OSKAR NUYKEN, 2017; STAUDINGER, 1920).

Em outras palavras, polímeros, refere-se a macromoléculas formadas por monômeros, comumente conectados por ligações covalentes. Na síntese dos polímeros, os monômeros são anexados à cadeia em unidades repetitivas, chamadas de meros (Figura 2).

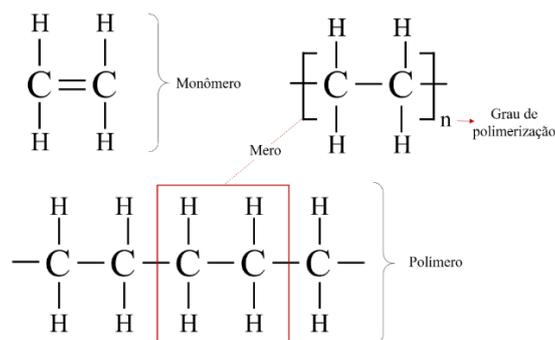


Figura 2: Monômero, mero e polímero. Representações plana do monômero de etileno, polímero de polietileno e seu respectivo mero. Este modelo serve de base pro entendimento futuro da policaprolactona.

Não há limites teóricos para o número de meros que constitui um polímero, porém, o grau de polimerização pode ser mensurado. Sendo assim, um polímero com baixo grau de polimerização pode ser considerado um oligômero. O grau de polimerização constitui uma das formas de classificação do polímero e é dado pela razão entre a massa molecular média do polímero e a massa de unidade repetitiva (DONALD R. ASKELAND; WENDELIN J. WRIGHT, 2014; SEBASTIAN KOLZENBURG; MICHAEL MASKOS; OSKAR NUYKEN, 2017). Além desta, ainda existem inúmeras outras formas de classificar um polímero, as quais estão relacionadas com sua influência nas propriedades físico-químicas destas macromoléculas<sup>2</sup>. As mais importantes destas propriedades são o tipo dos monômeros encontrados na cadeia, a ligação química entre as unidades repetitivas, o grau de polimerização, a arquitetura da cadeia, a incorporação de monômeros diferentes ao longo da cadeia, a disposição dos monômeros em uma copolimerização e interações específicas entre componentes da cadeia polimérica (SEBASTIAN KOLZENBURG; MICHAEL MASKOS; OSKAR NUYKEN, 2017). Todas estas propriedades dos polímeros os tornam versáteis e multifuncionais com elevado valor para as indústrias, para o desenvolvimento de novas tecnologias e para a ciência, uma vez que no entendimento e na manipulação destas

<sup>2</sup> Não é o foco desta tese aprofundar a classificação de polímeros, apenas mostrar que é um material de engenharia versátil que proporciona uma ampla possibilidade de modificações em sua estrutura. O que possibilita o desenvolvimento futuro de cápsulas diversificadas.

propriedades que se pode escolher, adequar e até mesmo combinar polímeros para um determinado objetivo.

Por exemplo, Methachan *et al.* descreve em seu trabalho os motivos pelos quais considera os materiais poliméricos vantajosos para a área médica, sendo a flexibilidade das múltiplas funcionalidades de materiais à base de polímeros, o principal motivo. Deste, o autor destaca a capacidade de modificar as estruturas químicas e o tamanho da cadeia, bem como, e também por consequência, a possibilidade de apresentar graus variados de biodegradabilidade e biocompatibilidade, apresentando potenciais a serem explorados na área médica (METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Ou seja, pode-se acelerar ou reduzir a velocidade de biodegradação de um polímero, torna-lo mais ou menos biocompatível, entre inúmeras outras características, ao trabalhar as propriedades dos polímeros de acordo com cada interesse.

### **3.2 BIOPOLÍMEROS**

Antes de abordar as aplicações médicas, cabe elucidar o conceito de biopolímeros, também conhecidos como “Polímeros Naturais”. São feitos de materiais renováveis e produzidos por sistemas biológicos ou matérias-primas derivadas de sistemas biológicos, sendo as categorias mais gerais para estes tipos os polissacarídeos, proteínas e polinucleotídeos (MORENO RAJA *et al.*, 2019). O uso e desenvolvimento destes polímeros para a indústria intensificaram-se a partir da percepção que o lixo proveniente de plásticos<sup>3</sup> representam uma grande ameaça ao meio ambiente. Recentemente, as aplicações para os biopolímeros são diversas na indústria, agricultura e empresas dos ramos de eletrônicos, da farmacêutica e da

---

<sup>3</sup> Nome comercial e popular dos polímeros, principalmente os sintéticos provenientes do petróleo.

medicina. Dentre as características dos biopolímeros, o que mais chama atenção em comparação com os não biopolímeros é a biocompatibilidade e a biodegradabilidade (ANDRÉA C. BERTOLINI, 2007). Contudo, nem todo biopolímero possui o benefício para a farmacêutica e medicina de ser biocompatível, pois, podem carregar impurezas, contaminações microbianas, propriedades mecânicas variadas e padrões de síntese e degradação imprevisíveis de acordo com a fonte de sua produção (MORENO RAJA et al., 2019). Existe, porém, um polímero que não é produzidos de fontes biológicas, como por exemplo, a policaprolactona, que é derivada de recursos fósseis como o petróleo, mas que mantém as características visadas dos polímeros naturais e que por consequência é amplamente utilizada na medicina e muitas vezes classificada, erroneamente, como biopolímero (SEBASTIAN KOLZENBURG; MICHAEL MASKOS; OSKAR NUYKEN, 2017).

### **3.3 BIOPOLÍMEROS EM APLICAÇÕES MÉDICAS – VISÃO GERAL**

As aplicações com biopolímeros na área médica são cada vez maiores, desde aplicações como próteses ortopédicas e dentais, aparelhos biomédicos, estruturas para engenharia tecidual, dermatologia, materiais de uso cirúrgico, produtos farmacêuticos, entre outros. Com isto, é fundamental que apresentem boa interação com o tecido biológico e, também, capacidade de bioreabsorção, ou seja, total eliminação do material, bem como seus resíduos.

Os poliésteres são largamente os polímeros mais estudados e utilizados na área medica, pois apresenta todas as características listadas acima. O processo de eliminação desta categoria de polímeros ocorre em geral pela hidrólise das ligações éster<sup>4</sup>, resultando nos terminais

---

<sup>4</sup> A presença de ligações éster é comum em biopolímeros, e esta é responsável pela sua capacidade de biodegradabilidade, devido a presença de íons ou radicais produzidos pelas células que levam a uma intensa hidrólise deste sítio (VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA et al., 2002).

carboxila e hidroxila e facilitando, então, sua eliminação (ANDRÉA C. BERTOLINI, 2007)<sup>5</sup>. Como mencionado, a policaprolactona não é um biopolímero, mas a mesma possui as mesmas características descritas acima com algumas diferenças que serão abordadas mais à frente no final deste capítulo e, portanto, faz parte da coorte de polímeros com aplicações em medicina.

Pattanashetti et al. inclui mais algumas vantagens dos biopolímeros, como o potencial baixo custo de aquisição e potenciais propriedades não trombogênicas. Na revisão, os autores tratam de biopolímeros inteligentes (*Smart Polymers*), que são responsivos a pH, temperatura e estímulos externos. Alterando rapidamente e de forma reversível sua estrutura em resposta a estímulos do meio em que se encontra. Com isto, o uso deste tipo de material possui aplicações abrangentes na área biomédica, sobre tudo para liberação de fármacos e terapia gênica e engenharia tecidual (PATTANASHETTI; HEGGANAVAR; KARIDURAGANAVAR, 2017).

### **3.4 TIPOS DE AGENTES DE CONTRASTE**

A tecnologia referente ACUs vem progredindo ao longo dos anos. Inicialmente, as bolhas eram gases, sem qualquer membrana, cápsula, ou maiores tecnologias envolvidas. Os pioneiros, Gramiak & Shah, em 1968, observaram que a aplicação de verde de idocianina na corrente sanguínea produzia um artefato passageiro nas imagens de ultrassom modo-B. Este artefato estava sendo provocado pela presença de microbolhas na região de observação e como, este poderia ser um artefato útil, se bem aplicado, os estudos na área de ultrassonografia de contraste foram iniciados<sup>6</sup> (NICOLAAS DE JONG, 1993; OWEN et al., 2018). Não muito tempo depois, percebendo a limitação de estabilidade temporal dos gases utilizados, grupos de pesquisa começaram a testar outros gases menos susceptíveis a dissolução no sangue, como

---

<sup>5</sup> Um apanhado rico em informações sobre polímeros em aplicações medicas pode ser encontrado no trabalho de Pathiraja A Gunatillake, 2003 (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003)

<sup>6</sup> As ACUs foram geradas por ação indireta do fármaco, não sendo ele um tipo de contraste para ultrassonografia.

o nitrogênio, hexafluoreto de enxofre, perfluorocarbono, entre outros (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; D'ARRIGO; SIMON; HO, 1991). Cada vez mais esta abordagem se mostraria como uma técnica útil, porém limitada pelo tempo que as bolhas permaneciam em circulação, principalmente quando nos anos de 1970 a 1980 percebeu-se que o pulmão representava uma barreira às estas, filtrando-as em pouco tempo (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). Foi então que em 1978, Bommer *et al.* apresentou uma variedade de bolhas que continham cápsulas e portanto, aumentava significativamente o tempo de circulação e estabilidade das mesmas (BOMMER *et al.*, 1978). Seis anos depois, o Colégio Americano de Cardiologia realizou o seu primeiro seminário, onde a Alburnex<sup>®</sup> foi apresentada. Portanto, foi em 1984 que a primeira ACU comercial foi apresentada, esta continha uma cápsula formada pela proteína sanguínea albumina e o núcleo de ar (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; OWEN *et al.*, 2018). Alburnex<sup>®</sup> é consequentemente, um ACU de primeira geração, caracterizados por uma cápsula rígida e núcleo de ar (NOVARIO *et al.*, 2005). O foco principal dos ACUs era inicialmente dedicado à cardiologia, isso devido ao fato de que nesta época, não só as próprias tecnologias em ACUs eram limitadas<sup>7</sup>, mas os equipamentos de ultrassonografia também o eram. Não demoraria para que grupos de pesquisa percebessem que a aplicação poderia ir além da cardiologia, e o monitoramento de perfusão era o segundo passo provável. Com o aumento do interesse pela tecnologia, foi a partir de 1984 que surgiram trabalhos sugerindo novos tipos de ACUs *home-made*, feitos em laboratório. Em 1991, Simon *et al.* mostrou um novo grupo de ACUs feito com cápsula lipídica (D'ARRIGO; SIMON; HO, 1991). Estas cápsulas seriam um avanço ao campo de estudo, e representariam o que seria chamado de segunda geração de ACUs, com cápsulas flexíveis e núcleo de gás denso e baixa difusão (NOVARIO *et al.*, 2005). Ainda em 1991, outros grupos de pesquisa mostravam que tumores podiam ser estudados com esta

---

<sup>7</sup> Um fator que pode ser considerado limitante às ACUs, até hoje, é o seu tamanho micrométrico que se limita a luz dos vasos sanguíneos, mas mesmo assim, muito se pode fazer na medicina por consequência deste fator. Assim mesmo, grupos de pesquisa buscam alternativas a essa considerada limitação. Isso será abordado em outro momento. Ainda, A FDA/EUA não aprovava o uso de nenhum ACUs que não fosse para cardiologia até o ano de 2016. O uso destas já era regulado em outros países (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018)

técnica (APFEL; HOLLAND, 1991; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018)<sup>8</sup>, e que existia uma forte necessidade de estudar os efeitos da pressão acústica sobre estas partículas e também sobre o paciente, o que levou Apfel & Holland a propor o que hoje é usado e conhecido como Índice Mecânico (APFEL; HOLLAND, 1991).

Curiosamente, embora as cápsulas tenham elevado o tempo de circulação dos ACUs, este tempo ainda era um fator limitante, sendo a estabilidade das bolhas um ponto a ser corrigido. Foi então que em 1994, Fritysch *et al.* propôs uma cápsula feita de um material rígido, o polímero sintético cianoacrilato, elevando a estabilidade dos ACUs por mais de 10 min no corpo humano, dando origem ao campo de estudo dos contrastes para ultrassom feitos a partir de polímeros sintéticos (PAEFGEN; DOLESCHER; KIESSLING, 2015). Desta proposta surgiram tentativas de contrastes comerciais, todos eles vindo a falhar ao longo do tempo por falta de aprovação para uso comercial, são estas, Sonovist<sup>®</sup> (Schering AG, Berlin, Alemanha) e POINT Biomedical (California, EUA).

Embora alguns autores apresentem uma terceira geração ou até mesmo quarta geração de ACUs<sup>9</sup>, estas classificações são teóricas e subjetivas, pois até o presente momento, não existe nenhum ACU aprovado pela FDA/EUA que não seja pertencente a primeira ou segunda geração, albumina, lipídios e fosfolipídios, (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; OWEN *et al.*, 2018) o que faz com que todas as demais tenham apenas caráter científico. Tão logo, é de se esperar que atualmente, existem diversos grupos de pesquisa trabalhando no tema, e, portanto, uma elevada variedade de possibilidades, tentativas, caminhos possíveis a serem desenvolvidos, sendo impraticável tentar seguir uma linha cronológica linear, muito menos acompanhar toda a literatura científica produzida. Contudo, alguns fatos são importantes.

---

<sup>8</sup> Aqui é interessante voltar a discussão do tamanho. Embora alguns tumores recebam aporte sanguíneo e estejam em processo de neovascularização, o que justificaria o uso das ACUs como rastreadores de perfusão tumoral, os grupos de pesquisa atualmente perceberam que a escala nano permitem a entrada das bolhas no tecido pode ser mais vantajoso que o uso das ACUs. Porém, essa discussão ainda é mais complexa e extensa.

<sup>9</sup> Está se fazendo uso de ACUs no lugar de ACUs como uma forma de generalização dos Agentes de Contraste de Ultrassom.

Como os ACUs capazes de carrear fármacos e funcionam não mais apenas para diagnóstico, mas para terapêutica. Neste ínterim, grupos de pesquisa começaram a modificar as estruturas das cápsulas, anexando compostos nanoparticulados ou até mesmo reduzindo as cápsulas a nanômetros de diâmetro (ASTAFYEVA et al., 2015a; FANG YANG et al., 2008; FERRARA; POLLARD; BORDEN, 2007; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017).

Continuando a história das ACUs, percebe-se um elevado investimento em nanobolhas (nBs), que são capazes de permear tecidos biológicos e aderir a camadas mais internas dos mesmos (CAI et al., 2015). Estas não se limitam à circulação sanguínea como no caso das microbolhas - MBs, e beneficia-se do efeito EPR – *Enhanced Permeability and Retention* causado pelo aumento dos espaços endoteliais durante processos de neovascularização e inflamação, que podem chegar entre 200 a 600nm, extravasando dos vasos sanguíneos e retendo-se no espaço endotelial do tecido lesionado (SHEERAN et al., 2011). Essas estruturas, no entanto, possuem menos contraste entre os tecidos alvos e o seu arredor quando comparado com as MBs, pois nBs encontram-se fora da faixa de tamanho ideal para entrar em ressonância com o ultrassom de uso clínico (1 - 7 $\mu$ m), não produzindo harmônicos das frequências de uso comum (2-15 MHz) (CALLIADA et al., 1998). Outro grupo investe em tais nBs produzidas por microrganismos como forma de obter um produto final homogêneo com maior resposta à ultrassonografia (SHAPIRO et al., 2014), mas em geral, tais grupos fazem uso de frequências mais elevadas podendo alcançar até 60MHz (FOSTER et al., 2000) o que inclui as biomicroscopias ultrassônicas de alta frequência que podem ser utilizadas para interagir com nBs<sup>10</sup> (DAEICHIN et al., 2014; FOSTER et al., 2002; JAFARI et al., 2014; SIRSI et al., 2010). Ainda, surgindo recentemente, grupos buscam por meio de nano-gotas capazes de sofrerem vaporização ao interagir com o campo de ultrassom, produzir contraste (ROJAS; DAYTON, 2018). Em pesquisa, portanto, pode-se apresentar uma faixa de frequências

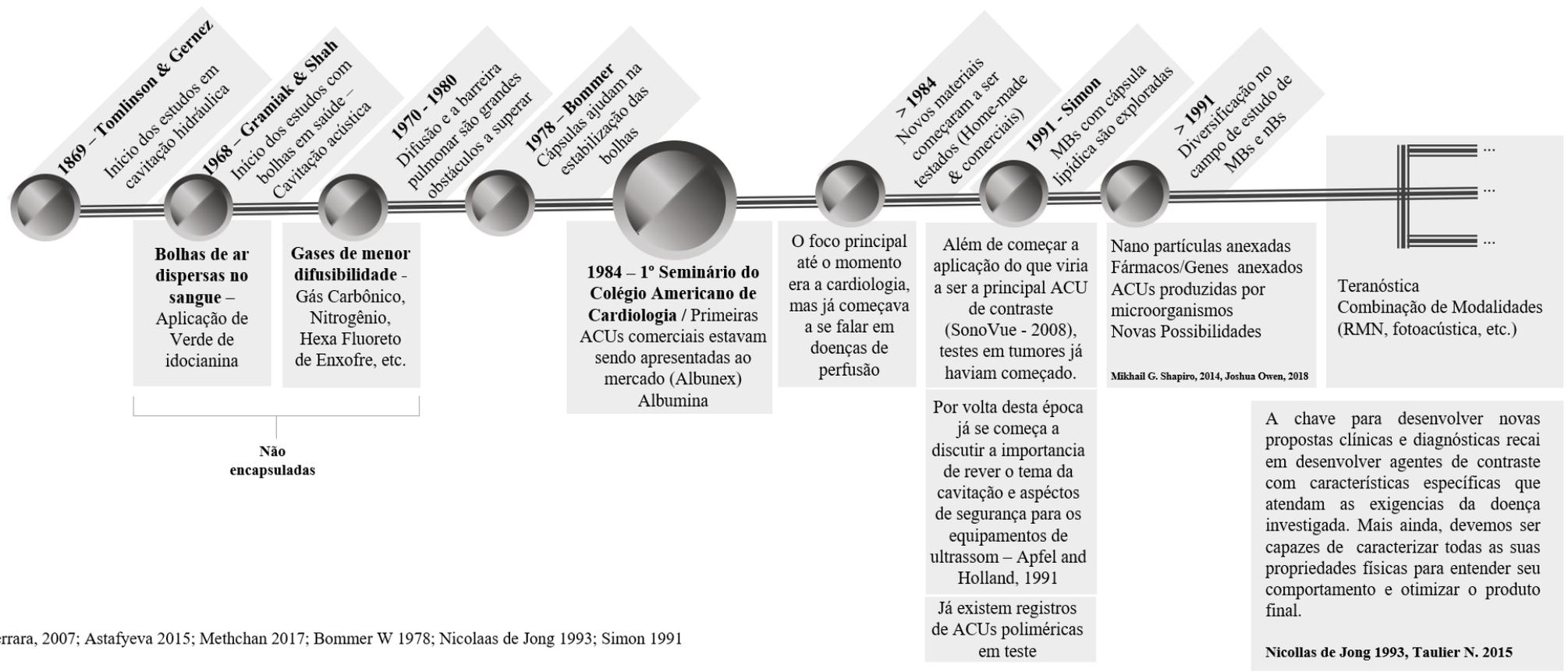
---

<sup>10</sup> Cabe ressaltar que o aumento da frequência eleva a resolução das imagens adquiridas, porém compromete a penetração do feixe de ultrassom, limitando-se a regiões superficiais como as camadas epiteliais.

utilizadas em ultrassonografia, no alcance de 1MHz a 45MHz (JABLONOWSKI et al., 2016), podendo chegar a 60MHz quando o objetivo é avaliar nBs.

Outros grupos buscam desenvolver cápsulas modificadas, como por exemplo, contendo nano partículas de óxidos de ferro, permitindo que as ACUs sejam utilizadas em dois tipos de modalidades diagnósticas por imagens, ressonância magnética (RMN) e ultrassonografia (BRISMAR et al., 2012; SCIALLERO et al., 2016; YANG et al., 2015). Estes grupos perceberam que o aumento da concentração das nanopartículas de óxido de ferro eleva o contraste na modalidade RMN, mas diminui na ultrassonografia. Perceberam também que o efeito observado do aumento da estabilidade tanto das MBs quanto das nBs, elevando o tempo de permanência destas em circulação, foi atribuído à utilização de cápsulas poliméricas de PVA e não à colocação das nanopartículas. Ainda, os grupos alertam para a escolha da dose ideal para que se possa fazer um protocolo para as duas modalidades de imagem de forma equilibrada e que represente o menor risco de efeitos colaterais e citotoxicidade, propondo a concentrações de  $4 \cdot 10^5$  a  $4 \cdot 10^6$  ACUs·ml<sup>-1</sup> (SCIALLERO et al., 2016).

Um ponto importante e central aqui é que a chave para desenvolver novas propostas clínicas e diagnósticas recai em desenvolver agentes de contraste com características específicas que atendam às exigências da doença investigada. Mais ainda, devemos ser capazes de caracterizar todas as suas propriedades físicas para entender seu comportamento e otimizar o produto final (ASTAFYEVA et al., 2015b; NICOLAAS DE JONG, 1993). Este item foi, também, tema central do *The 24th European contrast Imaging, Rotherdan, Países Baixos*. A Figura 3 esquematiza a evolução das ACUs.



Ferrara, 2007; Astafyeva 2015; Methchan 2017; Bommer W 1978; Nicolaas de Jong 1993; Simon 1991

Figura 3: Cronologia da tecnologia relacionada as ACUs. O histórico do uso das bolhas na área médica data de 1968, com anos após os primeiros estudos em cavitação hidráulica. Desde então as ACUs sofreram diversas modificações estruturais, sempre com o objetivo de serem apresentadas como uma solução clínica para algum procedimento. Com um maior número de grupos de pesquisa na área, acompanhar essas modificações passa a ser desafiador, cabendo a escolha adequada para cada situação.

Até aqui foram apresentadas as principais variedades existentes. Sendo que algumas estão disponíveis para comercialização, enquanto outras estão em desenvolvimento. Dentre os ACUs disponíveis no mercado, a maioria é sintetizada com cápsulas de lipídio e fosfolipídios. Fato motivado principalmente pela aprovação de ACUs de segunda geração pela FDA/EUA, com papel bem definido em cardiologia, e com forte crescimento na área de doenças de perfusão (CHEN et al., 2018; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). A mais conhecida e utilizadas atualmente é a SonoVue® (Bracco Imaging, Itália), também conhecida pelo nome de Lumason® nos EUA, introduzida no mercado de cardiologia norte-americano em 2015 para uso em cardiologia e usos fora da cardiologia no Canadá, Europa e Ásia já desde o início dos anos 2000. A Definity® (Lantheus Medical Imaging) no mercado desde 2001, também utilizada para cardiologia e perfusão do ventrículo esquerdo é uma outra ACU bem difundida no mercado e bastante estudada (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). Dentre as ACUs poliméricas, encontrava-se a POINT Biomedical (EUA)<sup>11</sup>. A aprovação da FDA/EUA para agentes de contraste poliméricos não existe até hoje, o que representa uma barreira comercial ao desenvolvimento do produto (OWEN et al., 2018). Contudo, a falta de aprovação pela FDA/EUA não parece ser uma limitação para o uso dos ACUs fora dos EUA (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018).

Sabe-se que ACUs com cápsula de lipídio e fosfolipídios apresentam, em geral, maior eco de retorno que as poliméricas, ou seja, resultando em maior contraste de imagem. Porém, as poliméricas destacam-se por seu potencial químico flexível que as tornam ideais para sofrer alterações estruturais e de suas propriedades mecânicas, mais adequadas para transporte de fármacos do que as de lipídio e fosfolipídios, mais estáveis, uma vez que cápsulas poliméricas resistem mais à dissolução e à pressão acústica que as lipídicas ou proteicas, além de ter maior diferença de densidade que o ar e baixa solubilidade em água (PISANI et al., 2008; ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Mais uma vez, cabe lembrar que chave para desenvolver novas

---

<sup>11</sup> A empresa encontra-se com status de falência.

propostas clínicas e diagnósticas recai em desenvolver agentes de contraste com características específicas que atendam às exigências da doença investigada. Portanto, tanto poliméricas quanto fosfolipídicas tem seu papel.

A Tabela 1 exibe uma lista de ACUs comerciais e algumas de suas características (HYVELIN et al., 2013; KETTERLING; MAMOU, 2008).

Tabela 1: ACUs comerciais e algumas de suas características. Não estão listadas todas as ACUs comerciais existentes.

Características dos Agentes de Contraste					
Agente de Contraste	Fabricante	Cápsula	Gás no Núcleo	MBS/ml	Diâmetro médio (µm)
<b>Optison</b>	GE Healthcare	Albumina	C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	5-8 x 10 <sup>8</sup>	3,0 - 4,5
<b>Definity</b>	Lantheus Medical Imaging	Lipídio	C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	1,2 x 10 <sup>10</sup>	1,1 - 3,3
<b>Sonazoid</b>	GE Healthcare	Lipídio	C <sub>3</sub> F <sub>10</sub>	1,2 x 10 <sup>9</sup>	2,4 - 3,6
<b>SonoVue</b>	Bracco Suisse AS	Fosfolipídeo	SF <sub>6</sub>	5,0 x 10 <sup>8</sup>	1,8
<b>Targestar</b>	Targeson Inc	Fosfolipídeo	C <sub>4</sub> F <sub>10</sub>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	2,2
<b>POINT Biomedical*</b>	San Carlos	Polimérica	N <sub>2</sub>	-	0,56; 1,1; 3,4 **

\* Não consta na fonte original, inserida com base em outras fontes da literatura científica; a empresa veio a falência  
 \*\* existem 3 valores possíveis para este produto, referentes aos tipos P1, P2 e P3, respectivamente.

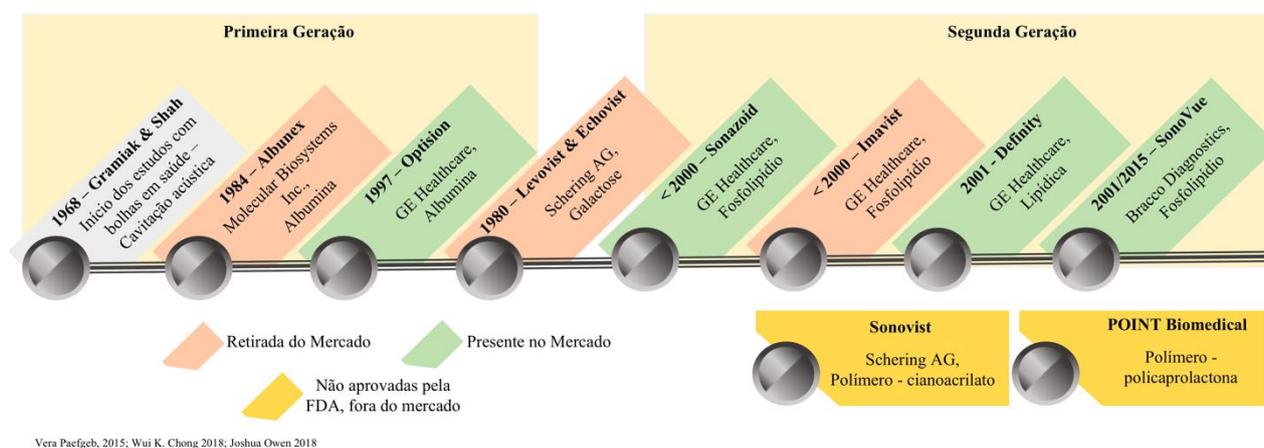


Figura 4: Linha do tempo do surgimento das principais ACUs comerciais.

Com mais de vinte anos no mercado, ACUs produziram 5% de relatos de náuseas, vômitos, dor de cabeça, alteração no paladar, vertigens, rubores e erupções. Reações de hipersensibilidade, na maioria das vezes provocada pelo gás, foi de 0,006%, com casos raros

de relatos mais graves como hipotensão, broncoespasmos, urticaria e prurido. Portanto, os efeitos colaterais presentes são menores e menos comuns que os causados por analgésicos e antibióticos e bem abaixo dos tradicionais agentes de contraste para outras modalidades de diagnóstico por imagem. Tão logo, segue como contraindicação pela FDA/EUA apenas em casos de histórico de alergias aos componentes do ACU (BARR, 2017; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). Dentre todos os pacientes, os mais indicados à CEUS, atualmente, são aqueles com problemas renais, que possuam alergia a ACs para tomografia ou ressonância nuclear magnética, que não tiveram uma conclusão após exames de tomografia ou ressonância nuclear magnética e quando é importante avaliar se a perfusão está presente, como após seções de radiofrequência (BARR, 2017). <http://www.contrastultrasound-modality.com>

A Tabela 2 exibe uma comparação entre as três principais categorias de ACUs.

Tabela 2: Comparação entre as três principais categorias de agentes de contraste, proteicas, lipídicas e poliméricas (FERRARA; POLLARD; BORDEN, 2007; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017).

