



OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROBOLHAS COM CÁPSULAS DE
POLICAPROLACTONA EM ULTRASSOM VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

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
Agosto de 2020

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROBOLHAS COM CÁPSULAS DE
POLICAPROLACTONA EM ULTRASSOM VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Lucas Lobianco De Matheo

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

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antonio von Krüger

Avaliada e aprovada por: Prof. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Prof. Roberto Macoto Ichinose

Dra. Flavia Fernandes Ferreira da Silva

Prof. Marcos Lopes Dias

Prof. Antônio Adilton Oliveira Carneiro

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

AGOSTO DE 2020

De Matheo, Lucas Lobianco

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

XII, 100 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. 92 - 100.

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.)

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROBOLHAS COM CÁPSULAS DE
POLICAPROLACTONA EM ULTRASSOM VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Lucas Lobianco De Matheo

Agosto/2020

Orientadores: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antonio von Krüger

Programa: Engenharia Biomédica

O objetivo deste trabalho foi avaliar duas cápsulas porosas de policaprolactona (PCL) de diferentes massas moleculares, aplicadas como agentes de contraste de ultrassom (ACUs). As propriedades comparadas foram composição da cápsula, estabilidade, compressibilidade, resposta à pressão acústica e retroespalhamento. A resposta acústica de ACUs porosos produzidos com duas massas moleculares, 10.000 e 45.000 mg/mol de cápsulas PCL, foi comparada pela primeira vez, avaliando os sinais de retroespalhamento, a estabilidade temporal e a resposta ao aumento das intensidades de pressão acústica. A variação do peso molecular resultou em pequenas variações no módulo elástico, em que o PCL45 teve um comportamento mais elastomérico do que o PCL10. Os ACUs PCL10 e PCL45 porosos apresentaram maior estabilidade do que as ACUs fosfolipídicas e cápsulas mais finas que as poliméricas (16 a 26 nm). Os ACUs com PCL45 mostraram-se mais versáteis aos com PCL10, por apresentarem maior retroespalhamento em diversas frequências, bem como maior resposta às diferentes pressões acústicas permitidas no uso clínico. A PCL foi considerada uma candidata para formar cápsulas de ACUs na categoria de polímero. Ambas as cápsulas de PCL têm potencial para aplicações biomédicas, tanto para ultrassom de contraste quanto para tratamentos HIFU. No último, há dois usos possíveis: aumentar o contraste da imagem de um tecido específico usando ultrassom e fazer a ablação da área usando uma intensidade mais alta. Além disso, a PCL é compatível com uma ampla variedade de outros polímeros e pode ser copolimerizada com outros monômeros, o que expande suas possibilidades para aplicações futuras.

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

OBTANTION AND CHARACTERIZATION OF POLYCAPROLACTONE CAPSULES
MICROBUBBLES WITH ULTRASOUND FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Lucas Lobianco De Matheo

August/2020

Advisors: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira

Marco Antonio von Krüger

Department: Biomedical Engineering

The objective of this work is to assess two polycaprolactone (PCL) porous capsules of different molecular masses applied as ultrasound contrast agents (UCAs). The compared features are capsule composition, stability, compressibility, ultrasonic cavitation, and ultrasonic backscattering. The acoustic response of porous UCAs produced with two molecular masses, 10,000 and 45,000 mg/mol of PCL capsules, is compared for the first time, by evaluating the backscatter signals, the temporal stability, and the response to increasing acoustic pressure intensities. The variation in molecular weight resulted in small variations in the elastic module, in which PCL45 had a more elastomeric behavior than PCL10. Porous PCL10 and PCL45 UCAs presented greater stability than phospholipid UCAs and thinner capsule thickness than polymeric ones (16 to 26 nm). UCAs with PCL45 proved to be superior to those with PCL10, since they showed greater backscattering in a variety of frequencies, as well as greater response to diferente acoustic pressures allowed in clinical use of UCAs. PCL is than considered a candidate for UCAs capsules in the polymer category. Both PCL capsules have potential for biomedical applications, either for contrast ultrasound as well as for HIFU treatments. In the latter, there are two possible uses, raise image contrast of a specific tissue using ultrasound, and ablate the area using higher intensity. Also, PCL is compatible with a wide variety of other polymers and can be copolymerized with other monomers, which expands its possibilities for future applications.

Sumário

LISTA DE TABELAS	xii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 POLÍMEROS	6
3.2 BIOPOLÍMEROS	8
3.3 BIOPOLÍMEROS EM APLICAÇÕES MÉDICAS – VISÃO GERAL	9
3.4 TIPOS DE AGENTES DE CONTRASTE ULTRASSONICOS	10
3.5 POLI(ϵ -CAPROLACTONA)	19
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
4.1 ULTRASSOM.....	22
4.2 ULTRASSONOGRAFIA.....	29
4.5 FREQUÊNCIA DE REPETIÇÃO DE PULSO - PRF e CICLO DE TRABALHO – <i>DUTY CYCLE</i>	32
4.6 CAVITAÇÃO	34
4.7 MODO CONTRASTE EM ULTRASSONOGRAFIA - CEUS	39
MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 POLI(ÁLCOOL VINÍLICO), <i>POLYVINYL ALCOHOL</i> – PVA.....	42

5.2 POLICAPROLACTONA, <i>POLYCAPROLACTONE</i> – PCL	42
5.3 FORMAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	43
5.4 ANÁLISE PRELIMINAR DOS ACUs E CONTAGEM POR CÂMARA DE NEUBAUER	44
5.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	46
5.6 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO	47
5.7 PREPARO E FILTRAGEM DAS AMOSTRAS.....	47
5.8 PROPRIEDADE MECÂNICA	48
5.9 ESTIMATIVA DA ESPESSURA DAS CÁPSULAS	51
5.9 AVALIAÇÃO DO RETROESPALHAMENTO - ULTRASSOM EM MODO PULSO- ECO.....	52
5.10 ESTABILIDADE TEMPORAL DOS ACUs – ESTAS PERDEM VIABILIDADE QUANDO EXPOSTAS A ÁGUA?	58
5.11 ANÁLISE DE RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA	58
RESULTADOS.....	65
6.1 OS PRIMEIROS GRUPO DE ACUs.....	65
6.2 OS NOVOS GRUPOS DE ACUs.....	68
6.3 FILTRAGEM DOS ACUs	70
6.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPESSURA DE CÁPSULA	72
6.5 RETROESPALHAMENTO.....	72

6.6 ESTABILIDADE TEMPORAL	74
6.7 RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA	76
DISCUSSÃO	78
7.1 POR QUE POLIMÉRICA E POR QUE POLICAPROLACTONA?	78
7.2 PRIMEIROS ACUs PRODUZIDOS	79
7.3 NOVA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DOS ACUs	81
7.4 ACUs PRODUZIDOS COM A NOVA ESTRATÉGIA – NOVO GRUPO	82
7.7 AS CARACTERÍSTICAS DO RESTROESPALHAMENTO DOS ACUs	85
7.8 AS CARACTERÍSTICAS DE ESTABILIDADE TEMPORAL DOS ACUs.....	87
7.9 AS CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA DOS ACUs	88
CONCLUSÃO	91

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Os ACUs e suas aplicações.</i>	2
<i>Figura 2: Monômero, mero e polímero.</i>	7
<i>Figura 3: Cronologia da tecnologia relacionada aos ACUs.</i>	15
<i>Figura 4: Linha do tempo do surgimento dos principais ACUs comerciais.</i>	17
<i>Figura 5: Apresentação física da PCL.</i>	20
<i>Figura 6: Representação da estrutura do mero da policaprolactona</i>	20
<i>Figura 7: Reflexão da onda de ultrassom ao atingir uma interface com impedâncias diferentes.</i>	24
<i>Figura 8: Esquema da atenuação de uma onda de ultrassom em um meio.</i>	25
<i>Figura 9: Espalhamento do ultrassom diante de partículas.</i>	27
<i>Figura 10: Speckle, ou interferências coerentes.</i>	28
<i>Figura 11: Trade-off entre resolução e penetração.</i>	28
<i>Figura 12: Esquema de sinais dos ecos de retorno, após interação de um único disparo com refletores</i>	30
<i>Figura 13: Representação do modo-B.</i>	31
<i>Figura 14: A evolução da tecnologia de ultrassonografia.</i>	32
<i>Figura 15: Ciclo de Trabalho, Duty Cycle.</i>	33
<i>Figura 16 Curva ilustrativa da pressão em função do tempo.</i>	36
<i>Figura 17: Comportamento de uma microbolha interagindo com uma onda de ultrassom.</i>	37
<i>Figura 18: Resumo das aplicações Terapêuticas e Diagnósticas dos ACUs.</i>	40
<i>Figura 19: Resumo das fases e dos métodos a serem empregados no projeto.</i>	42
<i>Figura 20: Foto da bancada de trabalho para a produção dos ACUs.</i>	44
<i>Figura 21: Câmara de Neubauer.</i>	46
<i>Figura 22: Esquema para filtragem dos ACUs.</i>	48
<i>Figura 23: Imagem de um microscópio de força atômica JPK.</i>	49
<i>Figura 24: Processo de análise de uma região por AFM.</i>	50
<i>Figura 25: Curva de Força da AFM.</i>	50
<i>Figura 26: Equipamentos utilizados na configuração experimental para as análises de pulso-eco.</i>	52
<i>Figura 27: Configuração experimental para as análises de pulso-eco.</i>	53