<b>Proteína (Albumina)</b>	<b>(Fosfo)lipídeos</b>	<b>Polímeros</b>
-	Um dos mais fáceis de produzir	Produção requer atenção
-	Complicada modificação estrutural	Fácil modificação estrutural
Baixa estabilidade	Baixa estabilidade	Elevada estabilidade
Reduzida ecogenicidade	Bastante ecogênicos	Menor ecogenicidade que lipídeos
Reduzida produção de harmônicos	Elevada produção de harmônicos	Reduzida produção de harmônicos
Reduzida produção de subarmônicos	Elevada produção de subarmônicos	Reduzida produção de subarmônicos
-	Rompem em bolhas menores	Quebram em pedaços menores
Podem incorporar ligantes superficiais	Podem incorporar ligantes superficiais	Podem incorporar ligantes superficiais
Podem transportar material genético	Precárias para drug delivery	Ideais para drug delivery
Provável indução de resposta imune	Podem induzir resposta imunológica	Podem induzir resposta imunológica
Reabsorvidas/eliminadas pelo organismo	Reabsorvidas/eliminadas pelo organismo	Eliminada pelo organismo

### 3.5 POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)

A poli( $\epsilon$ -caprolactona) ou simplesmente policaprolactona (PCL) é um polímero alifático poliéster, hidrofóbico, não solúvel no corpo humano, semicristalino, biodegradável em condições ambientais naturais, aprovado pela FDA/EUA para uso em humanos, com aplicações biomédicas, que apresenta ponto de fusão (59-64°C) e temperatura de transição vítrea baixos (-60°C)<sup>12</sup> (SAGANUWAN, 2018; WOODWARD et al., 1985). Em temperatura ambiente, possui características semelhantes a borrachas, elastomérico, com baixa resistência a tração e baixo módulo de elasticidade, o que é atípico para um poliéster (ENGELBERG; KOHN, 1991a). A degradação deste polímero, em condições fisiológicas, não ocorre por vias enzimáticas, portanto não ocorre a sua biodegradação nestas condições, mas sim a degradação por hidrólise em suas ligações ésteres e a completa reabsorção após a redução da massa molecular para menos de 3.000g·mol<sup>-1</sup>, o que favorece seu uso como biopolímero de degradação lenta<sup>13</sup> (GUERRA; CIURANA, 2018; LEMOINE et al., 1996; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). O trabalho de Bahareh Azimi *et al.* coloca que a hidrólise da PCL é favorecida nas temperaturas de 40°C (BAHAREH AZIMI et al., 2014). *In vivo*, a degradação pode variar de 1 a 4 anos<sup>14</sup> e para a PCL de, em média, peso molecular de 50.000g/mol, a degradação completa do polímero é de cerca de três anos (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003), ainda, possui elevada capacidade de carrear fármacos, dois fatores que despertam o interesse da indústria, da farmacêutica e principalmente para estudos oncológicos (MIDDLETON; TIPTON, 2000; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). A PCL tem baixa resistência à tração (~23 MPa), mas elevado alongamento na ruptura (4700%), que faz desta um excelente biomaterial elástico (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Por estas características, a PCL é, até o momento, um polímero requisitado para engenharia tecidual (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Em outros trabalhos, o módulo de tensão ou

---

<sup>12</sup> Os valores de temperatura de fusão e temperatura de transição vítrea variam de acordo com a massa molecular do polímero, que em geral varia de 3.000 a 80.000g/mol em seus usos mais comuns.

<sup>13</sup> A velocidade de degradação pode ser regulada pela copolimerização da PCL com outros polímeros como os poli-ácido-lácticos e os poli glicosídeos.

<sup>14</sup> D. Lemoine *et al.* concluiu que as nanopartículas de PCL por eles sintetizadas tinham um decaimento anual da massa molar de 35,5% (LEMOINE et al., 1996).

flexão é apresentado com o valor de 0,4GPa e o alongamento na ruptura de 300 a 500%<sup>15</sup> (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003; MIDDLETON; TIPTON, 2000). Esta característica elastomérica da PCL é importante para proporcionar maior estabilidade e ecogenicidade das ACUs (F. DOMENICI et al., 2019)<sup>16</sup> Embora o uso da PCL como agente carreador de fármacos para *drug-delivery* seja bastante explorado, seu uso como agente de contraste para ultrassom, ainda se encontra em desenvolvimento e pouco explorado (ENGELBERG; KOHN, 1991b; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017; SAGANUWAN, 2018). A Figura 5 apresenta a estrutura física da policaprolactona comercial.



Figura 5: Apresentação física da PCL. A PCL quando comprada vem em forma de grânulos brancos translúcidos como mostrado na figura.

A Figura 6 apresenta a estrutura em bastão do mero da policaprolactona.

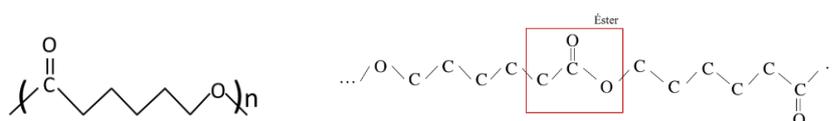


Figura 6: Representação em bastão da estrutura do mero da policaprolactona e ao lado uma parte da cadeia polimérica construída pela ligação éster entre os meros.

De fato, a literatura científica mostra que a PCL é versátil e, com os processos de copolimerização, permite modificações em sua estrutura, levando a alterações físico-químicas e de

<sup>15</sup> Valores precisos de propriedades mecânicas dependem da massa molecular do polímero, temperatura de teste, estado/disposição das cadeias poliméricas, e até da morfologia da estrutura estudada.

<sup>16</sup> O trabalho em questão utilizava o polímero PVA, mas a afirmação não é exclusiva ao tipo do polímero, mas sim a característica elastomérica.

suas propriedades mecânicas. Por consequência, essas alterações afetam suas características de solubilidade, propriedades iônicas, padrões e tempo de degradação, entre outras. Com isso, aspectos mais robustos serão também afetados, como tempo de circulação, avidéz e tempo de acúmulo no tecido alvo, ativar ou não a resposta imune, ser mais ou menos responsivo às interações com a onda de ultrassom, entre outros (IQBAL et al., 2015; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017).

Todos estes conjuntos de fatores levaram a escolha da PCL como a componente base das microcápsulas.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1 ULTRASSOM

Ondas acústicas são perturbações mecânicas que se propagam por compressão e rarefação, através de um meio capaz de reagir elasticamente e transmitir a energia vibratória emitida<sup>17</sup>. Quando a frequência desta onda é superior a 20kHz, ela recebe o nome de ultrassom (ALAIN DURAND; JEAN-MARIE ESCANYE, 2013; FISH, 1990).

### VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO

A velocidade de propagação da onda ( $c$ ) depende do comprimento de onda ( $\lambda$ ) e da frequência desta ( $\nu$ ), dada pela Equação 1.

$$c = \lambda \nu \quad \text{Equação 1}$$

É importante ressaltar que a velocidade de propagação do ultrassom depende de meio em que este atravessa, sendo um valor fixo para um mesmo meio, de acordo com a EQUAÇÃO 2

$$c = \sqrt{\frac{K_s}{\rho}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $K_s$  é o coeficiente de rigidez e  $\rho$  é a densidade do meio. Portanto, quanto mais rígido<sup>18</sup> e menos denso<sup>19</sup> for o meio, mais rapidamente as ondas se propagam.

### IMPEDÂNCIA ACÚSTICA

Impedância acústica ( $Z$ ) é definida como a razão entre a variação de pressão e a velocidade da partícula no meio.

---

<sup>17</sup> Portanto uma onda mecânica, diferentemente de uma eletromagnética, não se propaga no vácuo.

<sup>18</sup> A velocidade de transmissão aumenta à medida que a força de atração entre as partículas aumenta.

<sup>19</sup> A velocidade de transmissão diminui à medida que a massa das partículas aumenta.

$$Z = \frac{P_0}{U_0} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo  $P_0$  o excesso de pressão e  $U_0$  a velocidade da partícula. Usualmente a impedância é calculada para ondas planas como:

$$Z = \rho c = \sqrt{\frac{\rho}{k}} \quad \text{Equação 4}$$

em que  $k$  é a compressibilidade do meio, correspondendo ao inverso do coeficiente de rigidez  $K_s$  (FISH, 1990). A unidade padrão da impedância é dada em rayls.

Esta propriedade física guarda importância fundamental nas escolhas dos materiais, pois as diferenças de impedância entre o meio e o material estão associadas à reflexão e espalhamento do feixe de ultrassom.

## **REFLEXÃO**

A reflexão e refração são fenômenos importantes, principalmente quando se utiliza o ultrassom Modo-B, pois por se assumir sempre que o feixe é emitido e recebido pelo transdutor perpendicularmente ao tecido, geram-se artefatos de imagens que podem prejudicar a análise da imagem (FISH, 1990). Por outro lado, artefatos de imagem podem ser utilizados como meios de identificar padrões de anormalidade nos tecidos, servindo de indicativo da existência de alterações estruturais ou de alterações de composição na região investigada.

Ainda, o aumento da reflexão pode ser induzido no tecido pela administração de contrastes, favorecendo diagnósticos que necessitem do aumento de contraste em uma determinada região para destacar o tecido alvo. Isto funciona, pois, a taxa de reflexão ( $R$ ) em um meio segue a seguinte equação:

$$R = \frac{(Z_2 - Z_1)^2}{(Z_1 + Z_2)^2} \quad \text{Equação 5}$$

em que  $Z_1$  e  $Z_2$  correspondem a impedância do meio um e do meio dois, respectivamente (FISH, 1990).

Com isso, um agente de contraste composto de um núcleo gasoso como, por exemplo o ar ( $Z_1 = 400$  rayls) em um meio líquido como o sangue ( $Z_2 = 1,59$  Mrayls), produziria uma reflexão de aproximadamente 99,9% (METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Ou seja, praticamente toda a onda de ultrassom incidente na partícula seria refletida de volta ao emissor, produzindo ecos de retorno de maior amplitude quando comparado sem os ACUs. A Figura 7 ilustra este processo.

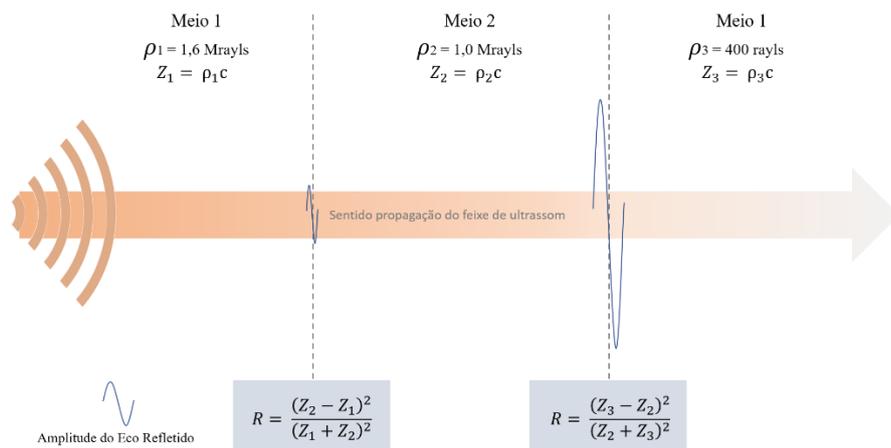


Figura 7: Reflexão da onda de ultrassom incidente ao trocar de meio com impedâncias diferentes. A reflexão é maior quando a diferença de impedância também é maior entre os meios.

No entanto, é válido lembrar que, embora a reflexão seja quase que integral, existem diversas variáveis que influenciam na amplitude do eco de retorno. Por exemplo, o tamanho reduzido da partícula em relação ao comprimento da onda de ultrassom incidente faz com que o principal

fenômeno presente seja o espalhamento e não propriamente a reflexão<sup>20</sup>, com isso, a onda mecânica não será integralmente redirecionada à face do transdutor. Outros fenômenos, também podem interferir no eco de retorno, como a atenuação sofrida pelo feixe de ultrassom.

## ESPALHAMENTO

Por vezes, o espalhamento é abordado como um tópico dentro do fenômeno de atenuação, isso porque a atenuação é classicamente definida pela soma dos componentes absorção e espalhamento. Brevemente, a absorção ocorre quando a energia no feixe do ultrassom é convertida em calor e o espalhamento quando as partículas do meio são da ordem de grandeza do comprimento de onda incidente, desviando parte da frente de onda para todas as direções. Em suma, a atenuação caracteriza-se pela redução na amplitude do eco da onda de ultrassom que retorna a face do transdutor durante a passagem por um meio, sendo que cada material atenua as ondas de formas diferentes e em graus variados de maneira a crescer proporcionalmente com a frequência aplicada (FISH, 1990). A Figura 8 ilustra este processo.

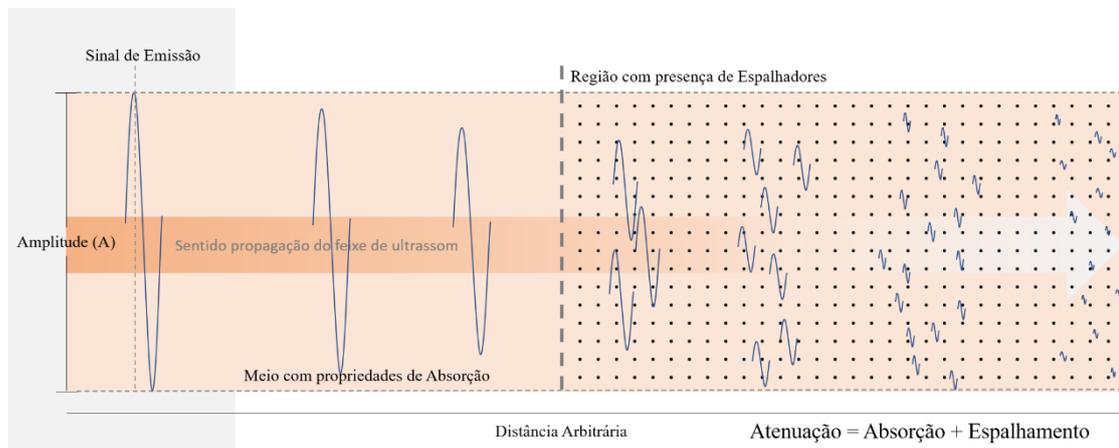


Figura 8: Esquema da atenuação de uma onda de ultrassom em um meio. A primeira parte do meio não possui material espalhador, possuindo apenas propriedades absorptivas. A segunda parte do material possui material espalhador, atuando sobre a onda tanto o espalhamento quanto a absorção. A intensidade do sinal é representada pela amplitude da onda em azul.

<sup>20</sup> O tamanho reduzido, embora seja um fator limitante para a reflexão, é importante para o desenvolvimento do agente de contraste; com benefícios que serão descritos mais a diante nesta tese.

Aqui, no entanto, o espalhamento é o foco, pois quanto maior for a concentração de materiais espalhadores (ACUs) em uma região, maior poderá<sup>21</sup> ser o retorno acústico da região, retroespalhamento (*backscatter*). Assim, com a presença das ACU, os ecos locais de uma dada região retornam em padrões diferentes do momento em que estes estavam ausentes, elevando o contraste local<sup>22</sup>. (FERRARA; POLLARD; BORDEN, 2007; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Ainda, é o espalhamento um dos responsáveis pelo aspecto granulado (*speckle*) em imagens modo-B (FISH, 1990).

Espalhamento, com um pouco mais de detalhe, mas ainda de forma simplificada, é o redirecionamento da onda mecânica de comprimento de onda menor ou igual as dimensões da partícula em que esta incide, em diversas direções. Por conseguinte, ondas de frequência mais elevadas se espalham mais que as de frequência menores, limitando o uso de altas frequências em tecidos mais profundos (FISH, 1990; HAIM AZHARI, 2010). Porém, não se deve estudar apenas o espalhamento apenas do ponto de vista da interação de uma onda mecânica com uma única partícula, considerando-se somente a seção transversal de espalhamento da partícula e ignorando o meio em que está inserida. Pois, quando o espalhamento é estudado, segundo este modelo simplificado, limita-se o entendimento de como ACUs podem produzir espalhamento.

Por exemplo, ACUs, possuem diâmetros na ordem de 0,01mm, enquanto o comprimento de uma onda de ultrassom de 1,0 a 10,0MHz, em água, ocorre na ordem de 1,5 a 0,1mm. Portanto, concluir-se-ia que ACUs possuem capacidade limitada de espalhar o ultrassom, bem diferentemente do que se sabe sobre elas (Figura 9).

---

<sup>21</sup> Isto porque o retroespalhamento, como será abordado ainda neste documento, depende de fatores como a concentração das partículas que promovem o espalhamento da onda de ultrassom (Seção Transversal e/ou coeficiente de retroespalhamento), o tamanho destas, a forma, a densidade da partícula e do meio, e como já dito, a atenuação da onda de ultrassom ao longo do trajeto (HAIM AZHARI, 2010; HASEGAWA et al., 1993).

<sup>22</sup> O retroespalhamento é uma das formas de elevar o contraste com uso de ACUs com base no princípio do espalhamento e impedância acústica. Mais adiante será visto como isso pode ser feito com base no princípio da cavitação acústica.

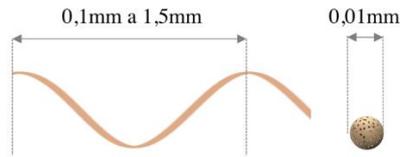


Figura 9: Representação do comprimento de onda em relação ao tamanho da ACU.

ACUs, quando em suspensão, encontram-se em concentrações de  $10^6$  a  $10^9$  partículas por mililitros, com isso, quando estas partículas interagem com o ultrassom, ocorre um tipo especial de espalhamento chamado de espalhamento do tipo Rayleigh (LARS HOFF, 2001). Neste fenômeno, a onda de ultrassom é desviada em todas as direções de forma uniforme e, como existem diversas outras partículas ao redor produzindo efeitos similares, essas ondas interagem entre si, provocando interferências construtivas e destrutivas. A intensidade de cada eco espalhado é também dependente da densidade do meio e das próprias partículas, o que resultará em padrões diferenciados de interações entre as ondas. Por consequência, o resultado final captado pelo transdutor durante o modo receptor do eco é o resultado destas interações no meio em conjunto com a atenuação sofrida ao longo do percurso da onda (ANDREW G. SEMENOV, 2012; SHRIKI, 2014; STRIDE; SAFFARI, 2005). Assim, não mais se considera a seção transversal de retroespalhamento de uma única partícula, mas sim o coeficiente de retroespalhamento de um conjunto de partículas em um determinado volume. A Figura 10 e Figura 11 ilustram este fenômeno.

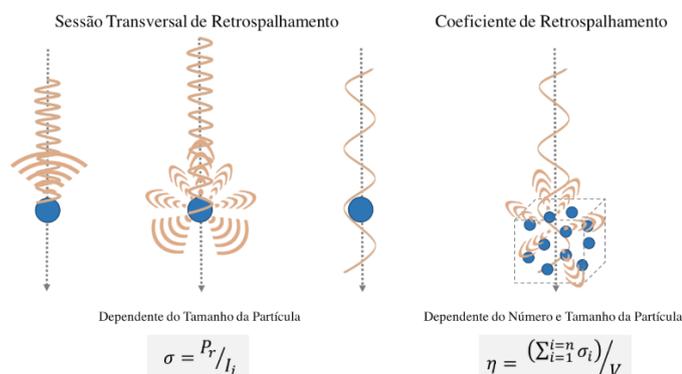


Figura 10: Espalhamento do ultrassom diante de partículas. Comportamento teórico do espalhamento para uma única partícula (Esquerda) e o comportamento teórico do espalhamento diante de partículas

dispersas em um volume (Direita).  $\sigma$  está em função do tamanho das partículas e  $\eta$  está em função do número de partículas e da distribuição do tamanho destas.  $P_r$  - Potência retroespalhada,  $I_i$  – Intensidade incidente,  $V$  – Volume.

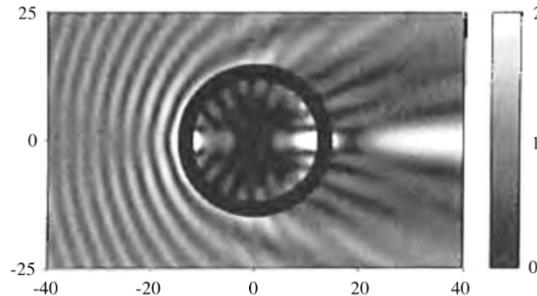


Figura 11: Imagem extraída de um artigo mostrando o comportamento de uma onda de comprimento de onda inferior ao diâmetro de um casca cilíndrica interagindo (HASEGAWA et al., 1993).

A estas interferências coerentes provocadas pelo somatório de duas ou mais ondas de um sinal espalhados e em fase, dá-se o nome, em ultrassonografia, de *speckle*, que por vezes é classificado como ruído de sinal ou como atributo de imagem em exames clínicos, sendo importante para identificar um tecido normal e até mesmo anormalidades. Portanto, alvo de estudos durante anos (DANTAS; COSTA; LEEMAN, 2005; LIZZI et al., 1987; SHRIKI, 2014) (Figura 12). Não obstante, o fenômeno é também responsável por mascarar diagnósticos, esconder limites entre tecidos e introduzir falsas estrutura na imagem, necessitando de pesquisas que contribuam para a redução destes efeitos ou a distinção destes, sendo uma alternativa, as técnicas que envolvem ACUs que podem solucionar essas limitações (DANTAS; COSTA; LEEMAN, 2005).

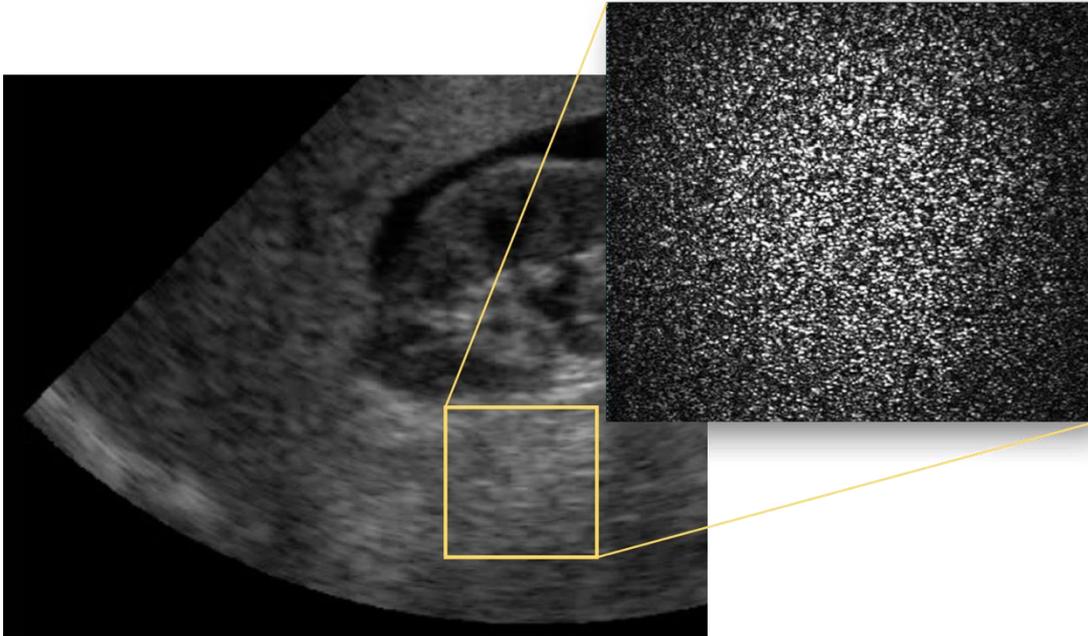


Figura 12: Speckle, ou interferências coerentes, comuns em imagens ultrassonográficas e originárias do fenômeno de espalhamento e interferência entre ondas no meio de propagação.

Uma outra forma de melhorar as imagens de ultrassonografia, sem utilizar ACUs é elevando a frequência de análise, contudo, como dito anteriormente, existe um fator inconveniente ao se realizar este procedimento. Pois, perde-se profundidade devido ao espalhamento, ao mesmo tempo em que se ganha em resolução, que é a capacidade de distinguir entre dois objetos pontuais próximos um do outro, sendo este dividido em resolução axial e lateral (FISH, 1990). Com isso, cabe ao clínico ou pesquisador, escolher a melhor frequência, os transdutores, parâmetros, modos e técnicas com a qual ele vai trabalhar (DESAILLY et al., 2016; SHRIKI, 2014) (Figura 13). Ainda em relação à frequência, ACUs são capazes de gerar harmônicos de suas frequências de excitação, assim sendo, quanto maior a frequência utilizada, menor são as chances de captar esses harmônicos que possuem sempre uma frequência múltipla da principal. Por outro lado, os harmônicos são frequências que fazem apenas o caminho de retorno ao transdutor, não sofrendo atenuação de ida.

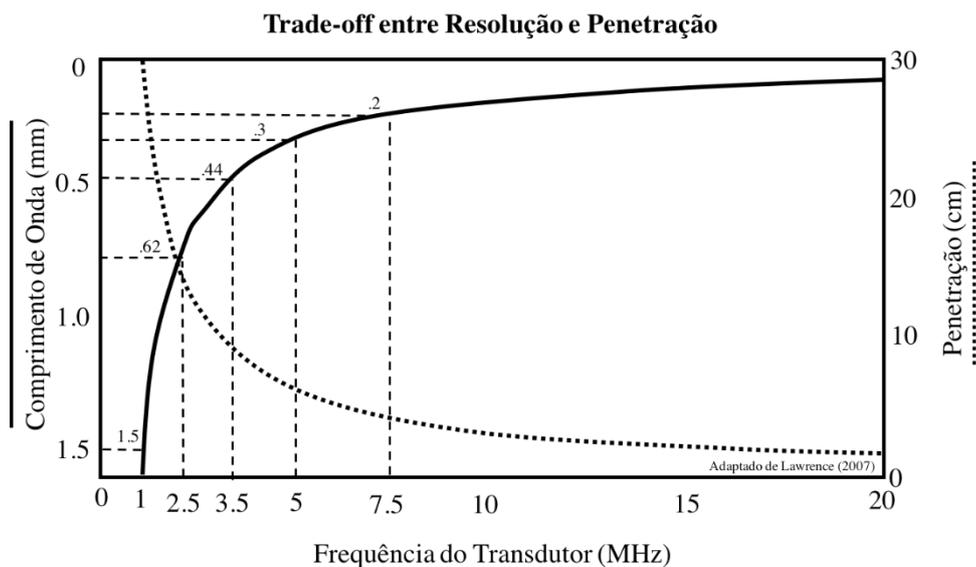


Figura 13: Trade-off entre resolução e penetração. Quanto maior a resolução buscada com o aumento de frequência menor a profundidade alcançada.

## 4.2 ULTRASSONOGRAFIA

A ultrassonografia é uma modalidade diagnóstica destinada à identificação de padrões de respostas acústicas de determinadas regiões do corpo humano, buscando reconhecer anormalidades anatômicas de acordo com as alterações dos padrões de textura, ecogenicidade, contornos, tamanhos, entre outras características. Dentre as modalidades diagnósticas, a ultrassonografia é considerada barata, não invasiva, portátil, passível de aplicação em tempo real, fácil de focalizar, permite tratamentos personalizados, de reduzidos efeitos colaterais, de baixo risco e que utiliza uma fonte de radiação não ionizante (DIZEUX et al., 2016; FANG YANG et al., 2008; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017).

A base desta modalidade consiste em obter o sinal retroespalhado do ultrassom emitido, em que cada elemento piezoelétrico<sup>23</sup> é eletricamente excitado pelo ultrassonógrafo em intervalos de tempo pré-estabelecidos e registram a intensidade de retorno dos ecos em função

<sup>23</sup> O material piezoelétrico, geralmente feito de titanato zirconato de chumbo, que carece de centros de simetria estrutural (anisotrópico), guardando a propriedade de poder receber uma aplicação de um campo elétrico que causa uma deformação estrutural no material, provocando vibrações mecânicas proporcionais a intensidade do campo elétrico e vice-versa (PETER NEIL TEMPLE WELLS, 1977).

deste tempo, para cada elemento piezoelétrico. Assim, cada eco de cada elemento é posicionado de acordo com o tempo entre sua emissão e retorno, para estes cálculos, assume-se em geral, a velocidade de propagação<sup>24</sup> de  $1540 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figura 14).

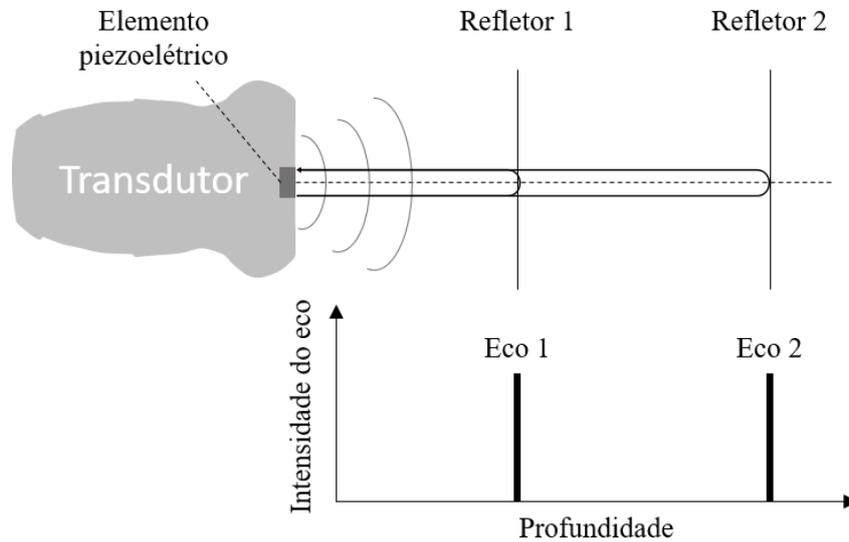


Figura 14: Esquema de sinais dos ecos de retorno após interação de um único disparo com refletores em um meio sem atenuação. Um único elemento piezoelétrico do transdutor é retratado neste esquema, o que torna este esquema semelhante ao que ocorre no ultrassom modo-A. Ao emitir o sinal mecânico, a onda de ultrassom se propaga em um meio homogêneo com uma velocidade constante, assim, com base no intervalo de tempo entre a emissão do sinal e a recepção do eco é possível calcular a profundidade de um elemento refletor. Cabe lembrar que o ultrassom Modo-B possui as mesmas bases físicas do modo-A, porém é realizado em *Array*, possibilitando, após o processamento dos sinais de todos os elementos, a formação de imagens ultrassonográficas.

Com o sinal obtido e processado para cada elemento piezoelétrico, o valor da intensidade do eco é convertido em uma escala de cinza com até 256 tons de cinza (0 a 255) em uma matriz, formando a imagem de ultrassom. Quanto maior a amplitude, mais próximo ao valor máximo da escala de cinza este será representado. Este processo é conhecido como ultrassonografia modo-B (FISH, 1990; HAIM AZHARI, 2010; LARS HOFF, 2001) (Figura 15).

<sup>24</sup> A velocidade de propagação que o ultrassonógrafo utiliza para realizar as contas de posição do eco é dada de acordo com o fabricante, mas em geral, é a velocidade de propagação do ultrassom em tecidos moles. Esta velocidade pode ser ajustada em equipamentos mais recentes.

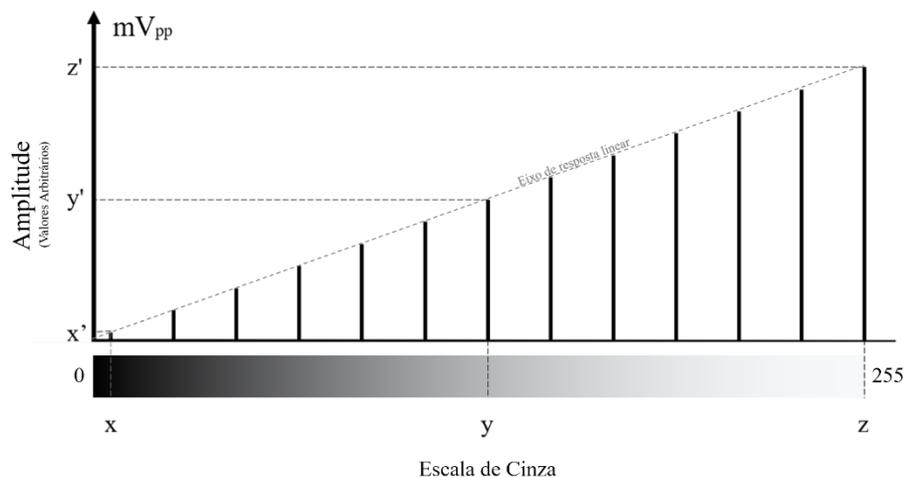


Figura 15: Esquema da percepção da amplitude do eco de retorno e sua correspondência com o valor na escala de cinza. Ao interagir com um elemento refletor, o sinal emitido retorna com uma amplitude e intensidade determinadas e interage com o elemento piezoelétrico que o converte em um sinal elétrico correspondente. O valor da amplitude do sinal recebido corresponderá a uma cor na escala de cinza entre 0 e 255, sendo zero o valor do preto e 255 o valor do branco. Sinais de amplitudes menores ( $x'$ ) recebem uma tonalidade de cinza mais perto do preto e quanto maior a amplitude do sinal ( $z'$ ), recebem mais perto do branco.

Este processo é realizado para todos os elementos piezoelétricos do transdutor do equipamento, que são dispostos em *Arreys*. Assim, é possível formar uma sequência de sinais convertidos em escala de cinza e dispostos lado a lado, formando uma imagem proporcional aos padrões das respostas dos ecos obtidos. A isso, é dado o nome de imagem ultrassonográfica. A Figura 16 ilustra este processo, bem como mostra algumas limitações da técnica que serão levantadas logo à frente.

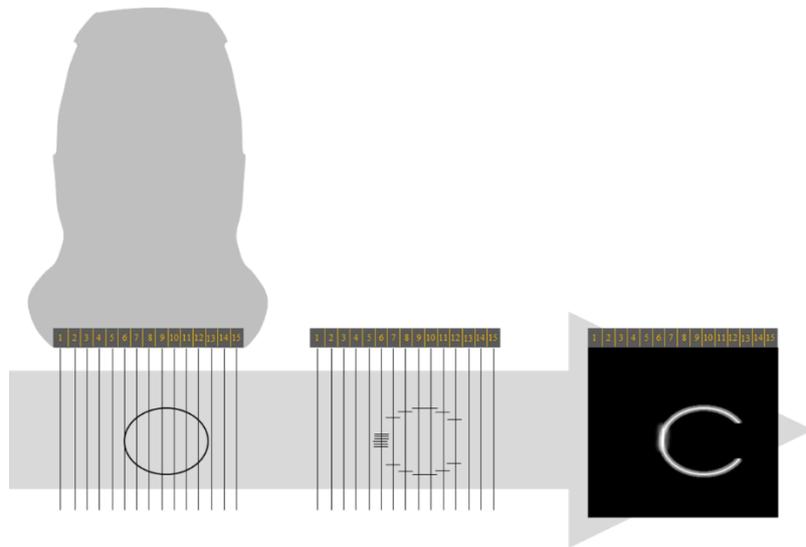


Figura 16: Representação do modo-B. O modo-B guarda semelhanças ao modo-A, mas disposto em *Arrey*, para formar uma imagem. Nesta representação, foram dispostos 15 elementos piezoelétricos em sequência, cada elemento funciona como descrito nas duas figuras anteriores. Ao serem colocados em *Arrey*, a imagem ganha forma. Contudo, pode-se observar que a técnica possui alguns limites de resolução.

As imagens da Figura 17 são imagens ultrassonográficas de um coração e são usadas aqui como forma de ilustrar, procurando levar ao extremo, as limitações de contraste e resolução, bem como mostrar a formação da imagem modo-B em linhas de corte bem definidas e espaçadas (imagem da esquerda). Embora real, a imagem da esquerda trata-se de um dos primeiros registros feitos com na história da ultrassonografia por Douglass Howry em 1951. Mesmo assim, hoje, apesar de todos os benefícios e avanços da ultrassonografia (direita), esta é uma técnica que ainda apresenta limitações como baixa resolução, e reduzida capacidade de distinguir limites entre dois tecidos moles. Isto ocorre pela baixa diferença de impedância entre os tecidos<sup>25</sup>, o que diminui a intensidade do eco que retorna ao transdutor após a interação do ultrassom com os mesmos (FISH, 1990; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Neste ponto, é que as ACUs, com uma elevada diferença de impedância com os tecidos moles, possuem um papel fundamental: o de elevar a reflexão da região e conseqüentemente elevar o contraste local.

<sup>25</sup> Os tecidos moles são constituídos basicamente de água, o que resulta em uma impedância acústica muito próxima entre eles, reduzindo a diferença de impedância entre um e outro. Impedância acústica da água: 1,5 MRayls, impedância acústica média dos tecidos moles: 1,58 MRayls (METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017).

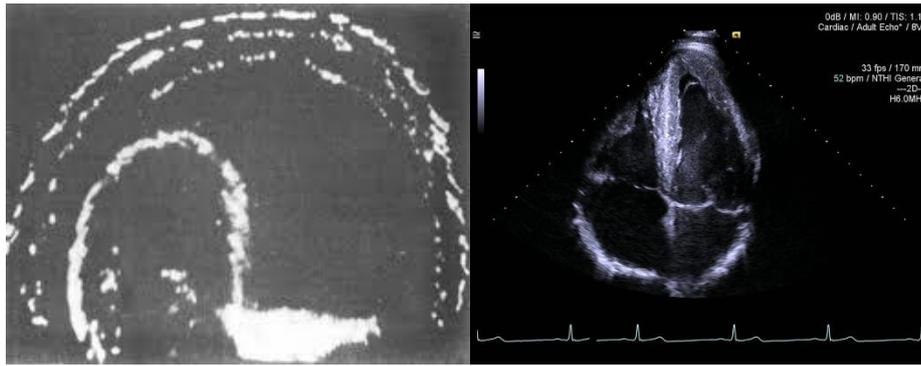


Figura 17: A evolução da tecnologia de ultrassonografia. Na imagem da esquerda é possível notar a formação das linhas de imagem com pouca resolução e distinção entre elementos na imagem. A imagem da direita apresenta uma categoria de aparelhos mais recente, que possibilitam a distinção entre estruturas e resolução melhorada.

#### 4.4 FREQUÊNCIA E PERÍODO DE REPETIÇÃO DE PULSO – PRF E PRP

O ultrassom não pode ser descrito, na prática, como uma única onda emitida que fará todo o trabalho desejado, seja este mapear o local ou induzir efeitos mecânicos ou térmicos. Portanto, o ultrassom é melhor representado por uma coleção de pulsos, ou trem de pulsos, de ondas mecânicas senoidais de intervalos constantes e parâmetros idênticos, sendo cada pulso repetições um do outro separados no tempo. Portanto, temos o conceito de Frequência de Repetição de Pulso (PRF), que significa o número de vezes que o pulso será emitido no intervalo de um segundo, sendo exibido em Hz. Reciprocamente, temos o conceito de Período de Repetição de Pulso (PRP), que mostra o intervalo de tempo em segundos entre a emissão de um pulso e o seguinte. O PRP é dado pelo inverso do PRF (FISH, 1990; HAIM AZHARI, 2010).

Comumente ocorre uma confusão entre a PRF e a frequência a ser utilizada no transdutor, mas os dois são conceitos isolados, a frequência de excitação do transdutor, também na unidade de Hz, servirá como um parâmetro para a formação da onda mecânica, ou seja, quantas oscilações por segundo a onda fará. Enquanto a PRF será a frequência, número de vezes, com que esta onda será disparada no meio em um segundo (Figura 18).

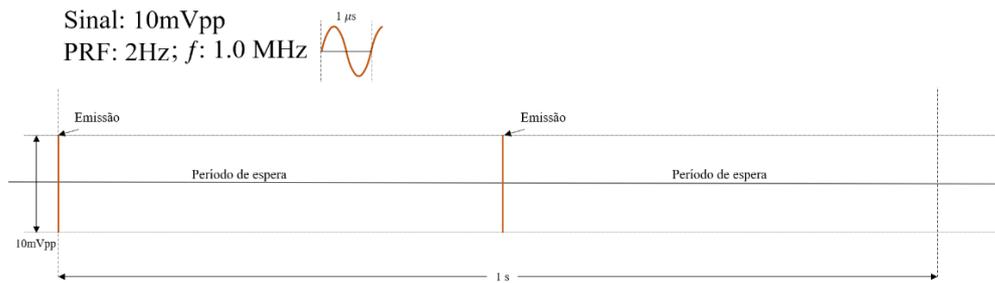


Figura 18: Frequência de Repetição de Pulso, PRF. Corresponde a frequência de disparos de um sinal de ultrassom em um determinado meio. Neste exemplo, o sinal de PRF de 2Hz é emitido no meio duas vezes no intervalo de 1 segundo. Perceba que esta frequência independe do sinal de excitação que é de 1MHz.

#### 4.5 CICLO DE TRABALHO – *DUTY CYCLE*

Visto o conceito de PRF, cabe elucidar então o que é Ciclo de Trabalho, do termo em inglês e mais comum de ser empregado, *Duty Cycle* (DC). O DC representa o percentual de tempo que o sinal permanece ativo, sendo expresso como uma porcentagem do período. Portanto, a cada novo pulso, o sinal permanecerá ativo por um determinado tempo entre um pulso e outro. Este fator está diretamente ligado ao número de ciclos (*N-cycles*) com o qual o sinal será construído e, também, com os efeitos térmicos do ultrassom. Em geral, equipamentos de ultrassonografia utilizam PFR e DC baixais, visando entregar pouca energia ao tecido e evitar a influência de ondas espúrias enquanto capturam e processam os sinais de retorno no modo pulso-eco. Assim, no modo pulso-eco, a cerâmica piezoelétrica, utilizada para gerar o sinal ficará ativa por este período determinado, e então, funcionará como um receptor durante todo o restante do tempo (Figura 19).

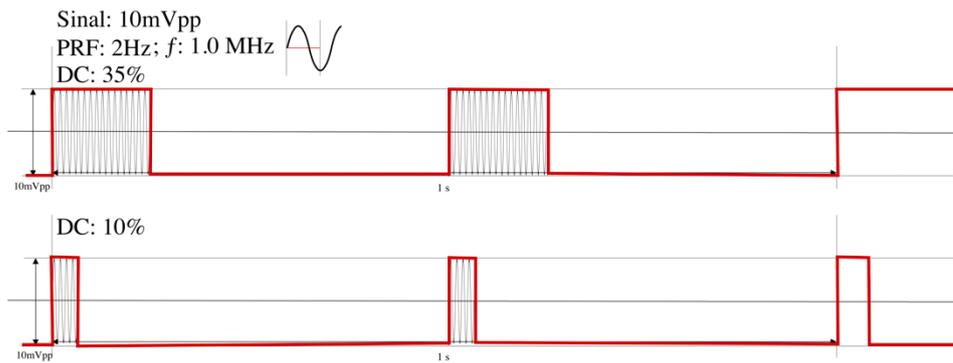


Figura 19: Ciclo de Trabalho, *Duty Cycle*. Aproveitando o conceito de PRF, o DC acrescenta o tempo em que o sinal permanece ativo no meio, sendo calculado como um percentual do tempo total em que o sinal é emitido no intervalo de tempo.

DC mais elevadas são mais comuns em equipamentos terapêuticos, que demandam o aquecimento e, portanto, a entrega de maior energia ao tecido (STRIDE, 2009) (Figura 20).

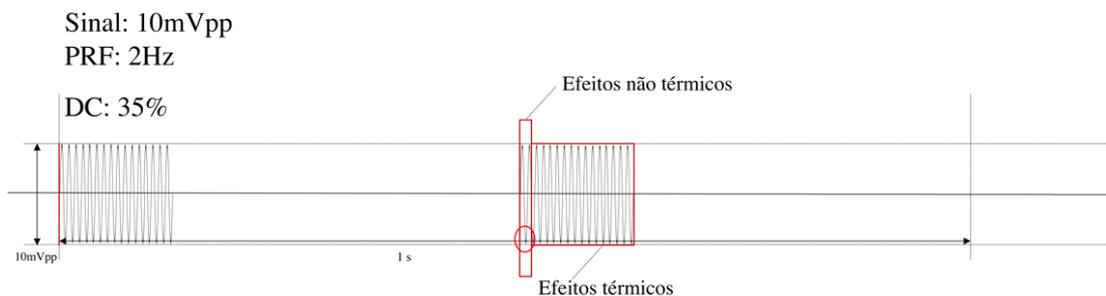


Figura 20: Relação do Ciclo de Trabalho com os efeitos térmicos e não térmicos. A porção inicial do sinal é associada aos efeitos não térmicos do ultrassom, enquanto a continuidade da vibração e entrega de energia associa-se aos efeitos térmicos. Por consequência, equipamentos terapêuticos buscam DC mais elevadas, enquanto equipamentos de imagem buscam por DC mais curtos.

## 4.6 CAVITAÇÃO

A história da cavitação na ciência data do meado dos anos de 1800, com o surgimento dos motores e turbinas de alto desempenho, capazes de rotacionar hélices de embarcações rápido o suficiente para que estas perdessem o contato com a água, causando danos as mesma pelo surgimento de bolhas que rapidamente se colapsavam liberando energia no que seria conhecido

como o fenômeno de cavitação (NICOLAAS DE JONG, 1993). A cavitação passou a ser mencionado em saúde em 1968 com o trabalho de Gramiak, que observou a presença de ecos provenientes de microbolhas na corrente sanguínea (NICOLAAS DE JONG, 1993). Contudo, existe uma grande diferença entre o fenômeno observado em 1800 e o de 1968, pois, embora ambas sejam processos de cavitação, esta pode ser dividida, apropriadamente, em duas principais categorias. A primeira, chamada de cavitação hidráulica, e brevemente apresentada acima, e a segunda, chamada de cavitação acústica. Esta segunda é a que mais interessa a este trabalho, e descreve o surgimento, crescimento e colapso de uma bolha de gás ou vapor em um líquido exposto a uma pressão dinâmica (HERBERT; BALIBAR; CAUPIN, 2006; NICOLAAS DE JONG, 1993). Aqui, um fluido em equilíbrio, ou seja, com pressão de equilíbrio e densidade uniformes, que se encontra com suas moléculas em movimento pela agitação térmica e movimento aleatório (Browniano), estão constantemente submetidas a frequentes colisões. Na presença de ondas sonoras, cada pequeno volume do líquido passa a ter às vibrações mecânicas longitudinais periódicas sobrepostas aos movimentos Brownianos. Cada pequeno elemento de volume se desloca, então, dando origem às variações de densidade do fluido e, portanto, à pressão. A variação da pressão a partir da pressão de equilíbrio é chamada de Pressão Acústica (ALAIN DURAND; JEAN-MARIE ESCANYE, 2013). Quando a pressão negativa local, juntamente a outros fatores físico é suficiente, o processo de cavitação acústica ocorre.

A pressão acústica é um dos principais fatores que afetam o comportamento das ACUs, podendo ser estável (Cavitação estável), quando uma ou mais bolhas oscilam linear e não-linearmente e radialmente num processo de elevada liberação de energia com expansão e contração por um determinado número de ciclos sem causar seu colapso, produzindo harmônicos e subarmônicos da frequência fundamental emitida (APFEL; HOLLAND, 1991). Ou transiente (Cavitação Inercial), quando uma ou mais bolhas oscilam linear e não-linearmente e radialmente num processo de maior liberação de energia que a cavitação estável, levando ao colapso violento das bolhas que resultam no aumento rápido e localizado da temperatura e do estresse, da formação de forças de cisalhamento, ondas de choque, turbulência, micro jatos, e a fragmentação da cápsula

da bolha (ASHOKKUMAR, 2011; INSERRA et al., 2014); em geral sob efeito de pressões acústicas superiores a 1,0Mpa quando a bolha já existe no meio (SHI et al., 2000) e entre 16,0 e 21,0Mpa quando esta não está presente no meio<sup>26</sup> (HERBERT; BALIBAR; CAUPIN, 2006), produzindo um espectro de banda larga contendo os harmônicos e subarmônicos da frequência fundamental emitida (APFEL; HOLLAND, 1991).

Mesmo sendo um dos principais fatores, ela somente, não é a única causa da cavitação, e fatores como a inércia, a viscosidade e a tensão superficial do meio são fatores que contribuem para este fenômeno. Quanto menos tempo disponível para o crescimento da bolha, menor as chances de cavitação. Sendo assim, Apfel & Holland propuseram em 1991 um índice que seria usado até os dias de hoje, o Índice Mecânico (I.M.), que leva em consideração a pressão acústica e a frequência da onda mecânica aplicada no meio. Este índice está diretamente ligado à estabilidade das ACUs e ao ponto de ruptura das mesmas e é utilizado como fator de segurança dos ultrassonógrafo, não sendo permitido exceder o valor de 1,9 nas clínicas de ultrassom (APFEL; HOLLAND, 1991; BARNETT et al., 2000; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). O valor de 1,9 foi proposto depois que se publicaram estudos sobre os efeitos do ultrassom no tecido biológico, um deles o de Andrew A. Brayman *et al.* 1996, mostrou que a hemólise era evidente acima do valor do I.M. de 2,0, independente da duração do pulso do ultrassom (BRAYMAN et al., 1996).

Este índice é obtido pela razão entre o valor do menor vale da curva de pressão da onda mecânica, em Mpa, pela raiz quadrada da frequência central do transdutor, em MHz. O pico de pressão negativa (PNP) representa o máximo de descompressão que ocorrerá sobre o meio, embora todo vale proporcione uma descompressão (AMMI et al., 2006). A Figura 21 ilustra a variação de pressão com o tempo e a Figura 22 mostra a variação volumétrica de uma microbolha sob ação do campo acústico. A Equação 6 mostra o cálculo do índice Mecânico.

---

<sup>26</sup> Quando a bolha ainda precisa ser formada no meio a partir dos gases dispersos/dissolvidos no meio. Cabe colocar que os valores são referentes a pressões negativas, como será melhor trabalhado mais a frente nesta tese.

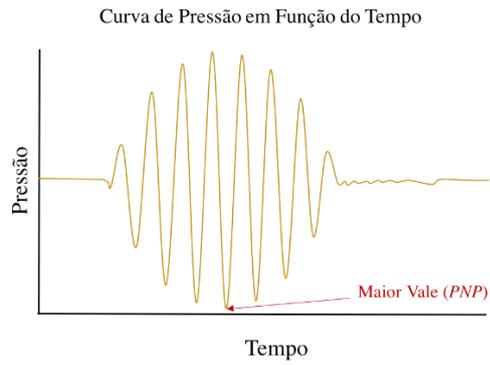


Figura 21 Curva ilustrativa da pressão em função do tempo. Observa-se o perfil da uma onda mecânica com um pico de pressão negativa demarcado (Maior Vale).

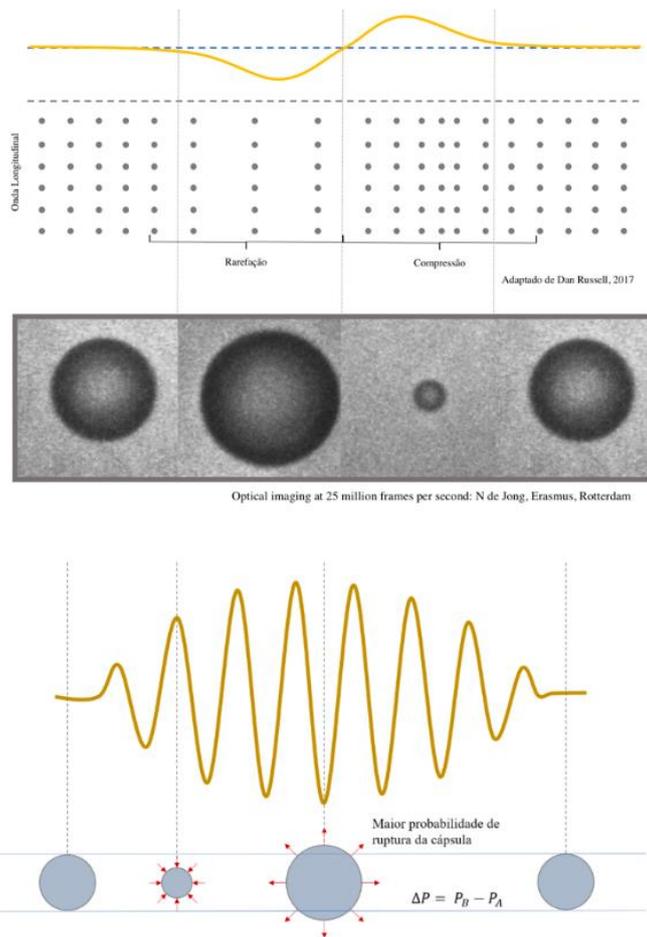


Figura 22: Esquema do comportamento de uma microbolha interagindo com uma onda de ultrassom. (STRIDE, 2009)

$$IM = \frac{PPN \text{ (MPa)}}{\sqrt{f} \text{ (MHz)}} \quad \text{Equação 6}$$

em que  $PPN$  é o valor do maior vale de pressão negativa em MPa e  $f$  o valor da frequência central de excitação do transdutor em MHz.

Com isso, é de se esperar que em frequências mais elevadas, fenômenos de cavitação sejam mais raros, pois exigem uma pressão acústica muito mais elevada. Por exemplo, para ultrapassar o valor do I.M. de segurança proposto de 1,9, em um ultrassonógrafo de 15MHz, seria necessária uma aplicação de uma pressão acústica superior a 7,4 MPa e para um de 5MHz, uma pressão acústica superior a 4,2MPa. Portanto, por mais que muitos artigos insistam em trabalhar apenas com a pressão acústica, utilizar apenas este parâmetro como forma de análise não é de todo o ideal. Por outro lado, a frequência mais aplicada em estudos *in vitro* é de 1MHz ou 1.1MHz, guardando uma proporcionalidade entre a pressão acústica e o I.M. Logo, afirmações como a de Peter P. Chang *et al.* 2001 de que pressões de 0,5 a 3MPa são suficientes para destruir a maioria dos agentes de contraste poderiam estar equivocadas se o experimento realizado pelo grupo não tivesse sido realizado em 1.1MHz. Peter P. Chang realizou seu trabalho em agentes de contraste feitos de albumina, a Alburnex® (CHANG et al., 2001)

O efeito da pressão negativa relativa tem impactos importantes sobre os tecidos biológicos e sobre as ACUs. Pois, simplificando, o I.M. exprime a quantidade de energia transferida por unidade de tempo a um sistema, sendo um indicador de efeitos não térmicos, como *streaming* e cavitação (ŞEN; TÜFEKÇIOĞLU; KOZA, 2015) e podendo provocar efeitos deletérios ao organismo, todo equipamento de ultrassonografia deve exibir o valor do I.M. sendo aplicado ao tecido. Em relação a alguns estudos já desenvolvidos com relação às ACUs e o I.M. Sabe-se que níveis baixos do I.M. ( $I.M. < 0,1$ )<sup>27</sup> resultam em menor destruição

---

<sup>27</sup> Os valores de Índice Mecânico apresentados são estimados para agentes de contraste com cápsula lipídica, como o caso da ACUs comercial SonoVue. Valores para cápsulas poliméricas precisam ser avaliados. Membranas poliméricas são em geral mais rígidas e menos compressíveis que as lipídicas, o que pode ocasionar mudanças nos valores apresentados. Além de que, não existem dados disponíveis

das cápsulas que atuam como espalhadores eficientes, devido à grande diferença entre compressibilidade e densidade das ACUs comparado ao plasma sanguíneo que as cerca. Elas ainda oscilam de forma síncrona com a onda incidente (CORREAS et al., 2001; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Níveis intermediários ( $0,1 < I.M. < 0,5$ ) resultam em oscilações com maior amplitude de movimento e tornam-se assíncronas com a onda incidente. Nesta faixa, as ACUs começam a produzir efeitos não lineares, como as respostas harmônicas ( $2f, 3f, \dots$ ) a frequência fundamental emitida ( $f$ ) e também subarmônicas ( $f/2, f/3, \dots$ ) e são utilizadas para destacar o tecido das regiões com sem ACUs (CORREAS et al., 2001; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017; SHANKAR; KRISHNA; NEWHOUSE, 1998). Em níveis elevados ( $I.M. > 0,5$ ) começa a ocorrer a ruptura das cápsulas, produzindo fortes ecos transientes, ricos em componentes não lineares, além de que a destruição das ACUs leva a uma perda de correlação entre dois pulsos consecutivos, o que favorece técnicas como Color ou Power Doppler (CORREAS et al., 2001; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Cabe ressaltar que as pressões acústicas e I.M. que causam as destruições de um grupo de ACUs não é a mesma para outros tipos, o que torna imperativo identificar as condições de segurança<sup>28</sup> para cada novo agente de contraste sintetizado (SHI et al., 2000).

A ruptura das ACUs depende também de outros fatores ainda não mencionados, que podem facilitar ou atrapalhar a cavitação. São estes, a presença e abrangência de uma proteção externa a bolha, ou seja, uma capsula, material e sua espessura; tamanho do núcleo, do raio da bolha (XIONG et al., 2011); concentração de ACUs na região, conhecido como efeito escudo (CHANG et al., 2001; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018); frequência de repetição de pulso (PRF) (CHANG et al., 2001); e ciclo de trabalho (STRIDE, 2009).

---

sobre o efeito da espessura da cápsula sobre o sinal de retorno. Os valores apresentados servem como balizadores para o entendimento do conceito.

<sup>28</sup> O artigo cita apenas segurança, mas este não é a única razão pela qual se busca essas informações, saber o limiar de ruptura de uma ACU ajuda a saber qual a finalidade clínica que esta terá ou quais mudanças deverão ser feitas de acordo com o propósito esperado.