<i>Figura 28: Ilustração da configuração experimental proposta para a análise dos ACUs.</i>	55
<i>Figura 29: Estimando o posicionamento da janela de observação do sinal.</i>	56
<i>Figura 30: Os módulos da FFT dos cem sinais.</i>	57
<i>Figura 31: Espectros médios dos sinais de retroespalhamento dos ACUs de PCL10 e PCL45.</i>	57
<i>Figura 32: Equipamentos utilizados para as análises da resposta à pressão acústica.</i>	60
<i>Figura 33: Configuração experimental para as análises da resposta à pressão acústica.</i>	61
<i>Figura 34: Abordagem experimental proposta para a análise da resposta à pressão acústica.</i>	62
<i>Figura 35: Interface GUI do programa escrito em Matlab®. Imagem de autoria própria.</i>	64
<i>Figura 36: Fotografia dos Primeiros Grupos de ACUs poliméricos.</i>	65
<i>Figura 37: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200.</i>	66
<i>Figura 38: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa dos ACU.</i>	66
<i>Figura 39: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.</i>	67
<i>Figura 40: Imagens dos novos grupos de ACUs.</i>	68
<i>Figura 41: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200.</i>	68
<i>Figura 42: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa dos ACUs.</i>	69
<i>Figura 43: Curva da distribuição do tamanho dos ACUs referente a PCL45 (A) e PCL10 (B).</i>	70
<i>Figura 44: Filtragem dos ACUs.</i>	71
<i>Figura 45: Sinais de módulo da FFT típicos de cada frequência avaliada.</i>	72
<i>Figura 46: Padrão de retroespalhamento das amostras de PCL.</i>	73
<i>Figura 47: Análise da estabilidade temporal das amostras de PCL no intervalo de uma semana .</i>	75
<i>Figura 48: Análise da estabilidade temporal da amostra de PCL45 no intervalo de 7 dias.</i>	75
<i>Figura 49: Comparação entre os sinais de FFT dos ACUs e da referência.</i>	76
<i>Figura 50: Gráfico da resposta acústica dos ACUs, em função do I.M.</i>	77
<i>Figura 51: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa dos ACUs</i>	85
<i>Figura 52: Comparação entre perfis de gráficos de FFT de sinais de respostas à pressão acústica.</i>	89
<i>Figura 58: Ilustração descritiva da proposta de ação do campo acústico sobre os ACUs produzidos.</i>	90

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: ACUs comerciais e algumas de suas características.</i>	17
<i>Tabela 2: Comparação entre as três principais categorias de agentes de contraste.</i>	18
<i>Tabela 3: Esquema Experimental para a análise da Resposta à Pressão Acústica.</i>	63
<i>Tabela 4 Valores de Retroespalhamento de cada amostra em cada frequência.</i>	73
<i>Tabela 5: Valores do retroespalhamento referentes à análise de estabilidade das amostras de ACUs.</i>	76
<i>Tabela 6: Valores dos sinais de segundo harmônico das FFTs para cada pressão acústica.</i>	77

INTRODUÇÃO

A ultrassonografia de contraste (CEUS), com aplicação de Agentes de Contraste para Ultrassom (ACUs) é uma importante e relativamente 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 os ACUs para estudos de perfusão e também 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), lesões uterinas benignas, com uso associado de ultrassom focalizado de alta intensidade (HIFU) (CHENG et al., 2015), 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).