#### 4.7 MODO CONTRASTE EM ULTRASSONOGRRAFIA - CEUS

Com as primeiras aprovações para uso clínico dos ACUs, os fabricantes de equipamentos de ultrassonografia não demoraram para desenvolver um produto específico para estes novos tipos de materiais. Estes equipamentos contam com *softwares* específicos para o modo contraste, com frequência de amostragem superior a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética, possibilitando uma imagem com supressão do tecido de fundo (*background*) e melhorando o acompanhamento da vascularização ao longo do tempo, principalmente se comparado as duas outras categorias de imagem citadas (BARR, 2017). Os *softwares* possuem tais capacidades pois apresentam técnicas como inversão de pulso, que extrai os harmônicos sem aplicar filtros e, portanto, sem perda de informação e contraste (BARR, 2017; SHEN; CHOU; LI, 2005) combinado com modulação de pulso (BARR, 2017). Por fim, a função flash, que permite a súbita elevação do I.M. para valores próximos ao limite máximo estabelecido para uso clínico, provocando a eliminação (*clearance*) das ACUs presentes na região de irradiação. Esta função é vastamente explorada na cardiologia, para avaliar a perfusão do coração, doenças cardiovasculares e contornos do coração (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; STRIDE, 2009).

Contudo, ainda é uma tecnologia que necessita de dois operadores, um para operar o ultrassonógrafo e outro para o procedimento de injeção intravenosa, isso por que o tempo médio de circulação das atuais ACUs de segunda geração são de 5 min com um procedimento de exame estipulado em 3min. Ainda, o volume de dados gerados por exame é bastante superior a uma ultrassonografia convencional, requerendo um sistema de armazenamento externo na maioria das vezes (BARR, 2017).

A Figura 23 traz um breve resumo do tópico apresentado com as aplicações de cada técnica na clínica médica.

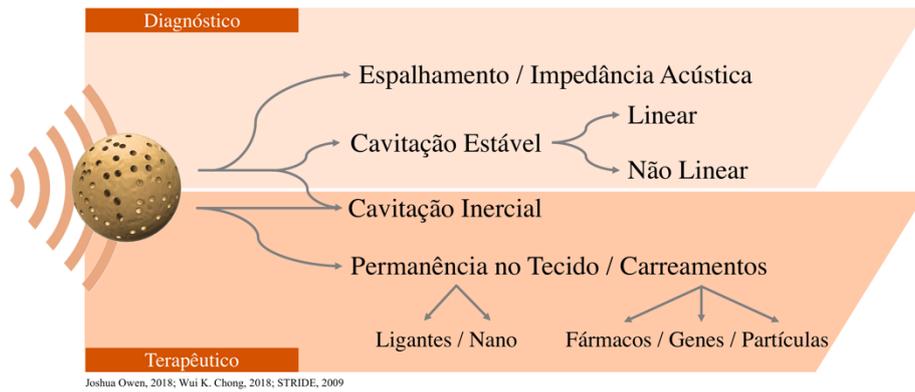


Figura 23: Resumo das aplicações Terapêuticas e Diagnósticas das ACUs.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto possui duas fases principais. A primeira consiste em produzir as cápsulas com o polímero PCL, segundo um protocolo adaptado de três grupos de pesquisa (ABDELWAHED et al., 2006; EL-SHERIF; WHEATLEY, 2003; SANNA et al., 2011), utilizando a técnica de dupla emulsão por aplicação de forças de cisalhamento, seguida da evaporação do solvente (A/O/A). Sintetizadas, as cápsulas devem ser analisadas 1) com auxílio de um microscópio óptico para uma análise inicial da presença de grumos, esfericidade e regularidade de diâmetro, 2) quanto à concentração de ACUs por grama obtida, utilizando uma câmara de Neubauer e o *Software* ImageJ® para a contagem; 3) com uso de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) para resultados da morfologia da cápsula, como, por exemplo, se encontram-se esféricas, íntegras, com ou sem poros, e se há resíduos do meio externo (PVA); 4) quanto ao tamanho médio, a polidispersão e a formação de grumos das ACUs, utilizando-se o equipamento Mastersizer® (Malvern Instrument Limited, UK); 5) quanto às propriedades mecânicas por Microscopia de Força Atômica (AFM).

A segunda fase do projeto, consiste na análise das propriedades acústicas das ACUs, foi realizada no Laboratório de Imagens Biomédicas (LIB). O LIB é um laboratório pertencente à Universidade Paris 6, *Université Pierre et Marie Curie/UPMC* de Paris, que possui vasta experiência e tecnologia na área. Para tanto, nesta fase, buscou-se analisar o 1) retroespalhamento; 2) a estabilidade temporal; e 3) a resposta à pressão acústica. A Figura 24 resume as fases e os métodos a serem utilizados.

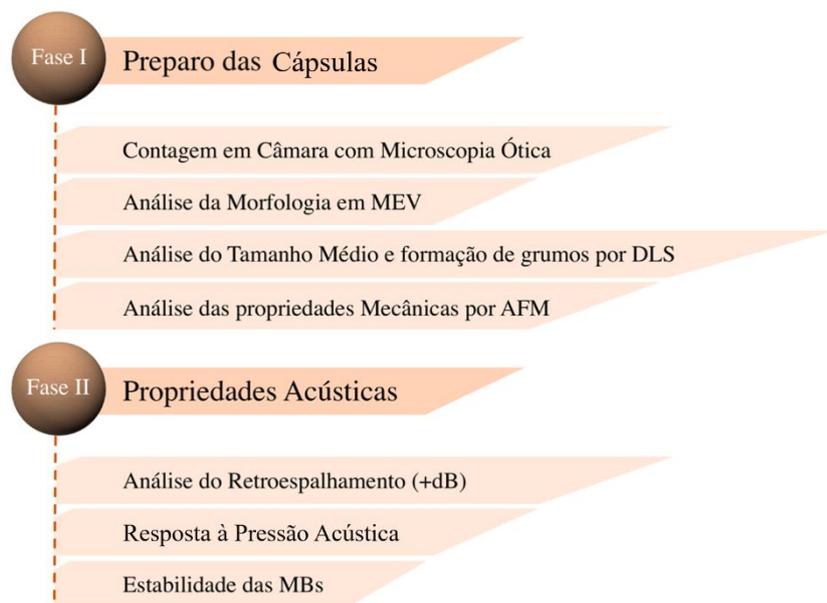


Figura 24: Resumo dos métodos a serem empregados no projeto. A) Fase 1 – síntese e análise estrutural das cápsulas. B) Fase 2 – análise das propriedades acústicas das ACUs.

## 5.1 POLI(ÁLCOOL VINÍLICO), *POLYVINYL ALCOHOL* – PVA

Neste projeto foram utilizados os PVAs da Sigma-Aldrich 98% hidrolisado e massa molecular de 13.000 – 23.000, lote MKCB 4654 e massa molecular de 89.000 – 98.000, lote MKBW1165V.

O PVA é um polímero sintético biodegradável solúvel em água. O polímero é amplamente utilizado nas indústrias, sendo principalmente utilizado para revestimentos de fibras, adesivos, emulsões, filmes para embalagem e agricultura, e para a produção de poli (vinil butiral). Ainda, apresenta baixa citotoxicidade, sendo bastante utilizados no campo de pesquisa biomédica e de biomateriais, como por exemplo para a formação de hidrogéis, agentes carreadores de enzimas, surfactante e crioprotetor (ABDELWAHED et al., 2006; HALIMA, 2016). Neste projeto, o PVA é utilizado como dispersante durante a preparação das cápsulas pela técnica de dupla emulsão.

## 5.2 POLICAPROLACTONA, *POLYCAPROLACTONE* – PCL

A PCL é utilizada como o material da estrutura das cápsulas e, portanto, o disperso durante a preparação das capsulas pela técnica de dupla emulsão. Neste projeto foram utilizadas as PCLs da Sigma-Aldrich, com massa molecular de 10.000 e 45.000 g·mol<sup>-1</sup>, lotes MKBV4985V e MKCD 3536, que serão chamadas neste projeto de PCL10 e PCL45, respectivamente (TUBA; OLÁH; NAGY, 2014). As propriedades mecânicas da PCL tendem a melhor com o aumento da massa molecular do polímero, fazendo com que a PCL45 tenha um comportamento, a princípio, mais elastomérico e menos quebradiço que a PCL10 (CHAO-JING et al., 2013; LIM; KIM; YOON, 2002).

## 5.3 FORMAÇÃO DAS MICROCAPSULAS

Neste processo, a primeira emulsão<sup>29</sup> ocorre pela adição de 200µl de solução aquosa de Poli(álcool vinílico) 1% (PVA) em solução de clorofórmio<sup>30</sup> (20ml) contendo 500mg de polímero (PCL). Após este processo, o conteúdo é emulsificado com Ultra-Turrax IKA T-10 basic e elemento dispersor +S10N-10G<sup>31</sup> em banho de gelo por 5 min. Esta emulsão (A/O)<sup>32</sup> é, então, vertida em 20ml de solução de PVA e, novamente em banho de gelo, sofre nova emulsificação, formando a dupla emulsão (A/O/A). O conteúdo do processo anterior é mantido sob agitação magnética *overnight* para eliminação do solvente orgânico, o que leva ao endurecimento da cápsula de PCL. Este processo de evaporação do solvente pode ser feito de forma mais lenta e controlada para evitar a formação de poros nas cápsulas ou com o sistema aberto para a rápida

---

<sup>29</sup> Sistema água, óleo e anfílico, opticamente isotrópico e termodinamicamente estável (DANIELSSON; LINDMAN, 1981).

<sup>30</sup> A PCL pode ser solubilizada em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, entre outros.

<sup>31</sup> O Ultra-Turrax é um equipamento capaz de entregar energia a um sistema por forças de cisalhamento, promovendo a dispersão e homogeneização do meio.

<sup>32</sup> A – Água; O – Óleo; a nomenclatura (A/O) é comumente empregada para descrever emulsões e vem da tradução dos textos em inglês (W/O), *water/oil*, em que o “A” ou “W” representa o componente hidrofílico, ou aquele que é solúvel em água e o “O” representa que seriam mais propensos a serem solúveis em materiais oleosos ou mais corretamente, aqueles hidrofóbicos.

evaporação do clorofórmio, formando poros<sup>33</sup>. A suspensão de ACUs é então lavada três vezes por centrifugação a  $480\vec{g}$  por 5 minutos para a remoção dos resíduos do processo. Ao fim deste processo, o conteúdo deve ser agitado mecanicamente para desprender o precipitado de cápsulas do fundo do tubo. O conteúdo final é então congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24h e liofilizado (Liofilizador Liotop L101) por outras 24h a aproximadamente zero atm a  $-60^{\circ}\text{C}$ , formando um pó de coloração branca que é armazenado em frascos de polipropileno sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$  e pronta para uso<sup>34</sup>. A Figura 25 mostra o equipamento de liofilização, e a Figura 26 mostra a bancada de experimentação desta parte do experimento. O liofilizado pertence a um outro laboratório, o Laboratório de Biopolímeros da COPPE.



Figura 25: Imagem de um Liofilizador Liotop L101. Equipamento destinado a liofilização das ACUs.

---

<sup>33</sup> Neste trabalho, os dois metodos foram realizados, produzindo microcápsulas com e sem poros de 45.000 e 10.000 g/mol.

<sup>34</sup> O trabalho de Jean-Marc Hyvelin mostra recomendações para o procedimento de armazenagem e resuspensão das ACUs.

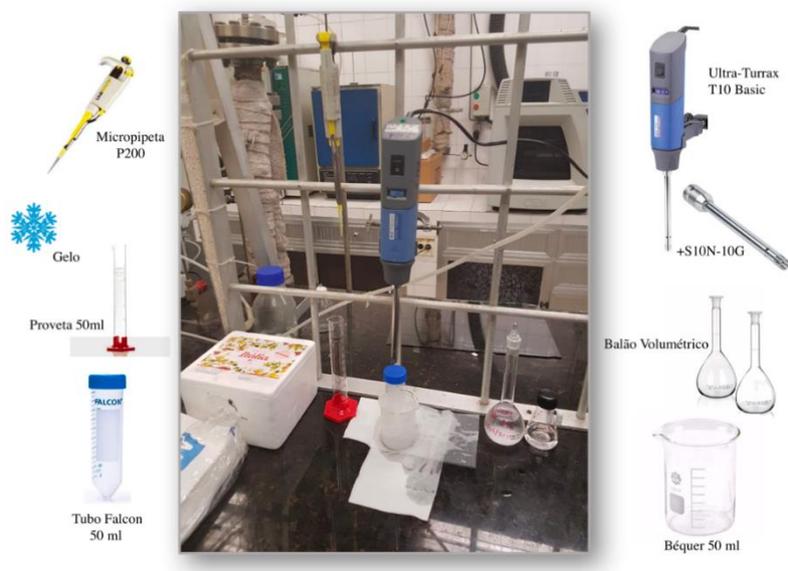


Figura 26: Foto da bancada de trabalho para a produção das ACUs. Todos os equipamentos utilizados estão listados. Todos os experimentos foram feitos no Instituto de Macromoléculas da UFRJ, no LCPRB.

#### 5.4 ANÁLISE PRELIMINAR DAS ACUs E CONTAGEM POR CÂMARA DE NEUBAUER

Uma balança de precisão (Shimadzu-AY220, Classe I, Brasil) com quatro casas decimais e desvio padrão de 0,001g foi utilizada para medir 0,01g do pó de ACUs. Em seguida, 10ml de H<sub>2</sub>O destilada foi utilizada para suspender o material. De imediato a emulsão passa a apresentar a coloração branca leitosa, indicando a presença de partículas micrométricas dispersas no meio. Desta emulsão são coletados 50µl para microscopia.

O microscópio ótico (Evos<sup>®</sup> XL Core Image System, Thermo Fisher Scientific, Brasil), Figura 27, é utilizado para uma análise inicial das ACUs, visando determinar a presença de grumos e se foi produzido ou não materias esféricos, de tamanhos regulares. Para isso, foi utilizada a lente objetiva de 20x, proporcionando um aumento de 200x.



Figura 27: Imagem de um Microscópio óptico Evos XL. Equipamento destinado à análise inicial das ACUs e suas contagens para estimativa de concentração.

Outros 50 $\mu$ l são coletados para a Câmara de Neubauer que também é levada ao microscópio para a contagem das ACUs. O processo de contagem ocorre como descrito a seguir: Quatro quadrantes de 1mm<sup>2</sup> de base e 0,1mm de altura são registrados em uma imagem que é então processada pelo *software* ImageJ<sup>®</sup>. A Figura 28 exhibe a câmara ilustra os quadrantes da câmara de Neubauer. O processamento das imagens ocorre em alguns passos. Primeiro, as imagens adquiridas sempre com as mesmas configurações do microscópio, são convertidas para 8 bits e, então, ajustada pela função *Threshold* em preto (nível 0 da escala binária) e branco (nível 1 da escala binária) com a faixa de corte fixada entre 45 e 77 da escala de cinza. O passo seguinte completa os buracos em branco com a função *Fill\_holes*. A imagem é então convertida para máscara (*mask*), onde então aplica-se a função *Watershed*, que separa elementos conectados entre si. Por último, a função *Analyze Particles* é utilizada para a contagem das partículas na imagem. Para isso alguns critérios são fixados, como o tamanho mínimo e máximo que o *software* entenderá por partícula (50 a 700 pixels de área) e partículas com grau de esfericidade entre 50% e 100%.

As contagens das quatro imagens são acumuladas e então extrai-se a média de ACUs por quadrante. Sabendo a concentração de ACUs em gramas por milímetros cúbicos (0,000001 g/mm<sup>3</sup>) e o volume da câmara (0,1mm<sup>3</sup>) pode-se obter a concentração de ACUs por mililitro e ACUs por grama.

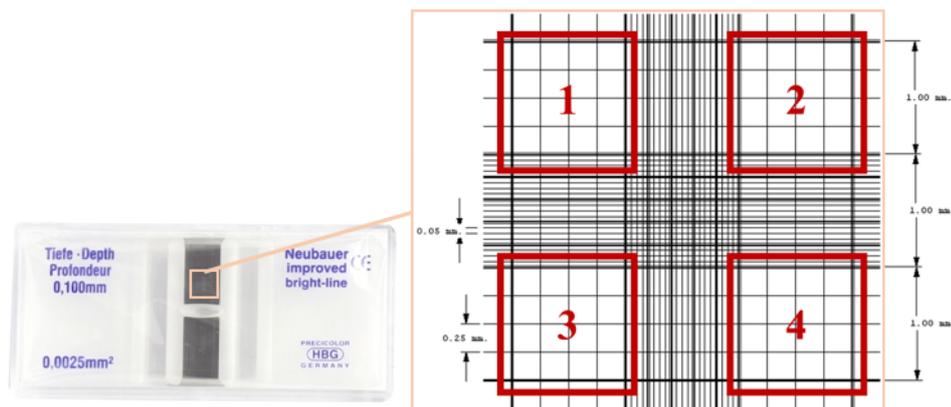


Figura 28: Câmara de Neubauer e ilustração das divisões internas que formam os quadrantes da câmara de Neubauer para a contagem do material.

## 5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O MEV (ISM-6460LV - JEOL), Figura 29, é utilizado neste projeto para a análise detalhada da superfície das ACUs (x500, x2.000 e x5.000 com aceleração de voltagem de 10kV e resolução de 3,00 nm)<sup>35</sup>, visando obter informações quanto à morfologia da cápsula, como, por exemplo, se encontram-se esféricas, íntegras e se há resíduos do meio externo (PVA). Segundo Abdelwahed *et al.*, não é raro os relatos de autores alegando a presença de PVA na superfície das ACUs mesmo após sucessivas lavagens (ABDELWAHED *et al.*, 2006).



Figura 29: Imagem de um Microscópio Eletrônico JEOL. Equipamento destinado à análise morfológica das cápsulas das ACUs.

<sup>35</sup> Voltagens superiores a 10kV resultavam em rompimento da cápsula ou elevada deformação da mesma. Em alguns estudos a voltagem de 5kV é empregada (LIU *et al.*, 2014)

## 5.6 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO (MASTERSIZER®)

A distribuição de tamanho da população de ACUs e a verificação da formação de grumos foi estimada por espalhamento de luz estático - SLS (Mastersizer Malvern 2000), Figura 30, utilizando água pura como dispersante culminando em 0,01g / ml de diluição e aplicando uma taxa de obscurecimento de 12% (MELO et al., 2012). O equipamento utiliza um sistema de laser focalizado, que incide sobre as amostras e mede o espalhamento do feixe utilizando sensores fotossensíveis. O espalhamento ocorre em diversos ângulos que são inversamente proporcional ao tamanho da partícula, analisando uma faixa de tamanho de 0,02 $\mu$ m a 2000 $\mu$ m (MALVERN, 2017).



Figura 30: Imagem de um Mastersizer Malvern 2000. Equipamento destinado à análise do tamanho e dispersão das ACUs.

## 5.7 PREPARO E FILTRAGEM DAS AMOSTRAS

As amostras foram inicialmente pensadas para estarem em uma concentração final de  $5 \cdot 10^8$  ACUs/mL, concentração escolhida com base na literatura para as poliméricas (HELFIELD et al., 2017; SONG et al., 2018). Porém, visto que ACUs poliméricas não possuem muitos estudos na literatura a respeito da concentração de uso ideal, nem de cavitação, e que se estima um limiar de ruptura para estas, superior ao convencional para outros agentes de contraste para ultrassom; associando ao efeito escudo reportado por Peter P. Chang, 2001 e Azzdine Y. Ammi, 2006 que afirma que o aumento da concentração de ACUs eleva o

limiar de ruptura. Aqui, neste trabalho, todas as amostras foram calculadas para estarem em uma concentração final de  $2 \cdot 10^7$  ACUs/mL (AMMI et al., 2006; CHANG et al., 2001), abaixo da concentração prevista e superior a um outro trabalho com ACUs à base de PVA que utiliza a concentração de  $1 \cdot 10^6$  ACUs/mL (H. CHEN; D. EVANGELOU; D. GRISHENKOV, 2019). Para tanto, foi utilizado o cálculo os dados referentes a contagem das bolhas realizada na câmara de Neubauer que serão apresentados no capítulo de RESULTADOS.

As amostras foram pesadas em uma balança de precisão (Satorius Class1), com cinco dígitos de precisão e posteriormente ressuspendidas em água MilliQ® em um total aproximado de 5mL. As mesmas são vagarosamente homogeneizadas pela inversão do tudo Falcon 15ml por 10 vezes e gentilmente homogeneizadas com o auxílio da micropipeta P5000 por 30 vezes, favorecendo a solubilização do PVA na água e liberando as ACUSs para filtragem. Após este processo, as amostras são filtradas em um filtro de hidrofílico de Náilon ou Nylon<sup>36</sup> com porosidade de  $10\mu\text{m}$  (Merck Millipore, Tullagreen, Irlanda) acoplado a uma seringa de 10ml para a retirada de eventuais grumos e ACUs de diâmetro superior ao desejado (Figura 31).

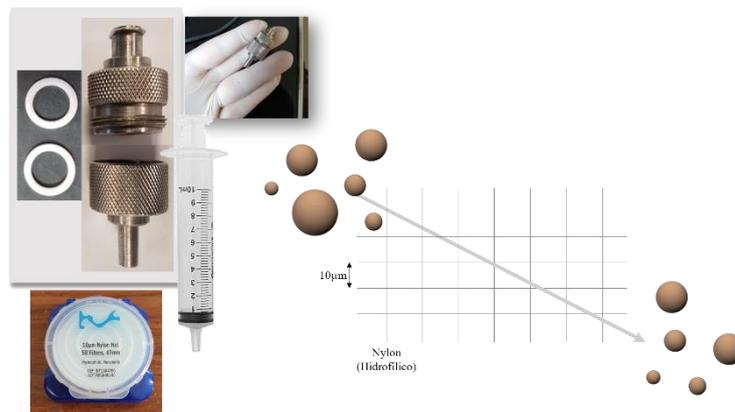


Figura 31: Esquema para filtragem das ACUs. Uma seringa conectada a um adaptador de filtro-seringa munido com o filtro de Náilon  $10\mu\text{m}$ . Os dois *o-rings* mostrados ao lado do adaptador metálico servem para a vedação do sistema interno.

<sup>36</sup> Existem diversos tipos de Náilon, o tipo em questão não foi informado pelo fabricante.

## 5.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas das amostras foram adquiridas utilizando o microscópio de força atômica JPK *Instruments* do laboratório de superfícies do Programa de Engenharia Metalúrgica e dos Materiais – PEMM/UFRJ. A microscopia de força atômica foi realizada nas amostras de cápsulas de PCL utilizando uma ponteira Tap150AL-G (BudgetSensors, AFM Probes), de raio <math><10\text{nm}</math>, de geometria simétrica e revestida com alumínio espelhado de espessura 30nm (Figura 32). A ponteira é designada para operação em modo de contato e contato intermitente.



Figura 32: Imagem de um microscópio de força atômica JPK. Equipamento destinado à análise das propriedades mecânicas das ACUs.

O modo contato permite a obtenção das curvas de força em determinados pontos da superfície das amostras, o qual é utilizado para obter os dados sobre as propriedades mecânicas das cápsulas de PCL. Para isso, uma imagem inicial de superfície das cápsulas é realizada pelo modo de contato intermitente, possibilitando a escolha do local em que será realizada a análise pelo modo de contato. Uma vez escolhida a região de  $2 \times 2\mu\text{m}$ , um mapa de força é

automaticamente gerado pelo equipamento, subdividindo esta região em 64 quadrantes distribuídos em 8 x 8 (Figura 33).

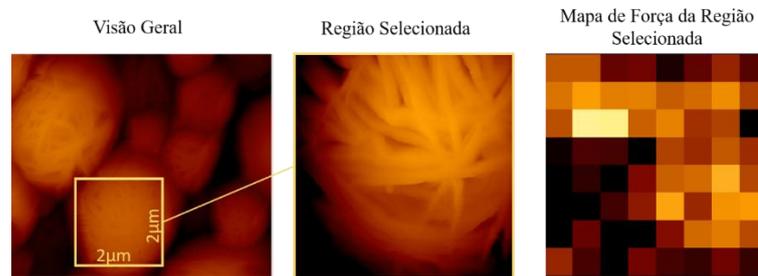


Figura 33: Processo de análise de uma região por AFM. Uma região de  $2 \times 2 \mu\text{m}$  é selecionada para a medição, resultando no mapa de força.

As forças geradas pelo mapa são analisadas pela inclinação da curva de retração (Slope da curva de retração) (Figura 34). Esta inclinação é formada quando a haste se retrai enquanto a ponteira ainda está em contato com a amostra e está relacionada à rigidez da amostra na região selecionada. Rigidez, esta, obtida pelo ajuste linear da curva e dada em N/m. A força de adesão ( $F_{ad}$ ) é dada pelo ponto mínimo da curva, correspondendo à posição de máxima força de adesão.

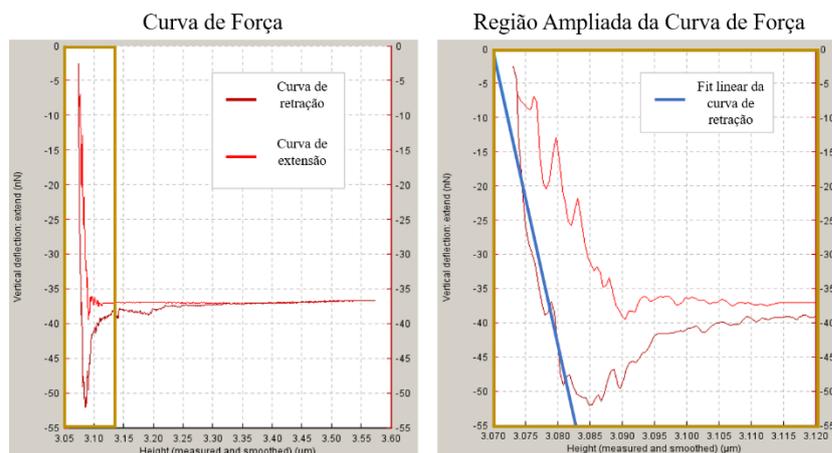


Figura 34: Curva de Força da AFM. A curva de força é obtida utilizando dados do mapa de força gerado anteriormente.

Utilizando a Equação 7 é possível estimar o módulo elástico da cápsula (E).

$$E = \frac{4(1-\nu^2)}{3 \tan \alpha} \frac{F_{max}}{\delta_{max}^2} \quad \text{Equação 7}$$

Em que  $\nu$  corresponde ao coeficiente de Poisson do ligante,  $\alpha$  a metade do ângulo da ponta do AFM,  $F_{max}$  a força para máxima indentação e  $\delta_{max}$  a profundidade máxima de indentação (ABEDALWafa et al., 2012; ENGELBERG; KOHN, 1991b).

## 5.8 ESTIMATIVA DA ESPESSURA DAS CÁPSULAS

Como descrito no trabalho de Astafyeva et. Al, é possível determinar a espessura de um ACU utilizando-se de métodos indiretos de análise. Conhecendo-se parâmetros como o raio médio ( $R_m$ ) e a compressibilidade das cápsulas ( $K_s^0$ ) [ $K_s^0 = 1/E$ ] é possível chegar a um valor estimado de espessura ( $T_m$ ) utilizando a Equação 8 de (ASTAFYEVA et al., 2015a):

$$T_m = R_m \left( 1 + \sqrt[3]{\frac{K^0}{K_s^0} - 1} \right) \quad \text{Equação 8}$$

Em que  $K^0$  corresponde a compressibilidade do material e corresponde a  $1/k\rho$ . Em que  $k$  é o valor do módulo de Bulk da PCL (455MPa) (ESHraghi; DAS, 2010; RAGAERT et al., 2014) e  $\rho$  é a densidade do polímero (1,145g/cm<sup>3</sup>, informação do fornecedor).

## 5.9 ULTRASSOM EM MODO PULSO-ECO – AS ACUs SÃO CAPAZES DE PRODUZIR RETROESPALHAMENTO?

A técnica de Pulso-Eco consiste em emitir uma onda de ultrassom através de um meio e recebê-la pelo mesmo transdutor, utilizando, portanto, apenas um transdutor por operação, que

atua como emissor e receptor da onda mecânica. Ao emitir a onda, ocorre a interação desta com o meio no qual ela atravessa, provocando uma alteração no padrão de recepção dos ecos e assim, permitindo que se estude o meio irradiado pelo equipamento. Esta técnica é ideal para a coleta de sinais de retroespalhamento provocado pelas ACUs em suspensão, bem como é o mesmo princípio utilizado nos equipamentos de ultrassonografia.

Sendo assim, foi utilizado: um gerador de função (Olympus, 5077PR Square Wave Pulse/Receiver), três transdutores ultrassônicos submersíveis monoelemento de 0,5mm de diâmetro, sendo um de 2,25MHz (Panametrics V306 2.25/0.5), um de 5,0 MHz (Panametrics V309 5.0/0.5) e um de 10,0 MHz (Panametrics V311 10/0.5), uma câmara de amostra, um osciloscópio (LeCroy Wave Surfer 424) e um posicionador eletrônico dos transdutores microcontrolado por computador e regulado por um motor de passos. As Figura 35 e Figura 36 exibem os equipamento e configurações experimentais, respectivamente.



Figura 35: Equipamentos utilizados na configuração experimental para as análises de pulso-eco.

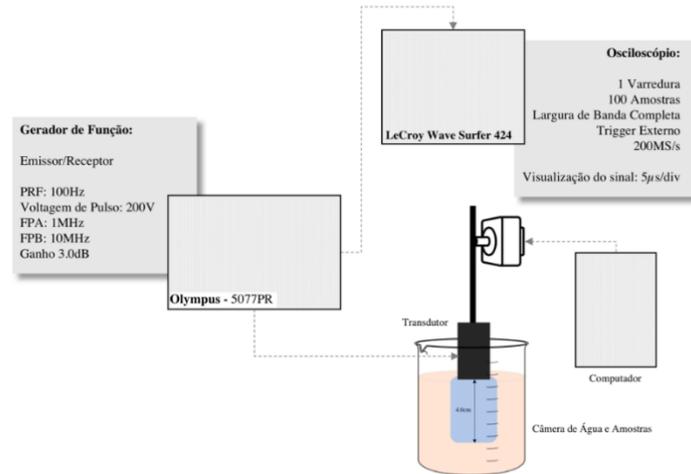


Figura 36: Configuração experimental para as análises de pulso-eco.

O gerador de função permite produzir sinais elétricos de frequências conhecidas, e mantém fixas a PRF em 100Hz, o filtro passa altas em 1MHz, o filtro passa baixas em 10MHz (desligado apenas quando operando na frequência de 10MHz), o ganho em +3dB e a tensão em 200mV, que são convertidos, no transdutor, em ondas mecânicas proporcionais ao sinal gerado. Como o transdutor fica acoplado diretamente ao meio aquoso que pode ser a água a amostras ou celulose, este permanece constantemente imerso e, portanto, acusticamente, acoplado ao meio. Ainda, o mesmo permanece alinhado com a amostra e perpendicular ao fundo da câmara constituída de gel ágar. Assim, após a emissão, a onda mecânica interage com o meio/amostra e retorna ao transdutor com as informações do meio, que novamente é convertida em sinal elétrico lido pelo osciloscópio (*backscatter* ou retroespalhamento). O sinal lido no osciloscópio pode ser então guardado na memória de um computador para processamento. As análises foram efetuadas utilizando os transdutores de 2,25MHz e 5MHz para as respectivas frequências e 10MHz para as frequências de 7,5MHz e 10,0MHz.

Primeiramente, colocou-se apenas água no compartimento de amostras, o qual serve como parâmetro e controle negativo para o experimento. Depois a água foi substituída pelas amostras de PCL. Em seguida, uma solução de celulose 20µm em mesma concentração relativa

de massa (M/M) substituiu a PCL no compartimento. A celulose serve como controle positivo de espalhamento, por ser um típico espalhador empregado na literatura (BRUNETTE et al., 2001; MADSEN; FRANK; DONG, 1998)<sup>37</sup>. Por último, todas as amostras são comparadas a um *phantom* de tecido nas mesmas condições de teste (BRUNETTE et al., 2001). Foram realizadas três repetições para cada amostra (n=3), doze repetições para a celulose (n=12) e seis repetições para o *phantom* (n=6). Sempre foram coletados cem sinais de cada processo, os quais foram processados em um programa desenvolvido em Matlab®. A comparação da intensidade do eco de retorno em dB foi estimada aplicando a Equação 9 (ASTAFYEVA et al., 2015a).

$$RS_{AR} = 10 \cdot \log_{10} \frac{S_A^2}{S_R^2} \quad \text{Equação 9}$$

Em que  $S_A^2$  corresponde ao valor do máximo do espectro do sinal da amostra, ou seja, o quadrado do máximo da FFT da amostra, que aqui pode ser tanto a PCL quanto a celulose.  $S_R^2$  corresponde ao máximo do espectro do sinal da referência, a qual sempre será a água. A configuração experimental é apresentada na Figura 37.

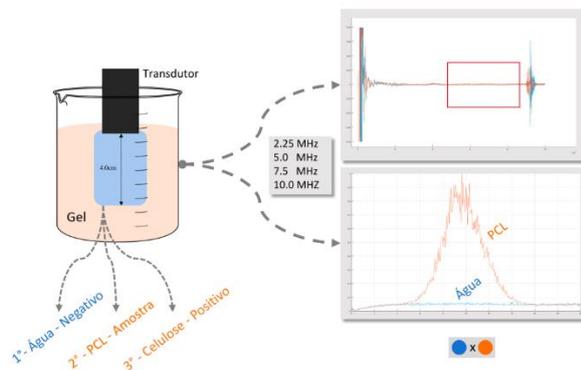


Figura 37: Ilustração da configuração experimental proposta para a análise das ACUs. Aplicou-se água na câmara para obtenção dos primeiros sinais de referência para todas as frequências estipuladas. Em seguida as PCL foram analisadas diante da mesma configuração e por último a celulose. A imagem mostra dois sinais típicos dos experimentos, um no domínio do tempo (acima) e outro no domínio da frequência (abaixo)

<sup>37</sup> Esta sequência, água, PCL e celulose, é importante para que um elemento não interfira no resultado do outro. Entre cada análise é necessário lavar a câmara com água corrente e com a mesma água do controle.

A posição dos ecos foi calculada pela distância da face do transdutor até a interface entre a água ou amostra e o gel. Como o sinal percorre um caminho de ida e volta, é necessário ajustar as distâncias relativas das interfaces, dobrando a distância. Assumindo a velocidade de propagação em  $1540\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , pode-se estimar o posicionamento dos ecos na escala temporal apresentada no osciloscópio ( $t = x \cdot c^{-1}$ ). A região de interesse é compreendida entre os sinais do eco da interface e do eco de excitação. Como existe um tempo de estabilização do eco de excitação, a região de interesse é posicionada, arbitrariamente, após esta região (Figura 38). A mesma janela foi aplicada em todas as medições. Foram realizadas três repetições para cada amostra ( $n=3$ ), sempre coletando com sinais processados em um programa desenvolvido em Matlab®.

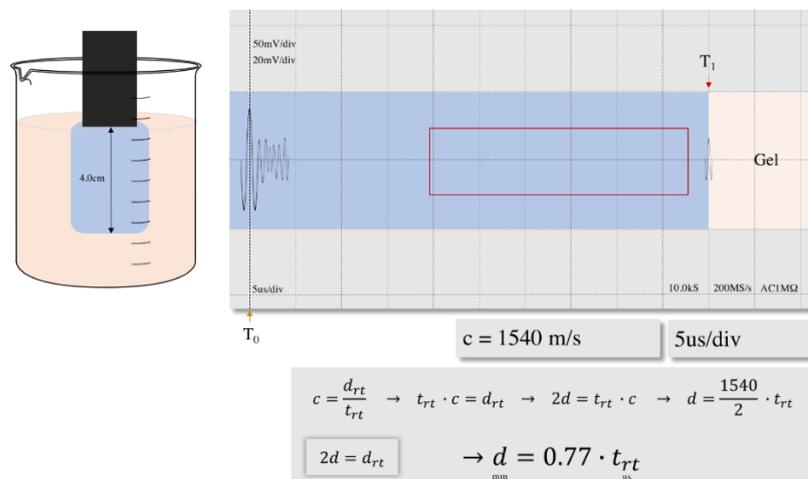


Figura 38: Estimando o posicionamento da janela de observação do sinal.

Com os cem sinais foi feita a média do sinal para estimar a melhor posição da janela, região de interesse, e então esta foi mantida para todas as futuras análises realizadas. Após a definição da janela, foi realizada a FFT de cada sinal e extraída a média destas FFTs, obtendo um único espectro para análise (Figura 39).

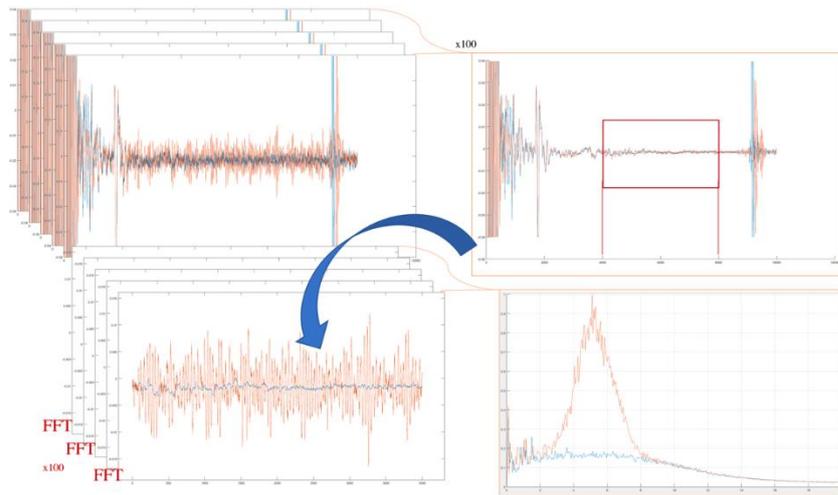
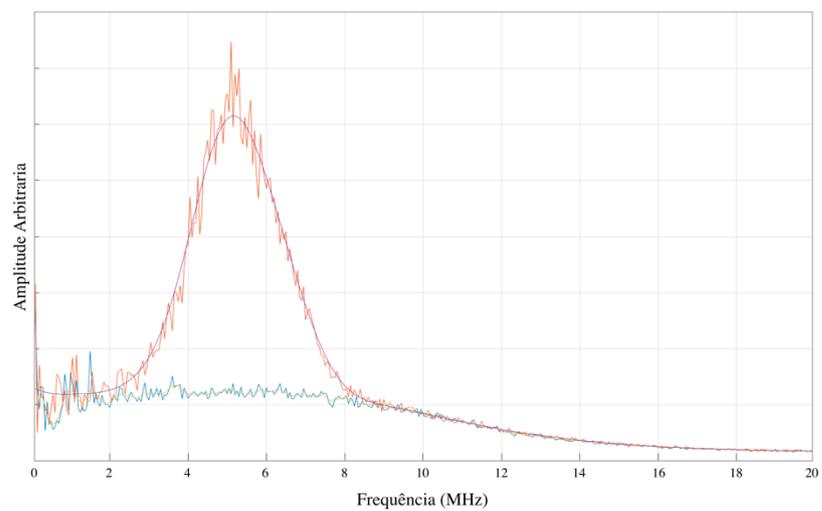


Figura 39: Utilizando os cem sinais de FFT para obtenção de um único sinal para análise utilizando-se a FFT das médias dos sinais.

Este mesmo espectro foi submetido a um ajuste polinomial do tipo Spline<sup>38</sup> para minimizar os efeitos do ruído e extrair um valor mais livres de ruídos para  $S_A^2$  e  $S_R^2$ .



<sup>38</sup> Spline é uma função, polinomial, definida por múltiplas subfunções, cada subfunção aplicada a um determinado intervalo do domínio da função principal.

## **5.10 ESTABILIDADE TEMPORAL DAS ACUs – ESTAS PERDEM VIABILIDADE QUANDO EXPOSTAS A ÁGUA?**

Aqui, como se sabe, a cápsula de PCL possui estabilidade, em água, por mais de doze meses (IQBAL et al., 2015; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017) e que, portanto, este não seria fator limitante a estas. Contudo, a presença de poros nas cápsulas das ACUs e o conteúdo de ar representa o principal ponto crítico à estabilidade destas, que tendem, em tese, a perder o conteúdo do núcleo para o meio por difusão (NOVARIO et al., 2005).

Assim, adotou-se a mesma técnica descrita em ULTRASSOM EM MODO PULSO-ECO, como forma de identificar as alterações de ACUs ao longo do tempo. Para isso, o procedimento descrito foi repetido nas mesmas amostras sete dias após os experimentos de retroespalhamento e, ainda, o grupo PCL45 foi acompanhado diariamente durante os sete dias.

## **5.11 ANÁLISE DE RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA**

Para a determinação do ponto de ruptura das ACUs, seguiram-se os preceitos levantados no capítulo de CAVITAÇÃO. Porém é necessário fazer alguns comentários iniciais, a literatura científica traz diversos nomes para o resultado da cavitação na cápsula das ACUs, como, fragmentação, colapso, ruptura, destruição e até mesmo cita a possibilidade de formação de MBs menores, após o processo (AMMI et al., 2006; APFEL; HOLLAND, 1991; ASHOKKUMAR, 2011; CHANG et al., 2001; HERBERT; BALIBAR; CAUPIN, 2006; INSERRA et al., 2014; SHI et al., 2000). Isso se explica pelo fato de que cada agente de contraste possui sua própria maneira de se comportar no campo de ultrassom, ACUs poliméricas por exemplo, tendem a ter uma espessura de cápsula superior aos demais tipos, numa faixa na de média de 100 a 200nm, além de possuírem uma rigidez média aproximada vinte vezes superior à bolha de ar livre,  $6,1 \cdot 10^4$ MPa de módulo elástico (ALLEN; KRUSE; FERRARA, 2001; XIONG et al., 2011). Ainda, alguns autores descrevem a cápsula com cerca

de 5% do raio e 15% do volume total da ACU (LARS HOFF, 2001). Deve-se ter prudência nesta afirmação e lembrar que polímeros são moléculas versáteis e, assim como os agentes de contraste, não podem ser generalizados. Estes e outros fatores fazem com que ACUs poliméricas em geral permaneçam intactas, após eventos de cavitação, não havendo fragmentação das mesmas, mas, sim, ruptura e consequente ejeção destas da região em que se encontram (XIONG et al., 2011). O importante é que estes eventos produzem fortes sinais não-lineares, que permite o estudo deste tipo de evento (AMMI et al., 2006; CHANG et al., 2001; INSERRA et al., 2014; XIONG et al., 2011).

#### **a. CONFIGURAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Para as análises, as amostras foram colocadas dentro de um tubo de PCR<sup>39</sup> que serve de recipiente, posicionado e conteúdo da suspensão no tanque acústico. Como cada tubo de PCR contém 250µL e todas as amostras são produzidas para experimentos em triplicata, e com seis parâmetros diferentes, são necessários no mínimo 4,5mL de produto final (ACUs em suspensão) distribuídos em 18 tubos de PCR contendo amostra. Cada tubo de PCR é, individualmente, posicionado no ponto cofocal entre o transdutor de emissão e o hidrofone e então o sistema é ativado.

#### **b. CONFIGURAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS**

Foi utilizado um equipamento dedicado presente no LIB/Paris. O método consiste em utilizar um gerador de frequências (Agilent, modelo 33250A,) que produz um sinal tipo *burst* elétrico que passa por um amplificador de sinal RF (AR france, modelo 150A100B, França) seguido de um monitor de potência *Power Reflexion Meter*<sup>40</sup> (Rohde & Schwartz, Modelo NRT, Alemanha) para medir a reflexão e a intensidade entregue ao transdutor (Sonic

---

<sup>39</sup> Tubo de PCR é um pequeno tubo de ensaio de 250µl destinado a equipamentos de PCR - *Polymerase Chain Reaction*.

<sup>40</sup> Em nota, o fabricante afirma que o equipamento é transparente ao sistema e a interferência produzida nos dados gerados ou coletados é nula.

Concepts, modelo Y-107, USA) que converterá o sinal em uma onda mecânica. O ultrassom se propaga, então, em um tanque acústico com água degaseificada a uma temperatura de 36 a 37°C controlada pelo equipamento de degaseificação (Sonic Concepts, modelo WDS-105+, USA)<sup>41</sup>. Um tubo de PCR de 250µL com parede de espessura de 0.5mm é posicionado no campo focal do transdutor (63,2mm), de maneira a centralizar o campo focal dentro do tubo preenchido com a solução a ser estudada. A cavitação é monitorada usando um transdutor focalizado de banda larga que funciona como hidrofone (Sonic Concepts, modelo Y-107, USA). A Figura 40 ilustra o esquema do processo e a Figura 41 exibem o equipamento e a configuração experimental proposta, respectivamente.

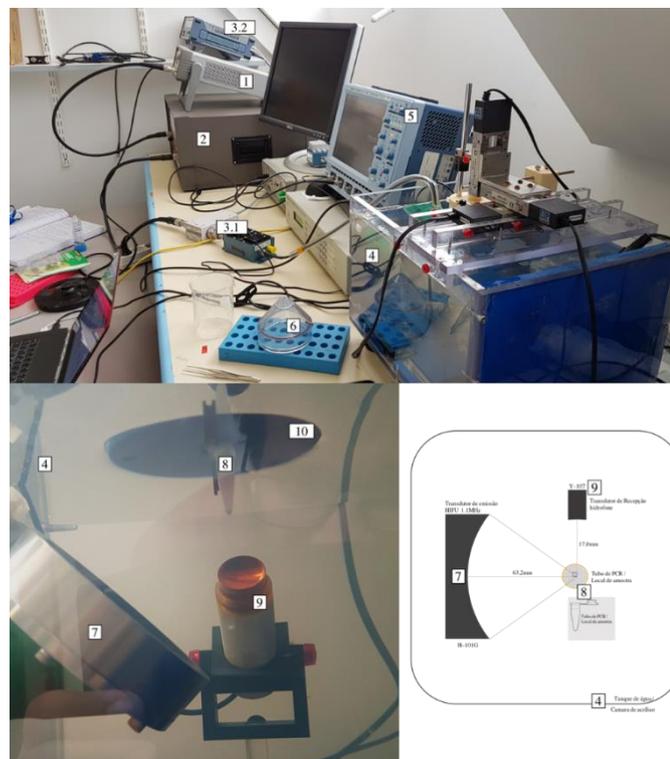


Figura 40: Equipamentos utilizados na configuração experimental para as análises da resposta à pressão acústica. 1 – Gerador de Frequências; 2- Amplificador de Sinal; 3.1 – Espelhador de Sinal; 3.2 - Monitor de Potência; 4 - Tanque de água; 5 - Osciloscópio; 6 – Funil para posicionamento da amostra; 7 – HIFU; 8 – Tubo PCR para amostras; 9 – Hidrofone; 10 – Absorvedor acústico.

<sup>41</sup> Mesmo com a presença de um equipamento de degaseificação, a presença de gases dissolvidos na água pode influenciar no comportamento das partículas em observação (SHEERAN et al., 2011). Contudo este estudo foi realizado em nBs das quais deveriam ser submetidas a processos de vaporização, diferenciando-se fisicamente do caso deste trabalho.

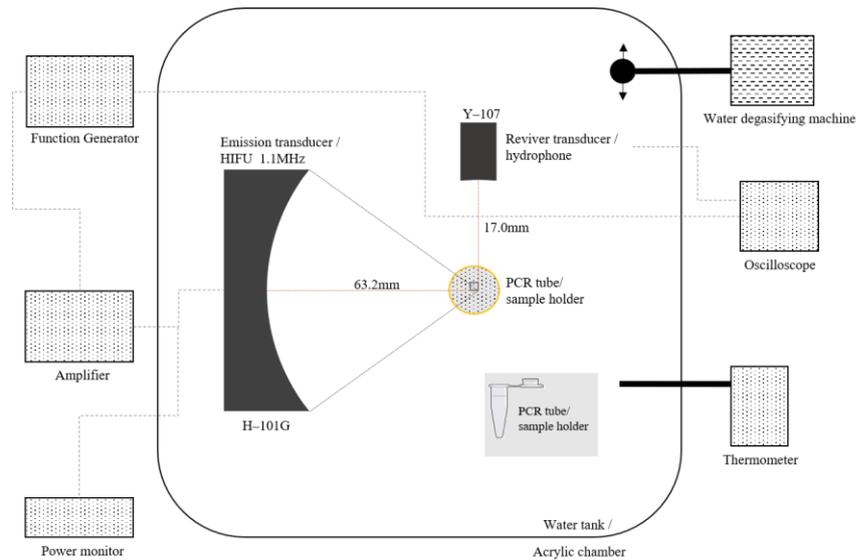


Figura 41: Configuração experimental para as análises da resposta à pressão acústica.

### c. ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Para iniciar a abordagem, foi estabelecido qual seria a pressão acústica máxima que poderia ser aceita em uma possível utilização na clínica, chegando-se no limite superior de 1,9 de I.M., sem ultrapassar 3,0MPa<sup>42</sup> (BARNETT et al., 2000; BRAYMAN et al., 1996; CHANG et al., 2001). Pelos cálculos do I.M., na frequência proposta de 1.1MHz, a pressão acústica deveria obrigatoriamente estar próxima a 2MPa para obter o I.M. desejado. Fixado este Limite Clínico, outras configurações ainda precisavam ser estabelecidas, portanto, Clínica I e Clínica II foram propostas, que propõe um I.M. aproximado de 0,5 e 1,0, respectivamente. Clínica I e Clínica II, como o nome sugere, são faixas de uso regular na clínica médica, que induzem boas respostas para ACUs comerciais. Ainda, três outras configurações foram estabelecidas, uma chamada de Acima da Clínica com I.M. superior a 1,9 e outras duas com valores entre a Clínica II e o Limite Clínico, nomeados de Inter I e Inter II, respectivamente. A Figura 42 ilustra este esquema experimental.

<sup>42</sup> Valor referente ao PPN e não a amplitude total.

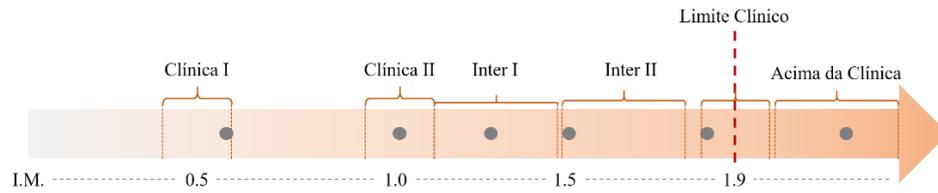


Figura 42: Abordagem experimental proposta para a análise da resposta à pressão acústica.

Para isso, é necessário definir outros parâmetros, como a frequência a ser empregada, que como mencionada acima foi de 1,1MHz. A frequência de repetição de pulso (PRF) que também já foi estudada como fator importante para a cavitação; em que, a redução da PRF reduz o limiar de ruptura à pressão acústica (AMMI et al., 2006; CHANG et al., 2001). Neste experimento foi proposto um PRF de 100Hz (com PRP de 10ms). Um ciclo de trabalho de 5% e um tempo de processo total de 20s, ou seja, o equipamento permanece ligado por 20s emitindo o ultrassom de acordo com os parâmetros acima (CONSTANTIN C. COUSSIOS et al., 2019; YANG SUN et al., 2019).

Todos estes parâmetros foram mantidos fixos durante todos os experimentos. Os valores de amplitude e ganho foram alterados de acordo com a necessidade da pressão a ser entregue à amostra. A Tabela 3 mostra o desenho experimental proposto.

Tabela 3: Esquema Experimental para a análise da Resposta à Pressão Acústica. Para cada faixa proposta são apresentados os parâmetros fixos e comuns a todas as faixas para gerar o sinal, os parâmetros específicos para gerar o sinal com a pressão pretendida de cada faixa, o valor da pressão pretendida e o valor obtido.

	Fixo					Entrada	Saída / Esperado		Calculado / Esperado	
	$f$ (MHz)	PRF (Hz)	PRP (ms)	DC (%)	DS (s)	Amp. (mVpp)	Pressão Acústica** (MPa)		Índice Mecânico	
Clínica 1	1,1	100*	10	5	20	163 / Ganho 07	1,28 ± 0,40	P = 1,0	0,49 ± 0,04	= 0,5
Clínica 2						163 / Ganho 09	2,18 ± 0,29	P = 2,0	0,95 ± 0,01	= 1,0
Inter 1						100 / Ganho 11	2,76 ± 0,02	2,0 < P < 3,0	1,27 ± 0,02	1,0 < I.M. < 1,5
Inter 2						120 / Ganho 11	3,25 ± 0,05	3,0 < P < 3,5	1,53 ± 0,02	Inter 1 < I.M. < 1,9
Limite da Clínica***						163 / Ganho 10	3,67 ± 0,15	3,5 < P < 3,9	1,73 ± 0,04	Inter 2 < I. M. < 1,9
Acima da Clínica						163 / Ganho 11	4,54 ± 0,10	P > 4,0	2,13 ± 0,04	I.M. > 1,9

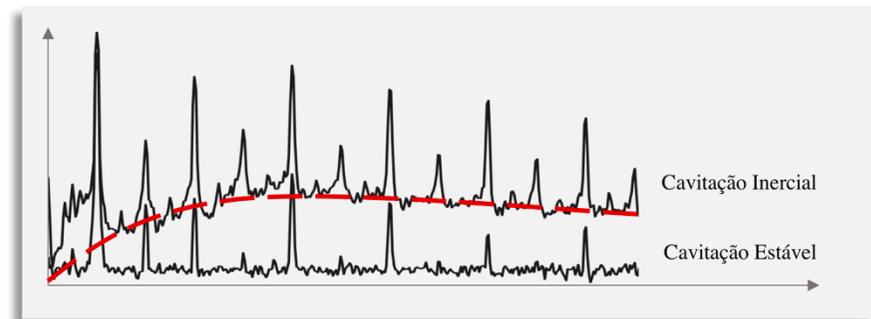
\* Reduzindo o PRF reduz o limiar de rutura à pressão acústica. (Chang, 2001; Ammi, 2006)

\*\* Amplitude total da pressão acústica, não corresponde ao pico de pressão negativa.

\*\*\*Peter P Chang, 2001; Andrew A. Brayman 1996; Stanley B. Barnett, 2000

$f$  – Frequência  
 PRF – Frequência de Repetição de Pulso  
 PRP – Período de Repetição de Pulso  
 DC – Ciclo de Trabalho  
 DS – Duração do processo  
 Amp. – Amplitude do sinal emitido

Faixa de temperatura: entre 36 e 37°C  
 Tubo PCR Volume: 250µl  
 N-Ciclos = 275 aproximados



A variação de pressão acústica proposta neste trabalho coincide com a apresentada na metodologia de estudo de Paul S. Sheeran *et al.* que para avaliar nano-gotas como agentes de contraste para ultrassom, utilizou pressões de 1,43 a 4,97MPa pico a pico, resultando em I.M. de 0,64 a 2,22 (SHEERAN *et al.*, 2011). A equipe de pesquisa foi elevando a pressão gradualmente sobre o mesmo grupo de amostras de nBs, enquanto aqui foi aplicado seis pressões diferentes, dentro deste intervalo, em grupos diferentes da mesma amostra de MBs.

Um código escrito em MATLAB® com Interface Gráfica do Usuário (GUI) foi desenvolvido para conectar o computador a todos os componentes do equipamento de cavitação para o seu controle. A Figura 43 exibe o painel de interface em GUI do código em MATLAB®, que permite fornecer como entrada os parâmetros de amplitude, PFR, DC e DS.

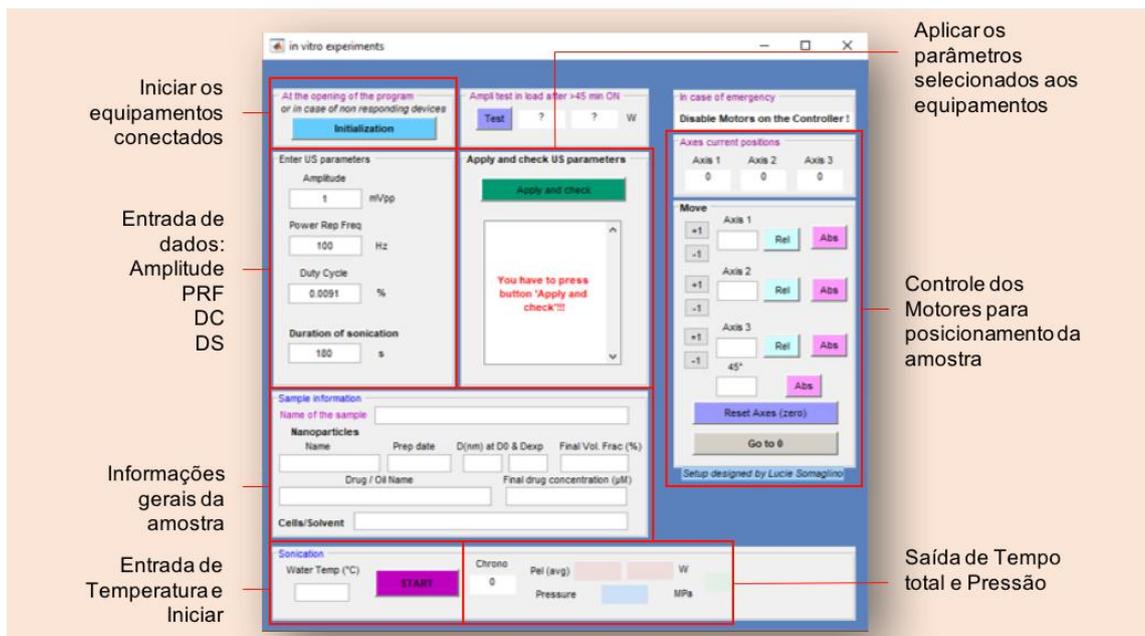


Figura 43: Interface GUI do programa escrito em Matlab®.