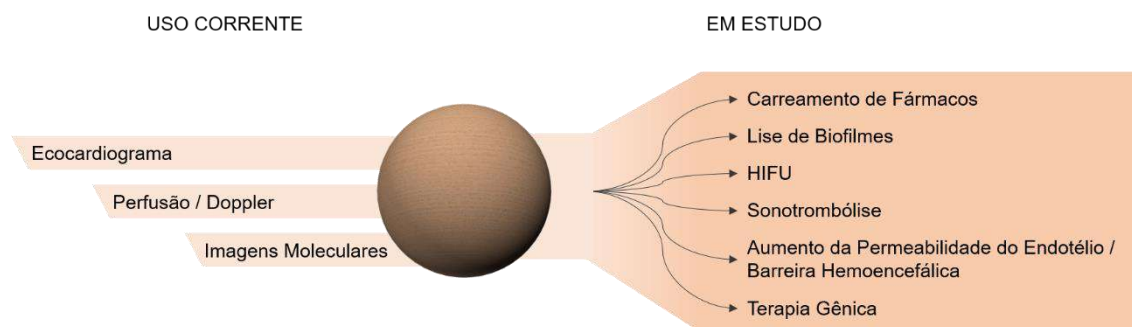


Figura 1: Os ACUs e suas aplicações. Os ACUs comerciais são usados principalmente para o setor de cardiologia e na realização de estudos de perfusão. Com as diferentes possibilidades de uso, os ACUs estão em testes para diversos outros procedimentos, mas ainda sem autorização de uso pelos órgãos reguladores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

No mercado e nos laboratórios de pesquisa encontram-se vários tipos de ACUs, que possuem características diferentes, dependendo do material que as constitui e do modo de fabricação empregado, que leva a alterações morfológicas. 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 dos ACUs, como, tamanho, uniformidade, composição da cápsula, 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)¹, entre outras. Como o uso de ACUs comerciais permite que poucas alterações estruturais nas cápsulas sejam realizadas, são necessárias novas abordagens que permitam a síntese de ACUs, viabilizando estudos sistematizados sobre os fatores listados. Estes fatores influenciam nos comportamentos dos ACUs quando expostos ao campo de ultrassom e isto é de suma importância para os avanços do conhecimento na área de ultrassonografia de contraste.

¹ 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 dos 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 os 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), traz mais detalhes sobre o polímero.

Tratando de economia e números mercadológicos, 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 é o que mais se espera crescer na Taxa de Crescimento Anual Composta - 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 aspectos científicos e mercadológicos apresentados, mostra-se evidente a conveniência de investimento na área de contrastes para ultrassom.

OBJETIVOS

Este projeto visa produzir e caracterizar agentes de contraste com cápsulas porosas e poliméricas à base de PCL destinados a aplicações biomédicas, com vista a elucidar aspectos importantes destes ACUs em sua interação com o ultrassom, obtendo cápsulas que possam, futuramente, sofrer alterações estruturais de acordo com os objetivos pretendidos.

Foram objetivos específicos, desenvolver, caracterizar e comparar as microcápsulas de PCL de 10.000 e 45.000g/mol de massa molecular, com poros quanto à:

- (1) morfologia e estrutura da cápsula;
- (2) intensidade do sinal retroespalhado com excitação Pulso-Eco;
- (3) estabilidade temporal; e
- (4) resposta à pressão acústica (Cavitação).

REVISÃO DA LITERATURA

3.1 POLÍMEROS

Dentre as áreas da química, a ciência de polímeros pode ser considerada um campo relativamente 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, referem-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).

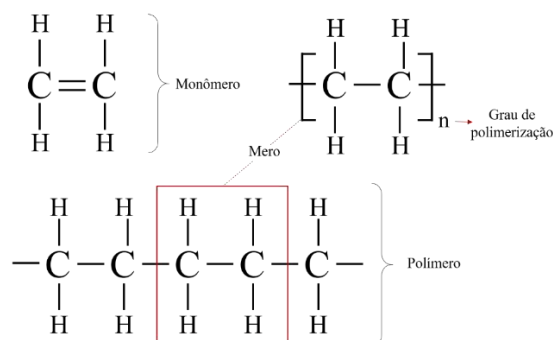


Figura 2: Monômero, mero e polímero. Representações plana do monômero de etileno, polímero de polietileno e seu respectivo mero. Este modelo serve de base para o entendimento futuro da policaprolactona. Imagem de autoria própria.