Fixados os parâmetros e condições de teste, os sinais de cavitação foram coletados e processados gerando gráficos de FFT. O pico do componente harmônico de segunda ordem (2,2MHz) foi utilizado para a análise da resposta das ACUs à pressão acústica. A equação empregada aqui é a mesma utilizada anteriormente para este tipo de cálculo (Equação 9).

## 6.1 OS PRIMEIRAS GRUPO DE ACUs

A observação inicial das primeiras ACUs foram feitas visualmente ao resuspender as partículas em água. A presença de grumos, neste grupo inicial, podia ser notada facilmente a olho nu, produzindo um aspecto flocular das partículas em meio aquoso, como mostra a Figura 44. Estas deveriam se apresentar com o aspecto turvo leitoso, e não em uma formação com grumos nítidos em suspensão.

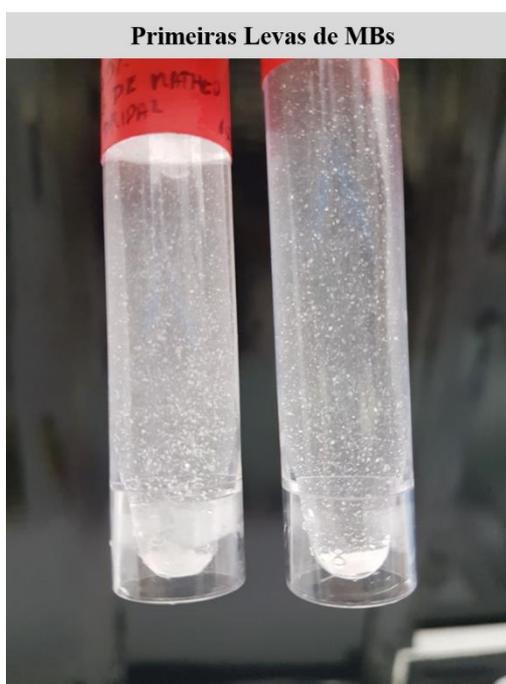


Figura 44: Fotografia dos Primeiros Grupos de ACUs poliméricas. Nítida presença de grumos.

As ACUs foram, em seguida, submetidas a uma análise por microscopia óptica, com o objetivo de avaliar se estas encontravam-se no formato esférico, se existia alterações de tamanho ou formação de grumos. Esta primeira avaliação não traz resultados imediatos, mas serve para identificar possíveis erros na síntese das cápsulas antes de dar continuidade às demais avaliações. A Figura 45 mostra algumas das ACUs sintetizadas. As imagens representam quatro regiões diferentes de uma mesma lâmina com uma amostra representativa das ACUs produzidas nos primeiros grupos. Devido a uma limitação técnica, não está sendo

exibida a barra de escalas<sup>43</sup>. Todas as cápsulas aparentam possuir formato esférico, correspondendo ao esperado.

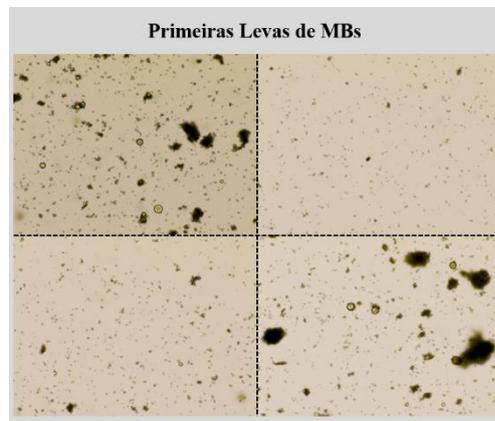


Figura 45: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200. Grumos bastante presentes.

Continuando a análise, as amostras foram submetidas a MEV, buscando visualizar a morfologia das cápsulas. A Figura 46 mostra as imagens referentes às ACUs dos Primeiros Grupos. A Figura 47 exhibe a presença de PVA aderido a cápsula de PCL, em que duas imagens iguais são dispostas, sendo um original em escala de cinza e a outra colorida para destacar a presença de PVA (Azul) aderido à cápsula das ACUs (Verde).

---

<sup>43</sup> A ausência de barra de escalas não influenciou no fluxo do projeto, uma vez que o tamanho das partículas foi avaliado em outro momento do projeto.

### PCL10 - Primeiras Levas

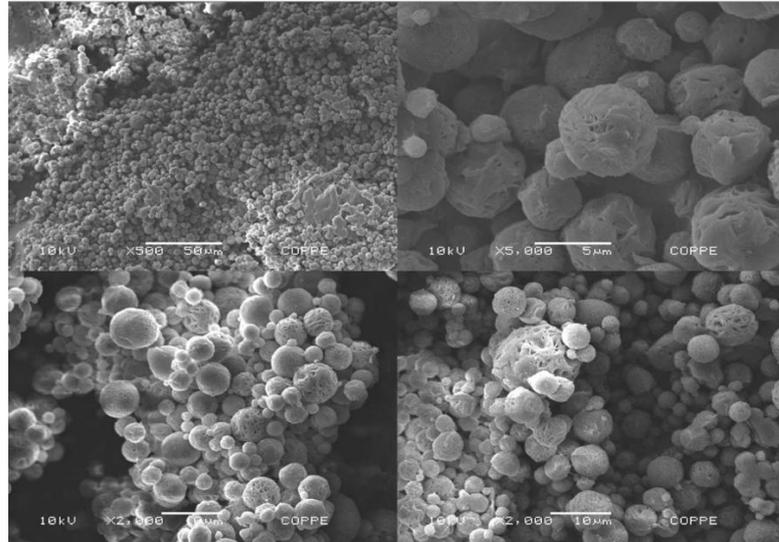


Figura 46: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa das ACUs referentes os Primeiros Grupos.

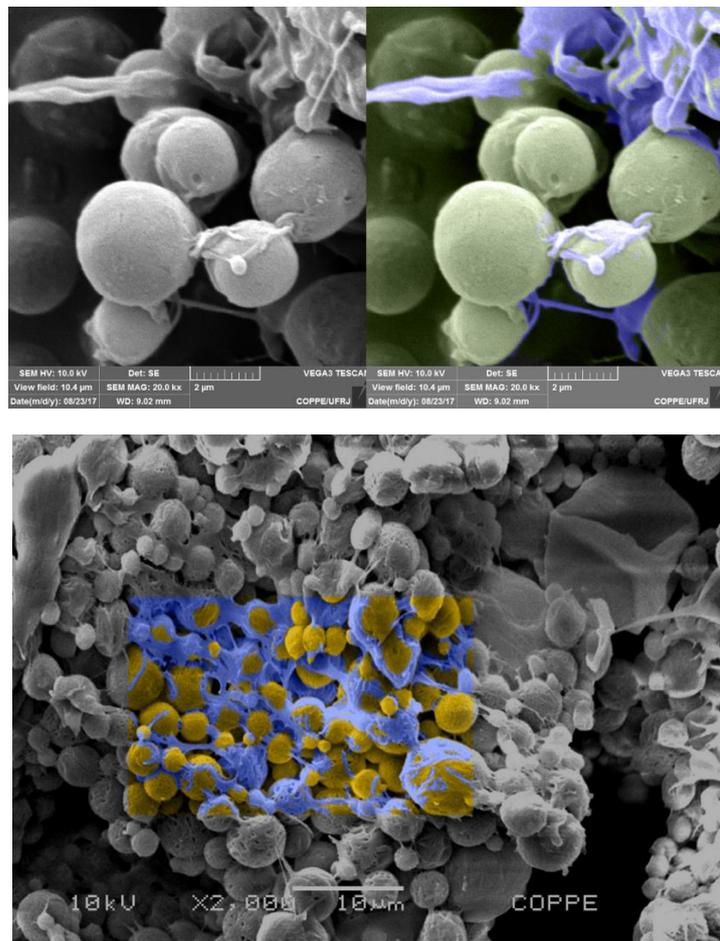


Figura 47: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura exemplificando a presença de PVA aderido a cápsula de PCL das ACUs (A) MEV original em escala de cinza e (B) colorida para destacar a presença de PVA (Azul) aderido à cápsula das ACUs (Verde ou Amarelo).

Deste ponto, observou-se que era necessário alterar a metodologia de produção das ACUs. A principal diferença entre os dois grupos foi a troca da massa molecular do PVA, que passou de 89.000 – 98.000 para 13.000 – 23.000. Esta troca possibilitou uma melhor dissolução do PVA na água, melhorando a retirada do polímero durante a lavagem e liberando os grumos remanescentes em menor tempo quando realizada a ressuspensão. Outro fator que contribuiu foi a adição de um passo no protocolo de síntese das ACUs, em que, após a última centrifugação no processo de lavagem, as partículas são agitadas mecanicamente para que se desprendam do fundo do tubo de centrifugação e permaneçam mais soltas para o congelamento e posterior liofilização.

## RESULTADOS

### 6.2 OS NOVOS GRUPOS DE ACUs

Estes novos grupos, sintetizadas com as alterações propostas, apresentaram-se como partículas finas em forma de pó e cor branca de fácil dispersão em água, apresentando aspecto turvo leitoso no meio aquoso (Figura 48)

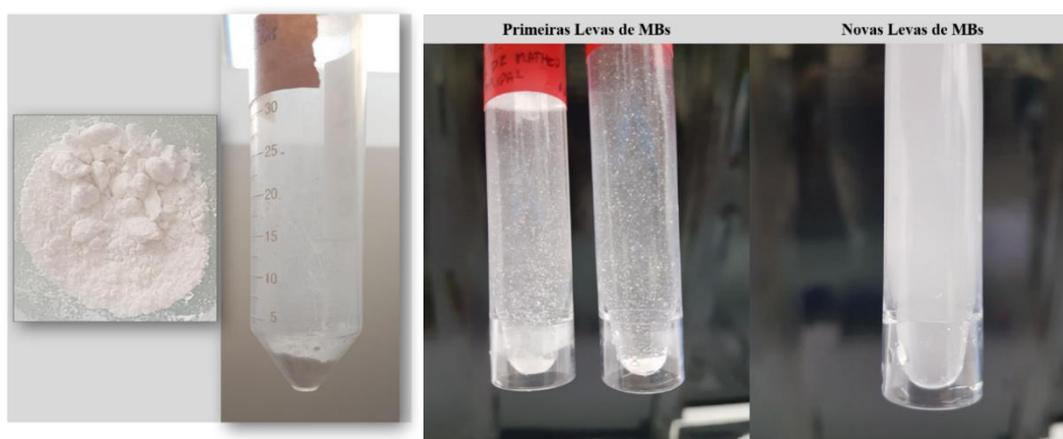


Figura 48: Imagens dos novos grupos de ACUs. Seco na imagem da esquerda e em suspensão na imagem da direita.

À microscopia, todas as cápsulas produzidas aparentavam possuir formato esférico, com grumos menos aparentes que nos Primeiros Grupos (Figura 49).

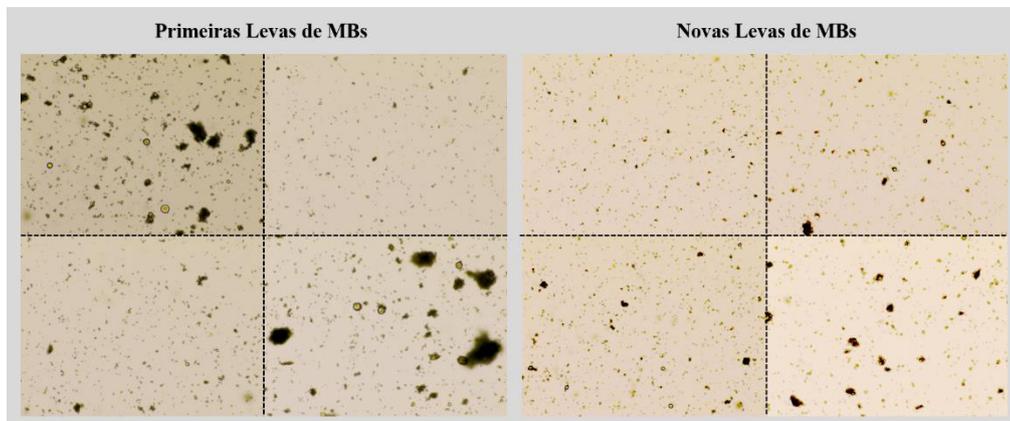


Figura 49: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200. Grumos menos nítidos e menos volumosos nos novos grupos.

Na visualização por MEV, percebe-se pouco PVA aderido as cápsulas de PCL. Percebe-se, ainda, que elas apresentam um aspecto esférico com porosidades (Figura 50).

#### PCL10 - Nova Leva

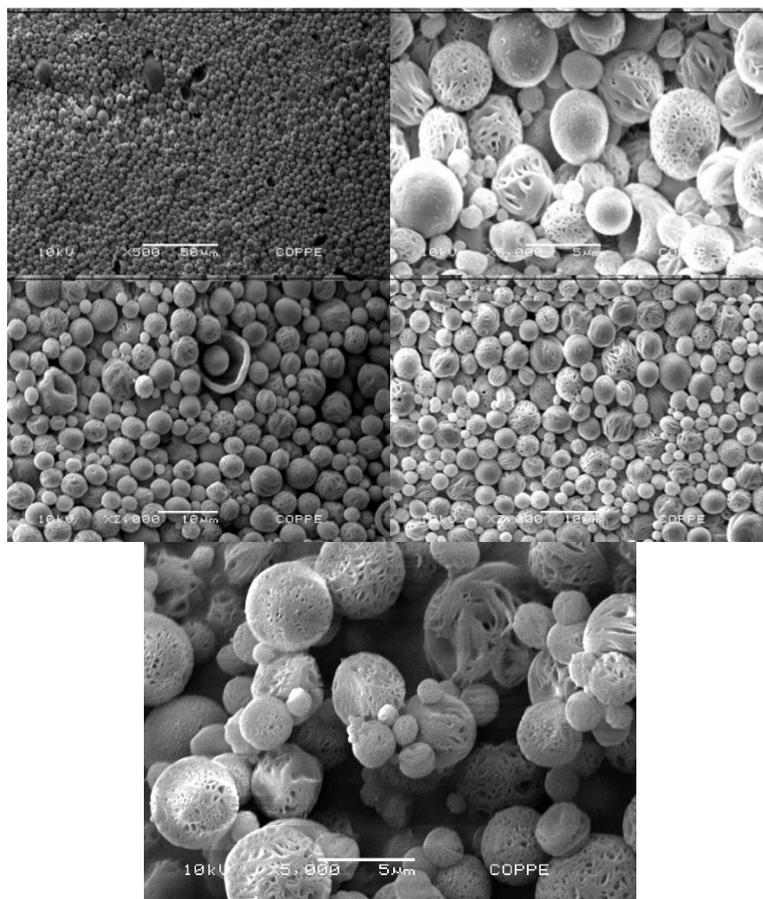


Figura 50: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa das ACUs referentes aos Novos Grupos.

Após verificação que o novo método estava dentro do considerado viável para os experimentos, mais uma proposta de alteração metodológica foi adotada. Desta vez, o tempo de evaporação do clorofórmio seria expandido, deixando este processo ocorrer durante um maior período de tempo. Com isso, esperava-se evitar a formação dos poros. A Figura 51 exibe a imagem em MEV destas. Contudo, este grupo não foi levado para os testes de FASE II, pois não foram minimamente testadas antes do período previsto e não foram feitas em quantidade mínima necessária.

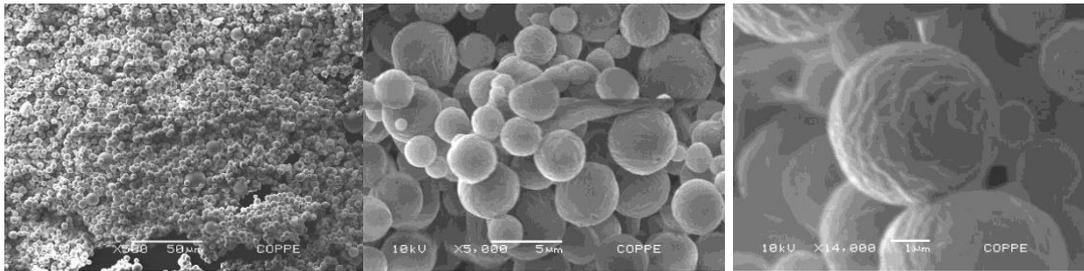


Figura 51: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa das ACUs feitas sob o procedimento de evaporação do solvente controlado.

Após a etapa inicial e qualitativa de análise, as cápsulas consideradas aptas à continuidade dos estudos, foram contadas em Câmara de Neubauer, para obter a estimativa da concentração de cápsulas por grama de material obtido<sup>44</sup>. As ACUs produzidas com PCL10 tiveram sua concentração estimada em  $0,84 \cdot 10^{10} \pm 0,14$  ACUs/g. As produzidas com PCL45 tiveram suas concentrações estimadas em  $1,06 \cdot 10^{10} \pm 0,20$  ACUs/g. A concentração obtida é suficiente para atingir a dose necessária para CEUS (cerca de  $10^8$  ACUs  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) (HYVELIN et al., 2013).

A distribuição do diâmetro médio da população de ACUs apresentou valores de  $6,4 \pm 1,3\mu\text{m}$  no desvio padrão de 50% e  $14,8 \pm 3,7\mu\text{m}$  no desvio padrão de 90%; com diâmetro máximo de  $45\mu\text{m}$  (Figura 52). Com esses dados foi nítida a necessidade de impor um limite ao tamanho máximo à população. Como, elas encontravam-se em um tamanho inferior a  $10\mu\text{m}$ , em sua grande maioria, isto pode ser resolvido com filtragem. Sem, evidentemente, parar de buscar por outras soluções na síntese das partículas.

---

<sup>44</sup> Como os grupos iniciais produziram muitos grumos, e, portanto, consideradas inadequadas, não foi possível avaliá-las nesta etapa.

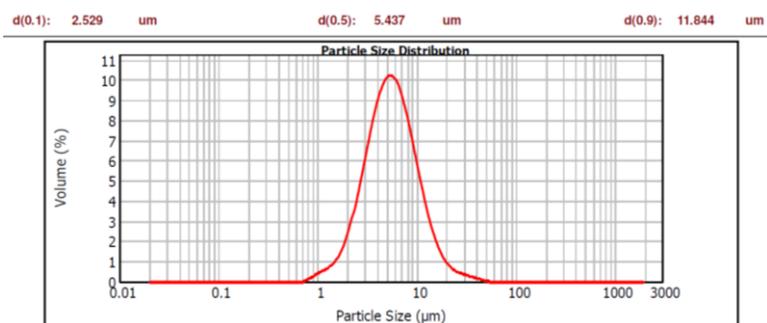


Figura 52: Curva da distribuição do tamanho das ACUs. A curva aqui disposta é referente a PCL45, mas é representativa de ambas PCL.

### 6.3 FILTRANDO OS ACUs

Os resultados da MEV em associação com a microscopias óticas e SLS, revelou a presença de PVA aderido as ACUs com a formação de eventuais grumos e ACUs acima do tamanho de 10µm, sendo necessário adotar um processo de filtração, optando-se por um filtro de Náilon com abertura de poro de 10µm. A escolha desta abertura de poro se deve a três fatores principais, primeiro que partículas muito grandes podem obstruir a luz dos vasos sanguíneos e resultar em embolias e lesões ao vaso e/ou tecido adjacente (TALU et al., 2007); segundo, é consenso na literatura atribuir o valor de 10µm como o limite superior para o tamanho de uma ACU (TALU et al., 2007); terceiro, este é o tamanho em que seriam aproveitados a maior parte, cerca de 90% das partículas que foram geradas.

A primeira filtragem resultou em um filtrado translucido, com raras ACUs em solução, vistas somente em microscopia ótica, provavelmente devido a presença do PVA externo aderido as cápsulas e ao próprio PVA não dissolvido não solução aquosa (Figura 53).



Figura 53: Foto do filtro de náilon após a primeira filtração. Os grumos remanescentes permanecem aderidos ao filtro, que é deixado para secar e então pesado novamente para estimativa do percentual retido.

Para solucionar esta limitação, foi adotando um procedimento de ressuspensão e filtração descrito nos MÉTODOS – PREPARO E FILTRAGEM DAS AMOSTRAS. Este procedimento resultou em um produto final de concentração média de  $1,64 \cdot 10^7 \pm 0,44 \cdot 10^7$  ACUs·ml<sup>-1</sup>, sendo então, uma taxa de aproveitamento médio de 82%, dentro do esperado pelos resultados do SLS.

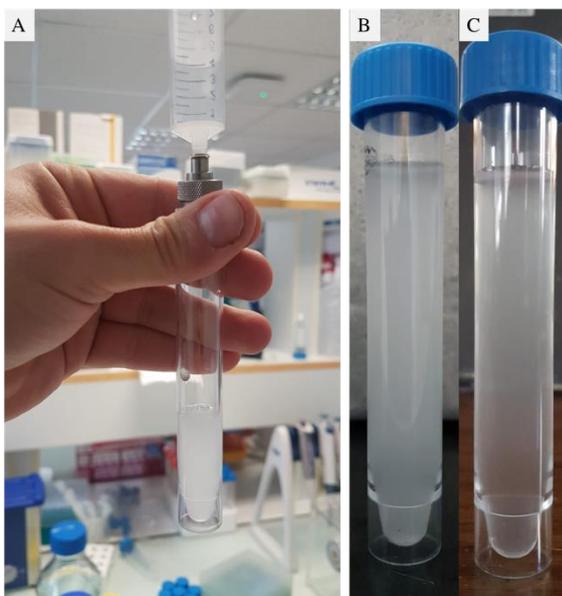


Figura 54: Filtração das ACUs. Em A é possível ver o processo sendo realizado, B e C mostram as ACUs após filtração, B logo após a filtração e C minutos depois.

## 6.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPESSURA DE CÁPSULA

O mapa da curva de retração obtido por AFM indicou um módulo elástico de  $1,55 \pm 0,06$   $\text{kN}\cdot\text{m}^{-1}$  e  $1,96 \pm 0,44$   $\text{kN}\cdot\text{m}^{-1}$  para a PCL45 e PCL10, respectivamente. Estes mesmos valores foram utilizados para o cálculo da espessura da cápsula, como descrito nem MATERIAIS E MÉTODOS, resultando em uma espessura de cápsula estimada de 16 a 20nm para ambas as PCL.

## 6.5 RETROESPALHAMENTO

Obtidas as FFTs das amostras de PCL e controles positivos (celulose) e *phantom* (BRUNETTE et al., 2001; MADSEN; FRANK; DONG, 1998) e negativos (água), pôde-se primeiro observar o comportamento do espectro dos sinais (Figura 55). Assim, percebe-se que o sinal de referência negativo, a água, não produz sinais significativos de retroespalhamento, o que é coerente com este tipo de meio, que não possui qualquer elemento espalhador. Os sinais referentes as amostras são nítidos, coerentes com as frequências de excitação propostas, apresentando aspecto ruidoso e abertura de banda mais larga quanto maior for a frequência de excitação.

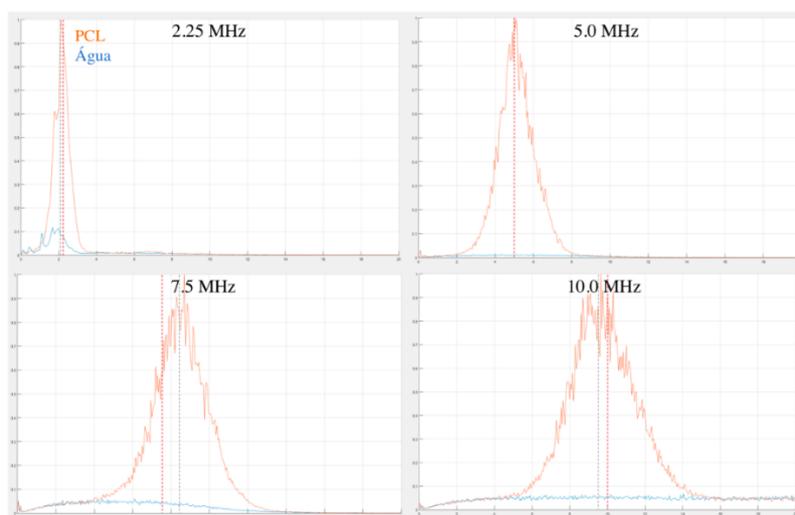


Figura 55: Sinais de FFT típicos de cada frequência avaliada. Em laranja o sinal da PCL e em azul o sinal da água. As linhas vermelhas correspondem ao eixo de cada frequência central de excitação de cada respectivo transdutor utilizado. As linhas cinzas correspondem ao eixo em que o pico da FFT foi localizado.

Em seguida, utilizando curvas polinomiais do tipo Spline ajustadas por interpolação sobre os sinais de FFT (Figura 56), traçou-se as curvas de retroespalhamento das amostras com o aumento de dB em função da frequência, possibilitando, assim, comparar o comportamento de cada amostra de PCL (Figura 57). A Tabela 4 complementa, numericamente, o gráfico apresentado.

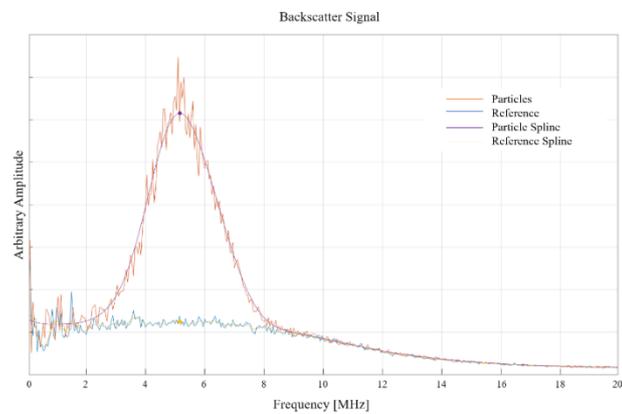


Figura 56: Implementação da curva *Spline* sobre as FFTs. As curvas polinomiais do tipo *Spline* foram ajustadas por interpolação sobre os sinais de FFT, possibilitando comparar o comportamento de cada amostra de PCL sem a interferência do aspecto ruidoso apresentado. Em roxo é apresentada a *spline* para o sinal das PCL e em amarelo para a água. Os pontos indicados nas curvas representam os valores destes em 5MHz, frequência central do transdutor utilizado e representado nesta imagem.

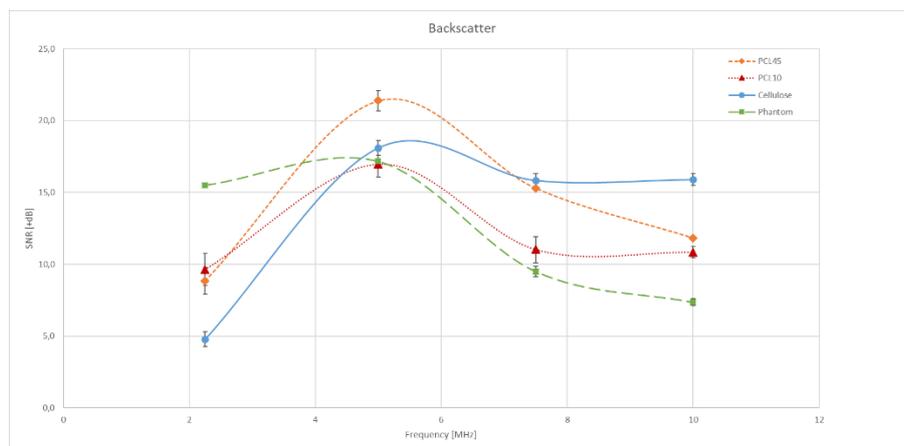


Figura 57: Curva do padrão de retroespalhamento das amostras de PCL. As duas populações de PCL são dispostas, PCL10 e PCL45, vermelho e laranja, respectivamente. Os controles são dispostos em azul para a celulose e verde pra o *phantom*.

Tabela 4 Valores de Retroespalhamento de cada amostra em cada frequência.

Amostra	Backscatter [ + dB]			
	MHz			
	2,25	5,0	7,5	10,0
PCL45	8,84 ± 0,92	21,38 ± 0,70	15,29 ± 0,08	11,82 ± 0,06
PCL10	9,63 ± 1,11	16,97 ± 0,90	11,01 ± 0,90	10,83 ± 0,39
Celulose	4,78 ± 0,51	18,1 ± 0,52	15,83 ± 0,47	15,89 ± 0,41
Phantom	15,36 ± 0,9	17,85 ± 0,09	10,01 ± 0,36	7,62 ± 0,23

Pôde-se perceber que existe uma diferença evidente entre o espalhamento da PCL45 e da PCL10, sobretudo nas frequências superiores a 5MHz. PCL45 também se destaca dos demais por ser o único grupo de ACUs que está superior ao controle positivo, celulose, em todas as frequências até 7,5MHz, se igualando a mesma em 7,5MHz e sendo superada a partir desta. Assim, também, verifica-se que PCL45 possui o maior valor de retroespalhamento, +21,4dB, a 5MHz, sendo superior a celulose em +3,3dB. Contudo, possui o menor valor a 2,25MHz, +4,8dB. O *Phantom* de tecido apresenta a maior intensidade de retroespalhamento a 2,25MHz, +15,4dB, e decai significativamente após os 5MHz, apresentando as menores intensidades de retroespalhamento das séries, +10dB e +7,6dB, respectivamente, provavelmente devido a atenuação característica de tecidos biológicos induzida aqui pelo uso da glicerina (REF).

## 6.6 ESTABILIDADE TEMPORAL

A estabilidade temporal das ACUs foi estudada seguindo o mesmo princípio do retroespalhamento, porém o mesmo foi realizado ao longo do tempo. Todas as amostras foram analisadas no dia da ressuspensão, dia zero, e sete dias após a ressuspensão, dia sete (Figura 58), com a PCL45 sendo também analisada dia por dia (Figura 59). Esses resultados mostram que as ACUs perdem capacidade de retroespalhamento com o tempo, mesmo que a capsula de PCL seja estável por mais de doze meses. A Tabela 5 mostra numericamente que a maior perda da intensidade de retroespalhamento na PCL45 ocorre nas primeiras 24h, com queda de até 9,4dB a 5MHz e 5,9dB a 7,5MHz. Todos os grupos tendem a estabilizar em uma intensidade de retroespalhamento similar no dia 7.

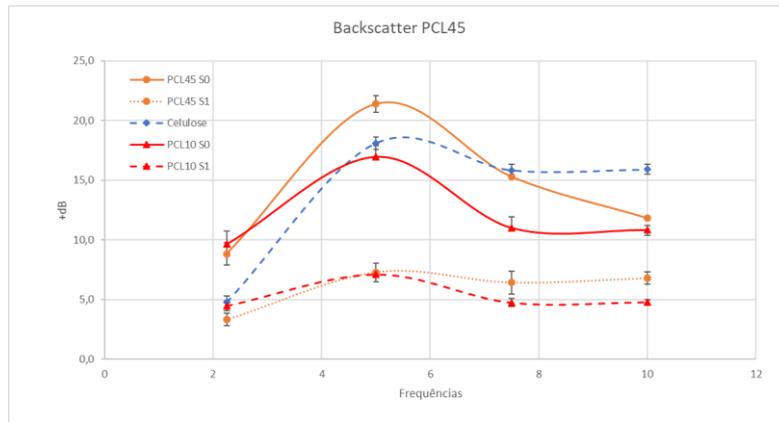


Figura 58: Análise da estabilidade temporal das amostras de PCL no intervalo de uma semana. Em azul pontilhado é apresentada o controle, celulose. Em vermelho é disposta a PCL10, linha cheia no dia zero e pontilhada uma semana. Em laranja é disposta a PCL45, linha cheia no dia zero e pontilhada uma semana.

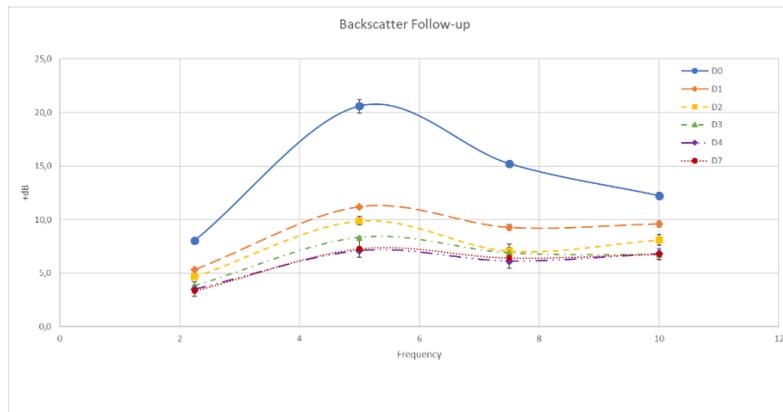


Figura 59: Análise da estabilidade temporal da amostra de PCL45 no intervalo de 7 dias. A linha Azul cheia representa o dia zero da amostra, as linhas pontilhadas os demais dias.

Tabela 5: Valores do retroespalhamento referente a análise de estabilidade das amostras de ACU.

		Acompanhamento Diário do Retroespalhamento em +dB			
Amostra (Dia)		MHz			
		2,25	5,0	7,5	10,0
PCL45	0	8,1 ± 0,1	20,6 ± 0,6	15,2 ± 0,2	12,2 ± 0,3
PCL45	1	5,3 ± 0,1	11,2 ± 0,1	9,3 ± 0,3	9,6 ± 0,3
PCL45	2	4,7 ± 0,1	9,9 ± 0,4	7,1 ± 0,6	8,1 ± 0,5
PCL45	3	3,6 ± 0,4	8,3 ± 0,1	6,9 ± 0,4	6,7 ± 0,4
PCL45	4	3,5 ± 0,7	7,1 ± 0,1	6,1 ± 0,4	6,8 ± 0,4
PCL45	7	3,3 ± 0,5	7,3 ± 0,8	6,4 ± 0,9	6,8 ± 0,5
PCL10	0	9,6 ± 1,1	17,0 ± 0,9	11,0 ± 0,9	10,8 ± 0,4
PCL10	7	4,5 ± 0,4	7,1 ± 0,1	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,2

## 6.7 RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA

Fixados os parâmetros e condições de teste descritos na metodologia, os sinais de cavitação foram coletados e processados gerando gráficos de FFT como os apresentados na Figura 60. Estes gráficos de FFT mostram a componente principal (1,1MHz) do sinal e o correspondente 2º harmônico (2,2MHz), utilizado para compor os gráficos da resposta das ACUs à pressão acústica.

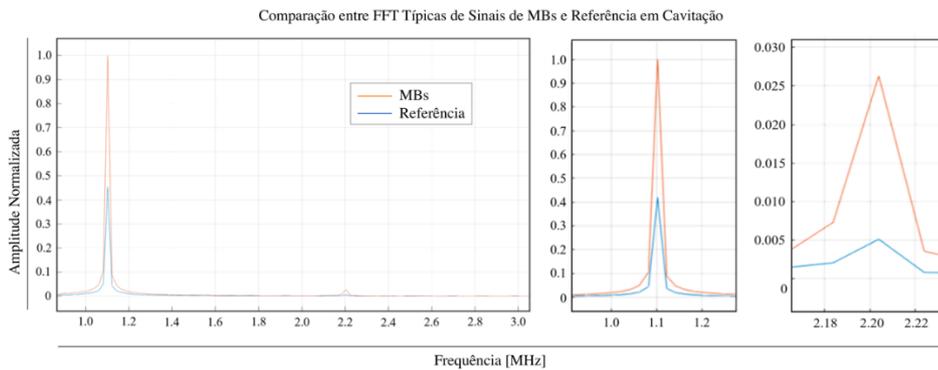


Figura 60: Comparação entre os sinais de FFT das ACUs e da referência. O sinal sobreposto é apresentado na esquerda, nos quadros ao lado são apresentados os sinais destacados do componente principal e do segundo harmônico, respectivamente.

Com os gráficos dos sinais do 2º harmônico da FFT apresentados foi gerada a Tabela 6 e o respectivo gráfico da resposta das ACUs à pressão acústica (Figura 61).

Tabela 6: Valores dos sinais de segundo harmônico das FFTs das amostras de ACU para cada pressão acústica.

		Sinais do 2º Harmônico da FFT [dB]	
		PCL45	PCL10
Setup	I.M.	SNR	SNR
<b>Clínica 1</b>	<b>0,45</b>	5,50 ± 2,62	2,95 ± 1,81
<b>Clínica 2</b>	<b>0,94</b>	5,83 ± 2,75	1,65 ± 1,48
<b>Inter 1</b>	<b>1,27</b>	4,39 ± 2,73	2,19 ± 1,72
<b>Inter 2</b>	<b>1,55</b>	7,67 ± 2,35	3,69 ± 1,43
<b>Limite da Clínica</b>	<b>1,72</b>	14,08 ± 1,75	8,11 ± 0,94
<b>Acima da Clínica</b>	<b>2,12</b>	6,77 ± 3,75	4,24 ± 1,55

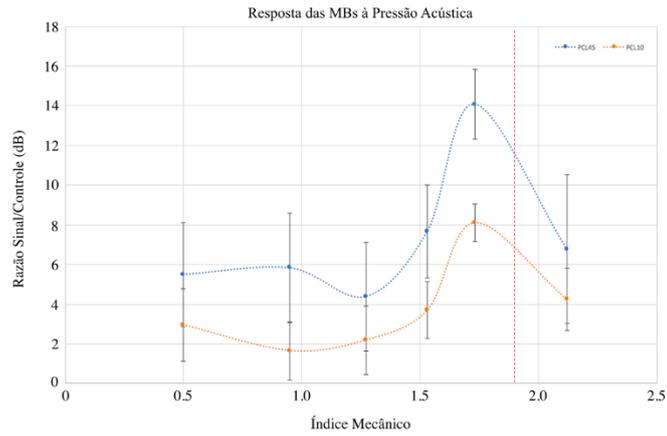


Figura 61: Gráfico da resposta acústica das ACUs em função do I.M. Em azul a PCL45 e em laranja a PCL10.

Deste gráfico é possível perceber que a PCL45 exibe uma resposta à pressão acústica de maior intensidade que a PCL10. Ainda, a pressão que gera o I.M. relativo ao Limite da Clínica, ou seja, um pouco abaixo de 1,9, é a pressão acústica que se destaca das demais, apresentando o maior valor de Razão Sinal/Controle (RSC) para ambas, sendo esses valores, +14,08dB e +8,11dB para PCL45 e PCL10, respectivamente.

## **DISCUSSÃO**

Este capítulo apresenta a discussão de tudo que foi apresentado até aqui, a iniciar pelo porquê da opção de ACUs poliméricas e de PCL dentre todas as opções possíveis e do porquê de não escolher uma ACU comercial já testada e aprovada pela FDA/EUA para desenvolvimento de novos campos de estudo. Em seguida, serão discutidos os resultados da tese, seus benefícios, suas principais limitações e opções de soluções para caminhos futuros.

### **7.1 POR QUE POLIMÉRICA E POR QUE POLICAPROLACTONA?**

Ao falar em ACUs, tende-se a pensar no contraste produzido por estas partículas, melhorando a interpretação de diagnósticos ao evidenciar, destacar, estruturas anatômicas que antes possuíam baixo ou nenhum contraste entre si. Contudo, o maior desafio para estas ACUs era a estabilidade temporal durante a circulação pelo sistema vascular. Uma forma de resolver este problema é com a substituição da capsula por uma polimérica (ODDO et al., 2017; SONG et al., 2018). Contrário a este argumento, as capsulas feitas de polímeros tendem a ser mais rígidas e por consequência, produzir respostas menos significativas ao interagir com as ondas de ultrassom (HELFIELD et al., 2017). Pensando nisso, foi feita a proposta da PCL, que na contramão dos poliésteres alifáticos, possui propriedades elastoméricas mais parecidas com as borrachas (ENGELBERG; KOHN, 1991b), sendo uma característica importante para a produção de ecos e contraste na CEUS (F. DOMENICI et al., 2019). Não demorou para que as equipes de pesquisa percebessem o potencial teranóstico destas capsulas poliméricas, visto que partículas/esferas poliméricas são em geral a opção para esta modalidades terapêuticas (ODDO et al., 2017). Como adjuvante a capacidade teranóstica, a PCL possui baixa velocidade de degradação, em parte devido à forte característica hidrofóbica, sendo uma partícula que pode permanecer no tecido por longos períodos de tempo (MORENO RAJA et al., 2019).

Ainda, cabe colocar que, até o momento, não existe nenhuma ACU polimérica disponível no mercado para comercialização, as empresas que tentaram desenvolver o produto comercialmente não obtiveram aprovação da FDA/EUA e não encontraram um mercado de consumo para o produto, que hoje, tem foco principal em cardiologia, deixando outras áreas da medicina como campos experimentais até aqui (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; OWEN et al., 2018).

Esse conjunto de fatores coloca a ACUs de PCL como promissoras na área, com um longo caminho a ser explorado. Fez parte desta tese contribuir para este desenvolvimento, bem como contribuir para a valorização do mercado brasileiro e dos produtos nacionais, com tecnologia genuinamente brasileira.

## **7.2 PRIMEIRAS ACUs PRODUZIDAS**

Antes de iniciar qualquer teste em ACUs é importante observar se estas estão de acordo com o esperado para os procedimentos propostos, para isso, a observação visual, a olho nu, e por microscopia ótica são fundamentais, estas duas entregam uma resposta rápida sobre o estado das partículas produzidas. Em seguida, a avaliação em MEV, que pode ser mais demorada para obter, é útil para trazer informações a respeito da estrutura morfológica da cápsula, completando a observação inicial das mesmas.

Logo ao resuspender os ACUs dos primeiros grupos em água, evidenciou-se a presença de grumos, formando um aspecto flocular das partículas. Estas deveriam se apresentar diferente, com o aspecto turvo leitoso, e não uma formação em flocos com grumos nítidos em suspensão (BHATTACHARJEE, 2016; CHANAMAI; MCCLEMENTS, 2000).

A análise por microscopia ótica mostrou que as ACUs se encontravam no formato esférico, com tamanhos variados e com forte presença de grumos. Embora esféricas, o que era esperado, a presença de grumos as colocava fora do conforme. Esta desconformidade era esperada pela

observação feita durante a ressuspensão, e portanto, inviável para a continuação dos experimentos.

Contudo, a análise em MEV ainda era importante para obter as informações morfológicas, na tentativa de entender o que podia ter ocorrido e se realmente eram cápsulas como o previsto. A MEV exibiu a presença de cápsulas porosas com a presença de PVA aderido a estas. Não é raro encontrar relatos de PVA aderido às cápsulas poliméricas (ABDELWAHED et al., 2006), sendo isto um motivo para a formação de grumos. Por outro lado, o PVA é uma molécula ideal e fundamental para manter a estabilidade da dispersão A/O/A durante a síntese das ACUs poliméricas e para proteger a estrutura das cápsulas durante o processo de liofilização (MORENO RAJA et al., 2019), sendo inviável retirar o PVA do procedimento por dupla emulsão proposto. Porém, deste ponto, observou-se que era necessário alterar procedimentos na metodologia de dupla emulsão de produção destas.

Por mais que outras técnicas estejam sendo expostas na literatura e mostram-se inovadoras e promissoras, merecendo serem exploradas, na tentativa de superar a limitação da produção de populações de ACUs em tamanhos variados, a técnica de dupla emulsão é reconhecida e um modelo de aplicação comum para poliésteres, que requerem um a evaporação de seu solvente hidrofóbico (MORENO RAJA et al., 2019).

Por mais que novos trabalhos tendam a usar o ethyl acetate no lugar do clorofórmio, este ainda foi a opção para estes estudos, uma vez que a substância permite uma rápida evaporação na fase de evaporação do solvente, resultando na formação dos poros nas cápsulas (NAGAVARMA et al., 2012; YADAV et al., 2019).

### **7.3 NOVA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DAS ACUs**

Como não é possível eliminar o PVA pelo método escolhido de dupla emulsão, optou-se por reduzir a massa molecular do PVA, que passou de 89.000 – 98.000 para 13.000 – 23.000,

elevando a solubilidade do mesmo na água. Com isto, durante a ressuspensão, os grumos são mais facilmente desfeitos e a massa de PVA aderida a parte externa da cápsula é removida mais facilmente (AINA, 2014).

Outro ponto importante para reduzir a formação de grumos recai na forma como as cápsulas são manipuladas para o procedimento de liofilização. Como o passo anterior a esta etapa é a centrifugação, é natural que se ocorra a compactação das cápsulas no fundo do tubo, o que resulta em uma secagem compactada, principalmente em conjunto com o congelamento a  $-60^{\circ}\text{C}$  que pode formar flocos de gelo compactando ainda mais as mesmas, favorecendo a formação de grumos (ABDELWAHED et al., 2006). Neste ponto é fundamental evidenciar o porquê da importância da não retirada por completo do PVA, que atua como uma molécula crioprotetora, evitando a formação dos cristais de gelo neste processo (ABDELWAHED et al., 2006). Portanto, embora o PVA possua características que limitam o desenvolvimento das ACUs, este guarda importância para sua síntese, sendo um ponto crucial de estudo. O PVA pode ser substituído por outros agentes crioprotetores como o dissacarídeo trealose (ABDELWAHED et al., 2006) e pode ser eliminado da síntese das ACUs utilizando técnicas como *premix membrane emulsification* (PME), (LIU et al., 2014; MORENO RAJA et al., 2019).

Como neste trabalho o PVA foi utilizado, e a centrifugação seguida do congelamento para a liofilização foi aplicada, adotou-se um procedimento extra entre a centrifugação e o congelamento. As partículas foram agitadas mecanicamente para que se desprendessem do fundo do tubo de centrifugação e permanecessem mais soltas para o congelamento e liofilização (HOSSAIN et al., 2018).

Estas duas modificações foram a chave para a continuidade do projeto.

#### 7.4 ACUs PRODUZIDAS COM A NOVA ESTRATÉGIA – NOVO GRUPO

Para esta etapa foram produzidas ACUs de acordo com o protocolo apresentado incluindo as alterações propostas da massa molecular do PVA externo e agitação mecânica antes do congelamento para liofilização. As Figuras 48 e 50 exibiram uma foto representativa do produto final obtido após os processos de síntese das cápsulas, com partículas finas em forma de pó e cor branca podendo formar grandes blocos que são facilmente rompidos mecanicamente ou quando expostos ao meio aquoso. Com as modificações, repetiu-se o procedimento de análise inicial das partículas. Ao resuspender, as mesmas já se apresentavam com o aspecto turvo leitoso indicando que existem partículas soltas na ordem de micrômetros em suspensão, diferentemente do Primeiro Grupo.

Todas as cápsulas produzidas aparentavam possuir formato esférico, e ocorreu uma modificação no padrão das ACUs produzidas, de imediato percebeu-se que os novos grupos possuíam grumos menores que os primeiros grupos, estando de acordo com o esperado pelo que foi observado no processo de ressuspensão.

Seguindo o mesmo procedimento anterior, as amostras foram submetidas a MEV, para visualizar a morfologia das cápsulas. Ao comparar os dois grupos, foi possível identificar que o novo grupo apresentava menos PVA aderido as cápsulas de PCL, o que contribui para a melhor ressuspensão destas. Percebe-se, ainda, que elas apresentam um aspecto esférico com algumas irregularidades na superfície. Tais irregularidades são porosidades produzidas durante o processo de secagem do solvente (HOSSAIN et al., 2018).

Após a etapa inicial qualitativa de análise, as cápsulas consideradas aptas à continuidade dos estudos, foram contadas em Câmara de Neubauer, para obter a estimativa da concentração de cápsulas por grama de material obtido<sup>45</sup>. As ACUs produzidas com PCL10 tiveram sua concentração estimada em  $0,84 \cdot 10^{10} \pm 0,14$  ACUs/g. As produzidas com PCL45 tiveram suas

---

<sup>45</sup> Como os grupos iniciais produziram muitos grumos, e, portanto, consideradas inadequadas, não foi possível avaliá-las nesta etapa.

concentrações estimadas em  $1,06 \cdot 10^{10} \pm 0,20$  ACUs/g. A concentração obtida era suficiente para atingir a dose típica prevista como necessária para CEUS, cerca de  $10^8$  ACUs  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> (HYVELIN et al., 2013). Contudo, com base em outros estudos, que alertam para a escolha da dose ideal pensando no menor risco de efeitos colaterais e citotoxicidade, que propõem a concentrações de  $4 \cdot 10^5$  a  $4 \cdot 10^6$  ACUs $\cdot$ ml<sup>-1</sup> (SCIALLERO et al., 2016). Somado com o fato de que as ACUs aqui propostas não são fosfolipídicas, e estudos com ACUs poliméricas à base de PVA utilizaram a concentração de  $1 \cdot 10^6$  ACUs/mL (H. CHEN; D. EVANGELOU; D. GRISHENKOV, 2019); foi utilizado, neste trabalho, a concentração de  $2 \cdot 10^7$  ACUs/mL.

A distribuição do diâmetro médio da população de ACUs apresentou valores de  $6,4 \pm 1,3\mu\text{m}$  no desvio padrão de 50% e  $14,8 \pm 3,7\mu\text{m}$  no desvio padrão de 90%; com diâmetro máximo de  $45\mu\text{m}$ , sendo o ideal para ACUs que estas estejam abaixo de  $10\mu\text{m}$  para que circulem livremente pela luz dos vasos sanguíneos e não causem embolia ou sejam filtradas pelos pulmões (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018), foi nítida a necessidade de impor um limite ao tamanho máximo à população. Como, elas encontravam-se em um tamanho inferior a  $10\mu\text{m}$ , em sua grande maioria, isto pôde ser resolvido com a filtração por um filtro de náilon hidrofílico, uma vez que as cápsulas das partículas em questão, PCL, possuem caráter hidrofóbico.

Assim, o tamanho das partículas somado aos resultados da MEV, mostrando a presença de PVA aderido as cápsulas e os resultados das microscopias óticas revelando a presença de grumos, evidenciou-se ainda mais a necessidade desta filtração, posto que a presença do PVA externo e a formação de grumos modificam as respostas das ACUs ao campo de ultrassom e geram variações espúrias às análises (CHANG et al., 2001; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018)

A primeira filtração resultou em um filtrado translucido com raras ACUs em solução e vistas somente em microscopia ótica, o motivo para este acontecimento foi atribuído a presença do PVA externo ainda aderido as capsulas e ao próprio PVA não dissolvido não solução aquosa, mesmo o PVA sendo um polímero hidrofílico de rápida solubilização (ABDELWAHED et al., 2006; HALIMA, 2016). A solução encontrada para este problema foi adotando um passo a passo de

ressuspensão e filtração descrito nos MÉTODOS desta Tese. Este procedimento permite que o PVA seja solubilizado, liberando as ACUs para filtração, ao mesmo tempo que não produz, teoricamente, interferências significativas nas ACUs de PCL, que contam com um tempo de hidrólise da cápsula de mais de doze meses (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003; SAGANUWAN, 2018) e um tempo de estabilidade total da ACU em solução relativamente longo, 24h para cair pela metade. Esta discussão será melhor trabalhada adiante.

Feito o procedimento de filtração, não é sempre que as ACUs são filtradas da forma esperada. Por vezes ocorre o bloqueio do filtro e a completa filtração das partículas como relatado acima. Contudo o evento é raro e, este procedimento, resulta em um produto final de concentração média de  $1,64 \cdot 10^7 \pm 0,57 \cdot 10^6$  ACU·ml<sup>-1</sup>, com uma taxa de aproveitamento médio de 82%, de acordo com o que pode ser esperado pelos resultados do SLS que mostram 90% da população de ACUs abaixo de 14,8µm de diâmetro.

O processo de filtração por seringa é desaconselhado no meio dos ACUs de fosfolipídios, pois, com a frágil membrana, estes são extremamente sensíveis a pressão, e portanto, a pressão interna na seringa seria suficiente para provocar o rompimento das mesmas, contudo, tal limitação não existe para as feitas de PCL, que suportam este procedimento sem sofrer danos a estrutura (DIZEUX et al., 2016).

## **7.7 AS CARACTERÍSTICAS DO RESTROESPALHAMENTO DAS ACUs**

Percebeu-se que o sinal de referência negativo, o da água, não produziu sinais significativos de retroespalhamento, sendo coerente com o esperado para este meio que não possui elementos espalhadores, sendo o sinal presente, possivelmente, apenas ruído eletrônico. A celulose foi escolhida por atuar como um controle positivo típico apresentado na literatura (BRUNETTE et al., 2001; MADSEN; FRANK; DONG, 1998), mas vale lembrar que diferente das ACUs, é uma partícula sólida e não uma cápsula com ar dentro.

Os sinais das amostras foram nítidos, centrados nas frequências de excitação propostas, apresentando aspecto ruidoso e abertura de banda mais larga quanto maior for a frequência de excitação, esta abertura da banda ocorre por características inerentes aos transdutores (*broadbands*). Para suavizar a curva e obter um sinal de FFT com menos interferência do ruído, foi ajustada uma curva polinomial do tipo Spline por interpolação sobre os sinais de cada FFT (REF).

Como foi dito nos RESULTADOS, percebeu-se que existe uma diferença evidente entre o espalhamento da PCL45 e da PCL10, sobretudo nas frequências superiores a 5MHz. PCL45 também se destaca dos demais por ser o único grupo de ACUs que está superior ao controle positivo, celulose, em todas as frequências até 7,5MHz. Assim, também, verifica-se que PCL45 possui o maior valor de retroespalhamento, +21,4dB, a 5MHz, sendo superior a celulose em +3,3dB. Contudo, possui o menor valor a 2,25MHz, +4,8dB. O *Phantom* de tecido apresenta a maior intensidade de retroespalhamento a 2,25MHz, +15,4dB, e decai significativamente após os 5MHz, apresentando as menores intensidades de retroespalhamento das séries, +10dB e +7,6dB, respectivamente, provavelmente devido a atenuação característica de tecidos biológicos induzida aqui pelo uso da glicerina (REF).

Portanto, a PCL45 tende a responder melhor como contraste em frequências inferiores a 7,5MHz, quando ela mantém um retorno superior à celulose, porém superior a 4,0 MHz, quando cruza com o gráfico do *phantom*. Por outro lado, a PCL10 não mostrou nenhuma região do gráfico em que se destacasse como contraste, estando sempre ou abaixo do *phantom* ou da celulose. Cabe colocar que, mesmo com um retorno inferior à celulose, ambas as PCL são superiores ao *phantom* em frequências acima de 6,0MHz e é o *phantom* quem representa o tecido biológico.

A PCL também produz contraste bem inferior a ACUs fosfolipídicas, que podem alcançar 160dB no primeiro minuto de aplicação e reduzir para 80dB nos primeiros 10 minutos (PARK et al., 2013). Uma disparidade de contraste elevada para um agente de contraste, contudo, como se

esperava, um ACU polimérico não se equipara a um fosfolipídico. Mas possui a vantagem que será discutida no próximo tópico.

### **7.8 AS CARACTERÍSTICAS DE ESTABILIDADE TEMPORAL DAS ACUs**

Como dito, é conhecida a estabilidade do polímero de PCL em meio aquoso, podendo chegar a 12 meses de estabilidade (IQBAL et al., 2015; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017); portanto este não seria o fator limitante dessas ACUs, mas sim a presença dos poros nas cápsulas que permitem a fuga do ar do núcleo da cápsula para o meio externo por difusão (NOVARIO et al., 2005). Com isso, utilizando a mesma metodologia proposta para o retroespalhamento, pode-se verificar a queda acentuada no retorno acústico nas primeiras 24h, caindo progressivamente ao longo da semana, sugerindo que o ar contido nas cápsulas realmente sai por osmose, mas mesmo este processo é dificultado pela presença da cápsula. Com isso, as ACUs poliméricas testadas se apresentam mais estáveis que fosfolipídicas (BARR, 2017; CAVALIERI et al., 2005), com tempo possível de aplicação também superior e com maior possibilidade de serem usadas para técnicas de *drug-delivery* que as fosfolipídicas. Ainda, ACUs não destrutivas, de longa estabilidade, possuem utilidade em testes clínicos com doppler, como por exemplo, estudos de perfusão (LIU et al., 2014).

### **7.9 AS CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA DAS ACUs**

Na maioria dos resultados não foi possível identificar os harmônicos de terceira ou quarta ordem do componente principal do sinal de 1.1MHz, mas todos apresentavam o segundo harmônico (2.2MHz). Cabe colocar, antes de discutir esses resultados, que a escolha da frequência de 1.1MHz se deve a uma configuração pré-existente do equipamento disponível, configuração

essa baseada na literatura que costuma realizar esse tipo de ensaio nessa frequência. Portanto, não foi possível investigar a resposta a pressão acústica para 5.0MHz, frequência de destaque para as a PCL45, ou superior. Ainda, análises nestas frequências seriam interessantes de serem investigadas, uma vez que a maioria dos equipamentos comerciais operam com transdutores de 2,0 a 15,0MHz (CALLIADA et al., 1998).

Dos gráficos formados, todos eles assemelharam-se a um processo de oscilação linear (STRIDE, 2009), comum entre ACUs poliméricas, porém distante de uma cavitação estável esperada e comum a fosfolipídicas. Isso se justifica pelo fato de que cada agente de contraste se comporta de forma particular ao campo de ultrassom, por exemplo, nas poliméricas, a cápsula espessa e rígida tendem a atrapalhar esse processo de oscilação induzida pela pressão acústica. A espessura média de uma cápsula polimérica na literatura é de 100 a 200nm (XIONG et al., 2011), e mesmo com uma espessura calculada para as ACUs aqui produzidas, inferior a este número 16 a 20 nm, ainda assim, apresentou-se como uma barreira para este tipo de evento. Somado a isso, o módulo elástico de  $1,55 \pm 0,06 \text{ kN}\cdot\text{m}^{-1}$  e  $1,96 \pm 0,44 \text{ kN}\cdot\text{m}^{-1}$  para a PCL45 e PCL10, respectivamente, mesmo sendo menor que o encontrado na literatura (ALLEN; KRUSE; FERRARA, 2001) e sabendo que a PCL comporta-se de forma elástica em temperatura ambiente, o que faz desta um polímero mais responsivo a pressão externa (ENGELBERG; KOHN, 1991a), só mostram que a PCL é melhor que um outro polímero, mas não se compara a estrutura de um fosfolipídio.

No entanto, comparando a PCL45 com a PCL10, é possível observar que a PCL45 exibe uma intensidade de pressão acústica superior a PCL10 em todas as análises. Observando o eixo do I.M. percebe-se que o maior valor de intensidade é obtido logo antes de ultrapassar o valor limite para o aceitável em uso clínico, com valores de +14.08 dB e +8.11 dB para PCL45 e PCL10, respectivamente. O motivo para este ocorrido não está claro, e requer testes mais específicos para uma conclusão exata, mas acredita-se que a pressão acústica, somada a fina espessura da cápsula porosa induz a liberação do ar do núcleo da cápsula para o meio externo, deixando este gás livre

para oscilar e entrar em processo de cavitação (SBOROS et al., 2002). Contudo, seriam nBs de ar sem cápsula que seriam destruídos não muito tempo depois de exposto.

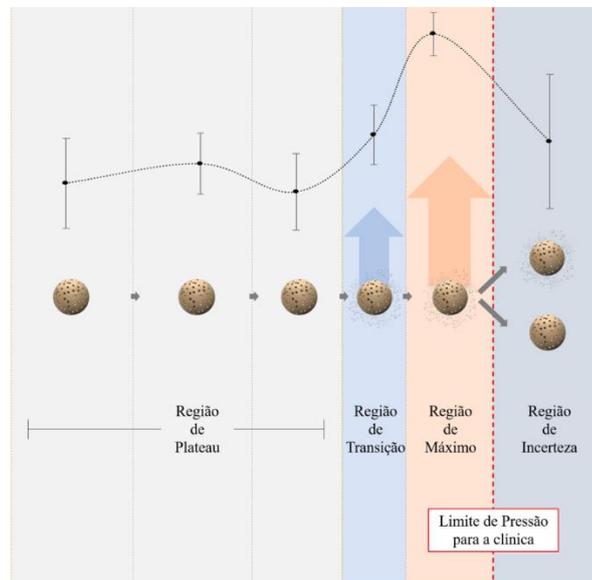


Figura 62: Ilustração descritiva da proposta de ação do campo acústico sobre as ACUs produzidas.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Foram produzidos ACUs de PCL10 e PCL45 porosos destinados à ultrassonografia de contraste. Os feitos com PCL45 mostraram-se superiores aos com PCL10 nessas condições experimentais, visando a aplicação pretendida, uma vez que apresentaram maior retroespalhamento, assim como maior resposta a pressões acústicas permitidas em uso comercial de ACUs. A variação de massa molecular resultou em pequenas variações no módulo elástico, em que a PCL45 teve um comportamento, mais elastomérico e menos quebradiço que a PCL10, que podem ter contribuído para os efeitos observados até aqui.

Nas condições empregadas neste trabalho, as cápsulas de PCL apresentaram um valor de espessura das cápsulas menor do que o encontrado na literatura, o que contribui para uma melhor resposta destas ACUs ao campo de ultrassom, dada a aplicação desejada.

No estágio atual, as partículas de PCL, por serem mais estáveis, podem ser projetadas para experimentos de alta intensidade, como o HIFU, que normalmente exigem a localização de um tecido específico para sua ablação. Para ablação deste tecido utilizando maior intensidade e uma estabilidade maior das partículas. Além disso, a PCL tem propensão a formar misturas compatíveis com uma grande variedade de outros polímeros e pode ser copolimerizada com outros monômeros, o que amplia suas possibilidades de aplicações futuras.

A cada etapa de estudos e pesquisas, este projeto demonstra cada vez mais relevância e equivalência com a pesquisa de países que já dominam tecnologias avançadas, possibilitando ao Brasil em condições de colaboração e parceria com laboratórios de ponta desses países, apresentando uma tecnologia nacional, em parceria internacional. Por exemplo, o Laboratório de Imagens Biomédicas (LIB) é um laboratório de ponta da Universidade Paris 6, pertencente à Universidade de Sorbonne, que mantém vínculo colaborativo com o Laboratório de Ultrassom (LUS) da COPPE/UFRJ e o qual colaborou para os avanços deste projeto.



## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2006 Supplementary Non-Thematic Collection. v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 30 dez. 2006.
- ABE, S. et al. Photophysical characterization of cumarin-doped poly (lactic acid) microparticles and visualization of the biodistribution. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, Electronic Spectroscopy and Structure (ICISS-11). v. 181, n. 2–3, p. 181–185, ago. 2010.
- ABEDALWAGA, M. et al. Mechanical Properties of Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/Polyethylene Terephthalate Composite Prototype Small Diameter Vascular Graft. **Proceedings of 2012 International Forum on Biomedical Textile Materials, Shanghai, China**, p. 132–137, 7 jul. 2012.
- ABOU-ELKACEM, L. et al. Ultrasound Molecular Imaging of the Breast Cancer Neovasculature using Engineered Fibronectin Scaffold Ligands: A Novel Class of Targeted Contrast Ultrasound Agent. **Theranostics**, v. 6, n. 11, p. 1740–1752, 2016.
- AINA, A. Dissolution behavior of poly vinyl alcohol in water and its effect on the physical morphologies of PLGA scaffolds. 1 abr. 2014.
- ALAIN DURAND; JEAN-MARIE ESCANYE. **Physique et Biophysique**. 2<sup>a</sup> ed. Paris: Ellipses, 2013.
- ALLEN, J. S.; KRUSE, D. E.; FERRARA, K. W. Shell waves and acoustic scattering from ultrasound contrast agents. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 48, n. 2, p. 409–418, mar. 2001.
- AMMI, A. Y. et al. Ultrasonic contrast agent shell rupture detected by inertial cavitation and rebound signals. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 53, n. 1, p. 126–136, jan. 2006.
- ANDRÉA C. BERTOLINI. **Biopolymers Technology**. Brasil: Cultura Acadêmica, 2007.
- ANDREW G. SEMENOV. Sound Scattering Laws for Moving Microinhomogeneous Media. **American Journal of Fluid Dynamics**, 2012.
- APFEL, R. E.; HOLLAND, C. K. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 17, n. 2, p. 179–185, 1 jan. 1991.
- ASHOKKUMAR, M. The characterization of acoustic cavitation bubbles – An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, European Society of Sonochemistry (ESS12). v. 18, n. 4, p. 864–872, 1 jul. 2011.
- ASTAFYEVA, K. et al. Perfluorocarbon nanodroplets stabilized by fluorinated surfactants: characterization and potentiality as theranostic agents. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 14, p. 2892–2907, 25 mar. 2015a.
- ASTAFYEVA, K. et al. Properties of theranostic nanoparticles determined in suspension by ultrasonic spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 38, p. 25483–25493, 23 set. 2015b.

- BAHAREH AZIMI et al. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Fiber: An Overview. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 9, n. 3, 2014.
- BARNETT, S. B. et al. International recommendations and guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound in medicine. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 26, n. 3, p. 355–366, mar. 2000.
- BARR, R. G. How to Develop a Contrast-Enhanced Ultrasound Program. **Journal of Ultrasound in Medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine**, v. 36, n. 6, p. 1225–1240, jun. 2017.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 235, p. 337–351, 10 2016.
- BLOCH, M. et al. Multi-modal detection of colon malignancy by NIR-tagged recognition polymers and ultrasound contrast agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 504–516, 30 jan. 2015.
- BOMMER, W. et al. Indicator-dilution curves obtained by photometric analysis of two-dimensional echo-contrast studies. **American Journal of Cardiology**, p. 41:370, 1978.
- BRAYMAN, A. A. et al. Hemolysis of albumex-supplemented, 40% hematocrit human erythrocytes in vitro by 1-MHz pulsed ultrasound: acoustic pressure and pulse length dependence. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 22, n. 7, p. 927–938, 1996.
- BRISMAR, T. B. et al. Magnetite Nanoparticles Can Be Coupled to Microbubbles to Support Multimodal Imaging. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 5, p. 1390–1399, 14 maio 2012.
- BRUNETTE, J. et al. A novel realistic three-layer phantom for intravascular ultrasound imaging. **The International Journal of Cardiovascular Imaging**, v. 17, n. 5, p. 371–381, 1 out. 2001.
- CAI, W. B. et al. The Optimized Fabrication of Nanobubbles as Ultrasound Contrast Agents for Tumor Imaging. **Scientific Reports**, v. 5, 3 set. 2015.
- CALLIADA, F. et al. Ultrasound contrast agents. **European Journal of Radiology**, v. 27, p. S157–S160, 1 maio 1998.
- CAVALIERI, F. et al. Stable Polymeric Microballoons as Multifunctional Device for Biomedical Uses: Synthesis and Characterization. **Langmuir**, v. 21, n. 19, p. 8758–8764, 1 set. 2005.
- CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D. J. Creaming Stability of Flocculated Monodisperse Oil-in-Water Emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 225, n. 1, p. 214–218, 1 maio 2000.
- CHANG, P. P. et al. Thresholds for inertial cavitation in albumex suspensions under pulsed ultrasound conditions. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 48, n. 1, p. 161–170, jan. 2001.
- CHAO-JING, L. et al. **Effect of Molecular Weight of PCL on the Structure and Mechanical Properties of PCL/PET Composite Vascular Scaffold Prototype**. [s.l.: s.n.]. v. 2013

CHEN, M. et al. Contrast-Enhanced Ultrasound to Quantify Perfusion in a Machine-Perfused Pig Liver. **Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference**, v. 2018, p. 3128–3131, jul. 2018.

CHONG, W. K.; PAPADOPOULOU, V.; DAYTON, P. A. Imaging with ultrasound contrast agents: current status and future. **Abdominal Radiology (New York)**, v. 43, n. 4, p. 762–772, abr. 2018.

CONSTANTIN C. COUSSIOS et al. Passively Mapped Cavitation-Enhanced Oncological Drug Delivery using Sub-Micron Gas-Stabilizing Solid Particles. **The 24th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging**, 2019.

CORREAS, J. M. et al. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. **European Radiology**, v. 11, n. 8, p. 1316–1328, 2001.

DAEICHIN, V. et al. **Optimization of ultrasound contrast agent for high frequency ultrasound molecular imaging using subharmonic oscillation**. 2014 IEEE INTERNATIONAL ULTRASONICS SYMPOSIUM (IUS). **Anais...: IEEE International Ultrasonics Symposium.IEEE**, 2014

DANIELSSON, I.; LINDMAN, B. The definition of microemulsion. **Colloids and Surfaces**, v. 3, n. 4, p. 391–392, 1 dez. 1981.

DANTAS, R. G.; COSTA, E. T.; LEEMAN, S. Ultrasound speckle and equivalent scatterers. **Ultrasonics**, v. 43, n. 6, p. 405–420, 1 maio 2005.

D'ARRIGO, J. S.; SIMON, R. H.; HO, S.-Y. Lipid-Coated Uniform Microbubbles for Earlier Sonographic Detection of Brain Tumors. **Journal of Neuroimaging**, v. 1, n. 3, p. 134–139, 1 ago. 1991.

DESAILLY, Y. et al. Contrast enhanced ultrasound by real-time spatiotemporal filtering of ultrafast images. **Physics in Medicine and Biology**, v. 62, n. 1, p. 31–42, dez. 2016.

DIZEUX, A. et al. Reproducibility of Contrast-Enhanced Ultrasound in Mice with Controlled Injection. **Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging**, v. 18, n. 5, p. 651–658, out. 2016.

DONALD R. ASKELAND; WENDELIN J. WRIGHT. **Ciência e engenharia dos materiais**. 3ª ed. Estados Unidos: Cengage Learning, 2014.

DOURY, M. et al. Quantification of tumor perfusion using dynamic contrast-enhanced ultrasound: impact of mathematical modeling. **PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY**, v. 62, n. 3, p. 1113–1125, 7 fev. 2017a.

DOURY, M. et al. Impact of Recirculation in Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound: A Simulation Study. **IRBM, Research in Imaging and Health Technologies 2017 (RITS 2017)**. v. 38, n. 4, p. 179–189, 1 ago. 2017b.

EL-SHERIF, D. M.; WHEATLEY, M. A. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 66A, n. 2, p. 347–355, 1 ago. 2003.

ENDOMETRIOSIS UK. **Endometriosis Facts and Figures | Endometriosis UK**. Disponível em: <<https://www.endometriosis-uk.org/endometriosis-facts-and-figures>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

ENGELBERG, I.; KOHN, J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. **Biomaterials**, v. 12, n. 3, p. 292–304, abr. 1991a.

ENGELBERG, I.; KOHN, J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study. **Biomaterials**, v. 12, n. 3, p. 292–304, 1 abr. 1991b.

ESHRAGHI, S.; DAS, S. Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2467–2476, jul. 2010.

F. DOMENICI et al. Development of new polymeric contrast platforms. **The 24th European symposium on Ultrasound Contrast Imaging**, n. 24, p. 5, 2019.

FAN, C.-H. et al. Folate-conjugated gene-carrying microbubbles with focused ultrasound for concurrent blood-brain barrier opening and local gene delivery. **Biomaterials**, v. 106, p. 46–57, nov. 2016.

FANG YANG et al. Multiple emulsion microbubbles for ultrasound imaging. **Materials Letters**, v. 62, n. 1, p. 121–124, 15 jan. 2008.

FERRARA, K.; POLLARD, R.; BORDEN, M. Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 415–447, 25 jul. 2007.

FISH, P. **Physics and Instrumentation of Diagnostic Medical Ultrasound**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1990. v. 1

FOSTER, F. S. et al. Advances in ultrasound biomicroscopy. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 26, n. 1, p. 1–27, 1 jan. 2000.

FOSTER, F. S. et al. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 28, n. 9, p. 1165–1172, set. 2002.

GUERRA, A. J.; CIURANA, J. 3D-printed bioabsorbable polycaprolactone stent: The effect of process parameters on its physical features. **Materials & Design**, v. 137, n. Supplement C, p. 430–437, 5 jan. 2018.

GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells & Materials**, v. 5, p. 1–16; discussion 16, 20 maio 2003.

H. CHEN; D. EVANGELOU; D. GRISHENKOV. Sequence design for ultrasound imaging of polyvinyl alcohol microbubbles. **24th European symposium on Ultrasound Contrast Imaging**, 2019.

HAASE MOEN, M. Endometriosis, an everlasting challenge. **Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica**, 7 abr. 2017.

HAIM AZHARI. **Basics of biomedical ultrasound for engineers**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. v. 1

- HALIMA, N. B. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. **RSC Advances**, v. 6, n. 46, p. 39823–39832, 20 abr. 2016.
- HASEGAWA, T. et al. Acoustic radiation pressure acting on spherical and cylindrical shells. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 93, n. 1, p. 154–161, 1 jan. 1993.
- HELFIELD, B. L. et al. Mechanistic Insight into Sonoporation with Ultrasound-Stimulated Polymer Microbubbles. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 43, n. 11, p. 2678–2689, 2017.
- HERBERT, E.; BALIBAR, S.; CAUPIN, F. Cavitation pressure in water. **Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 74, n. 4 Pt 1, p. 041603, out. 2006.
- HOSSAIN, K. M. Z. et al. Single Solvent-Based Film Casting Method for the Production of Porous Polymer Films. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 303, n. 4, p. 1700628, 2018.
- HUANG, H. et al. Contrast-enhanced transrectal ultrasound for prediction of prostate cancer aggressiveness: The role of normal peripheral zone time-intensity curves. **Scientific Reports**, v. 6, 8 dez. 2016.
- HUSBY, G. K.; HAUGEN, R. S.; MOEN, M. H. Diagnostic delay in women with pain and endometriosis. **Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica**, v. 82, n. 7, p. 649–653, jul. 2003.
- HYVELIN, J.-M. et al. Use of ultrasound contrast agent microbubbles in preclinical research: recommendations for small animal imaging. **Investigative Radiology**, v. 48, n. 8, p. 570–583, ago. 2013.
- INSERRA, C. et al. Monitoring and control of inertial cavitation activity for enhancing ultrasound transfection: The SonInCaRe project. **IRBM**, v. 35, n. 2, p. 94–99, 1 abr. 2014.
- IQBAL, M. et al. Submicron polycaprolactone particles as a carrier for imaging contrast agent for in vitro applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 488–495, 1 dez. 2015.
- JABLONOWSKI, L. J. et al. Balancing stealth and echogenic properties in an ultrasound contrast agent with drug delivery potential. **Biomaterials**, v. 103, p. 197–206, out. 2016.
- JAFARI, S. et al. High-frequency (20 to 40 MHz) acoustic response of liquid-filled nanocapsules. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 61, n. 1, p. 5–15, jan. 2014.
- KETTERLING, J. A.; MAMOU, J. Sub-harmonic response from polymer-shelled contrast agents with a 40-MHz excitation. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 123, n. 5, p. 3110–3110, 1 maio 2008.
- KIYONO, S. et al. Non-Invasive Diagnosis of Portal Hypertensive Gastropathy: Quantitative Analysis of Microbubble-Induced Stomach Wall Enhancement. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 42, n. 8, p. 1792–1799, ago. 2016.
- KOTHAPALLI, S. V. V. N. et al. Investigation of polymer-shelled microbubble motions in acoustophoresis. **Ultrasonics**, v. 70, p. 275–283, ago. 2016.
- LARS HOFF. **Acoustic Characterization of Contrast Agents for Medical Ultrasound Imaging**. Norway: Springer-science, 2001.

- LEE, H. J.; YOON, Y. I.; BAE, Y. J. Theragnostic ultrasound using microbubbles in the treatment of prostate cancer. **Ultrasonography (Seoul, Korea)**, v. 35, n. 4, p. 309–317, out. 2016.
- LEMOINE, D. et al. Stability study of nanoparticles of poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2191–2197, 1 nov. 1996.
- LIM, K. Y.; KIM, B. C.; YOON, K. J. The Effect of Molecular Weight of Polycaprolactone on the Ester Interchange Reactions during Melt Blending with Poly(ethylene terephthalate). **Polymer Journal**, v. 34, n. 5, p. 313–319, maio 2002.
- LINDSEY, B. D.; ROJAS, J. D.; DAYTON, P. A. On the Relationship Between Microbubble Fragmentation, Deflation and Broadband Superharmonic Signal Production. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 41, n. 6, p. 1711–1725, jun. 2015.
- LIU, B. et al. Fabrication of uniform sized polylactone microcapsules by premix membrane emulsification for ultrasound imaging. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1693–1701, 4 fev. 2014.
- LIZZI, F. L. et al. Relationship of Ultrasonic Spectral Parameters to Features of Tissue Microstructure. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 34, n. 3, p. 319–329, maio 1987.
- MADSEN, E. L.; FRANK, G. R.; DONG, F. Liquid or solid ultrasonically tissue-mimicking materials with very low scatter. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 24, n. 4, p. 535–542, maio 1998.
- MALVERN. **Mastersizer 2000, Integrated System for Particle Sizing**. Malvern Instruments, , 2017. . Acesso em: 16 maio. 2018
- MEHTA, K. S. et al. Vascular applications of contrast-enhanced ultrasound imaging. **Journal of Vascular Surgery**, 5 abr. 2017.
- MELO, C. DA S. et al. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres containing interferon alpha as alternative formulations for the treatment of chronic hepatitis C. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1, p. 51–59, mar. 2012.
- METHACHAN, B.; THANAPPAPASR, K. Polymer-Based Materials in Cancer Treatment: From Therapeutic Carrier and Ultrasound Contrast Agent to Theranostic Applications. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 43, n. 1, p. 69–82, jan. 2017.
- MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, Orthopaedic Polymeric Biomaterials: Basic Aspects of Biodegradables. v. 21, n. 23, p. 2335–2346, 1 dez. 2000.
- MORENO RAJA, M. et al. Chapter 18 - Polymeric Nanomaterials: Methods of Preparation and Characterization. In: MOHAPATRA, S. S. et al. (Eds.). . **Nanocarriers for Drug Delivery**. Micro and Nano Technologies. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 557–653.
- NAGAVARMA, B. V. N. et al. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 16–23, 1 jan. 2012.
- NICOLAAS DE JONG. **Acoustic properties of ultrasound contrast agents**. 1. ed. Proefschrift Rotterdam: Erasmus Universiteit Rotterdam, 1993.

NOVARIO, R. et al. **Accuracy of mechanical index displayed on ultrasound scanners.** Medical Imaging 2005: Ultrasonic Imaging and Signal Processing. **Anais...** In: MEDICAL IMAGING 2005: ULTRASONIC IMAGING AND SIGNAL PROCESSING. International Society for Optics and Photonics, 12 abr. 2005Disponível em: <<https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/5750/0000/Accuracy-of-mechanical-index-displayed-on-ultrasound-scanners/10.1117/12.593713.short>>. Acesso em: 5 dez. 2018

ODDO, L. et al. Next generation ultrasound platforms for theranostics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 491, p. 151–160, 1 abr. 2017.

ONJI, K. et al. Microvascular structure and perfusion imaging of colon cancer by means of contrast-enhanced ultrasonography. **Abdominal Imaging**, v. 37, n. 2, p. 297–303, abr. 2012.

OWEN, J. et al. A versatile method for the preparation of particle-loaded microbubbles for multimodality imaging and targeted drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, n. 2, p. 342–356, 2018.

PAEFGEN, V.; DOLESCHER, D.; KIESSLING, F. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 15 set. 2015.

PARK, J. et al. Synthesis of Laboratory Ultrasound Contrast Agents. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 13078–13095, 21 out. 2013.

PATTANASHETTI, N. A.; HEGGANAVAR, G. B.; KARIDURAGANAVAR, M. Y. Smart Biopolymers and their Biomedical Applications. **Procedia Manufacturing**, International Conference on Sustainable and Intelligent Manufacturing, RESIM 2016, 14-17 December 2016, Leiria, Portugal. v. 12, p. 263–279, 1 jan. 2017.

PETER NEIL TEMPLE WELLS. **Biomedical Ultrasonics**. England: Academic Press Inc. London, 1977.

PISANI, E. et al. Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging. **Advanced Functional Materials**, v. 18, n. 19, p. 2963–2971, 9 out. 2008.

PRENTICE, A. Endometriosis. **BMJ : British Medical Journal**, v. 323, n. 7304, p. 93–95, 14 jul. 2001.

RAGAERT, K. et al. **Bulk Mechanical Properties of Thermoplastic PCL**. 11 set. 2014

REIS, F. M. D.; MONTEIRO, C. DE S.; CARNEIRO, M. M. Biomarkers of Pelvic Endometriosis. **Revista Brasileira De Ginecologia E Obstetricia: Revista Da Federacao Brasileira Das Sociedades De Ginecologia E Obstetricia**, v. 39, n. 3, p. 91–93, mar. 2017.

ROJAS, J. D.; DAYTON, P. A. Vaporization Detection Imaging: A Technique for Imaging Low-Boiling-Point Phase-Change Contrast Agents with a High Depth of Penetration and Contrast-to-Tissue Ratio. **Ultrasound in Medicine & Biology**, 25 out. 2018.

SAGANUWAN, S. A. Biomedical Application of Polymers: A Case Study of Non-CNS Drugs Becoming CNS Acting Drugs. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 32–38, 26 jan. 2018.

- SANNA, V. et al. Development of polymeric microbubbles targeted to prostate-specific membrane antigen as prototype of novel ultrasound contrast agents. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 748–757, 6 jun. 2011.
- SBOROS, V. et al. Understanding the limitations of ultrasonic backscatter measurements from microbubble populations. **Physics in Medicine and Biology**, v. 47, n. 23, p. 4287–4299, 7 dez. 2002.
- SCIALLERO, C. et al. Magnetic resonance and ultrasound contrast imaging of polymer-shelled microbubbles loaded with iron oxide nanoparticles. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 8, 3 ago. 2016.
- SEBASTIAN KOLZENBURG; MICHAEL MASKOS; OSKAR NUYKEN. **Polymer Chemistry**. Germany: Spriger, 2017.
- ŞEN, T.; TÜFEKÇIOĞLU, O.; KOZA, Y. Mechanical index. **Anatolian Journal of Cardiology**, v. 15, n. 4, p. 334–336, abr. 2015.
- SHANKAR, P. M.; KRISHNA, P. D.; NEWHOUSE, V. L. Advantages of Subharmonic Over Second Harmonic Backscatter for Contrast-To-Tissue Echo Enhancement. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 24, n. 3, p. 395–399, 1 mar. 1998.
- SHAPIRO, M. G. et al. Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters. **Nature Nanotechnology**, v. 9, n. 4, p. 311–316, abr. 2014.
- SHEERAN, P. S. et al. Decafluorobutane as a phase-change contrast agent for low-energy extravascular ultrasonic imaging. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 37, n. 9, p. 1518–1530, set. 2011.
- SHEN, C.-C.; CHOU, Y.-H.; LI, P.-C. Pulse Inversion Techniques in Ultrasonic Nonlinear Imaging. **Journal of Medical Ultrasound**, v. 13, n. 1, p. 3–17, 1 jan. 2005.
- SHI, W. T. et al. Destruction of contrast microbubbles and the association with inertial cavitation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 26, n. 6, p. 1009–1019, 1 jul. 2000.
- SHRIKI, J. Ultrasound Physics. **Critical Care Clinics**, v. 30, n. 1, p. 1–24, 1 jan. 2014.
- SIRSI, S. et al. Effect of Microbubble Size on Fundamental Mode High Frequency Ultrasound Imaging in Mice. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 36, n. 6, p. 935–948, jun. 2010.
- SONG, R. et al. Controllable Formation of Monodisperse Polymer Microbubbles as Ultrasound Contrast Agents. **ACS applied materials & interfaces**, v. 10, n. 17, p. 14312–14320, 2 maio 2018.
- STAUDINGER, H. Über Polymerisation. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 53, n. 6, p. 1073–1085, 12 jun. 1920.
- STRIDE, E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. **Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)**, v. 27 Suppl 2, p. 1–13, 2009.
- STRIDE, E.; SAFFARI, N. Investigating the significance of multiple scattering in ultrasound contrast agent particle populations. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 52, n. 12, p. 2332–2345, dez. 2005.

- TALU, E. et al. Tailoring the Size Distribution of Ultrasound Contrast Agents: Possible Method for Improving Sensitivity in Molecular Imaging. **Molecular Imaging**, v. 6, n. 6, p. 7290.2007.00034, 1 nov. 2007.
- TUBA, F.; OLÁH, P.; NAGY, P. Towards the understanding of the molecular weight dependence of essential work of fracture in semi-crystalline polymers: A study on poly( $\epsilon$ -caprolactone). v. 8, 1 set. 2014.
- ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. **Journal of polymer science. Part B, Polymer physics**, v. 49, n. 12, p. 832–864, 15 jun. 2011.
- VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R. et al. Biocompatibility and degradation of poly(ether–ester) microspheres: in vitro and in vivo evaluation. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4719–4729, 1 dez. 2002.
- VERSLUIS, M. et al. Ultrasound Contrast Agent Modeling: A Review. **Ultrasound in Medicine & Biology**, 13 jun. 2020.
- WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 1 out. 2010.
- WOODWARD, S. C. et al. The intracellular degradation of poly(epsilon-caprolactone). **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 19, n. 4, p. 437–444, abr. 1985.
- XIONG, X. et al. Polymeric microbubbles for ultrasonic molecular imaging and targeted therapeutics. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, v. 22, n. 4–6, p. 417–428, 2011.
- XU, J. et al. Combination of Microbubbles and Diagnostic Ultrasound at a High Mechanical Index for the Synergistic Microwave Ablation of Tumours. **International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group**, p. 1–25, 20 out. 2016.
- YADAV, H. K. S. et al. Chapter 17 - Polymer-Based Nanomaterials for Drug-Delivery Carriers. In: MOHAPATRA, S. S. et al. (Eds.). **Nanocarriers for Drug Delivery**. Micro and Nano Technologies. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 531–556.
- YANG, F. et al. Nanoparticle-shelled Microbubbles Used for Medical Ultrasound Nonlinear Imaging. **Physics Procedia**, Proceedings of the 2015 ICU International Congress on Ultrasonics, Metz, France. v. 70, p. 1074–1078, 1 jan. 2015.
- YANG SUN et al. A Novel Therapeutic Strategy using Ultrasound Mediated Microbubbles Destruction to Treat Colon Cancer in a Mouse Model. **The 24th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging**, 2019.
- YU, M. H. et al. Therapeutic Effects of Microbubbles Added to Combined High-Intensity Focused Ultrasound and Chemotherapy in a Pancreatic Cancer Xenograft Model. **Korean Journal of Radiology**, v. 17, n. 5, p. 779–788, out. 2016.