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 macromoléculas². 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 características 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

² 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 é 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, torná-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 plásticos³ 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

³ 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 produzido 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. Sendo fundamental que apresentem boa interação com o tecido biológico (biocompatibilidade) e, também, em alguns casos, 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 médica, pois apresentam todas as características listadas acima. O processo de eliminação desta categoria de polímeros ocorre, em geral, pela hidrólise das ligações éster⁴, resultando nos

⁴ 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).

terminais carboxila e hidroxila e facilitando, então, sua eliminação (ANDRÉA C. BERTOLINI, 2007)⁵. Como mencionado, a policaprolactona não é um biopolímero, porém esta possui as mesmas características descritas acima, mas 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 para terapia gênica e de engenharia tecidual (PATTANASHETTI; HEGGANAVAR; KARIDURAGANAVAR, 2017).

3.4 TIPOS DE AGENTES DE CONTRASTE ULTRASSONICOS

A tecnologia referente aos ACUs vem progredindo ao longo dos anos. Inicialmente, as bolhas eram gases, sem qualquer membrana, cápsula, ou outras 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 era provocado pela presença de microbolhas na região de observação e estudos na área de ultrassonografia de contraste foram iniciados⁶ (NICOLAAS DE JONG, 1993; OWEN et al., 2018) visando a utilização desse artefato. Algum tempo depois, percebendo a limitação de estabilidade temporal dos gases utilizados, grupos de pesquisa começaram a testar outros gases

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

⁶ Os ACUs foram gerados por ação indireta do fármaco, não sendo ele um tipo de contraste para ultrassonografia.

menos susceptíveis à dissolução no sangue, como o nitrogênio, hexafluoreto de enxofre, perfluorocarbono, entre outros (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; D'ARRIGO; SIMON; HO, 1991). A técnica se mostraria cada vez mais útil, porém limitada pelo tempo em que as bolhas permaneciam em circulação. 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.* apresentaram 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 Alunex[®] foi apresentada. Portanto, foi em 1984 que o primeiro ACU comercial foi apresentado, contendo uma cápsula formada pela proteína sanguínea albumina e o núcleo de ar (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; OWEN *et al.*, 2018). Alunex[®] é, consequentemente, um ACU de primeira geração, caracterizado por uma cápsula rígida e núcleo de ar (NOVARIO *et al.*, 2005). O foco principal dos ACUs era inicialmente dedicado à cardiologia, devido ao fato de que nesta época, tanto as próprias tecnologias em ACUs eram limitadas⁷, como equipamentos de ultrassonografia também. Não demoraria para que grupos de pesquisa percebessem que a aplicação poderia ir além da cardiologia e o monitoramento de perfusão seria o segundo passo provável. Com o aumento do interesse pela tecnologia, partir de 1984 surgiram trabalhos sugerindo novos tipos de ACUs *home-made*, feitos em laboratório. Em 1991, Simon *et al.* mostraram um novo grupo de ACUs feito com cápsula lipídica (D'ARRIGO; SIMON; HO, 1991). Estas cápsulas seriam um avanço no campo de estudo e representariam o que seria denominada de segunda geração de ACUs, com cápsulas flexíveis e núcleo de gás denso com baixa difusão (NOVARIO *et al.*, 2005). Ainda em 1991, outros grupos de pesquisa mostraram que tumores podiam ser estudados com esta técnica (APFEL;

⁷ Um fator que era entendido como limitante aos ACUs, 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 ACU que não fosse para cardiologia até o ano de 2016. Lembrando que o uso de ACUs já era regulamentado em outros países (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018)

HOLLAND, 1991; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018)⁸, e que existia 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 ainda era um fator limitante, devido à pouca estabilidade das bolhas. Em 1994, Fritysch *et al.* propuseram uma cápsula de um material rígido, o polímero sintético cianoacrilato, elevando a estabilidade dos ACUs para mais de 10 min no corpo humano, dando origem ao campo de estudo dos contrastes para ultrassom com 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[®] (Schering AG, Berlin, Alemanha) e POINT Biomedical (California, EUA).

Embora alguns autores apresentem uma terceira ou mesmo quarta geração de ACUs, estas classificações são teóricas, pois, até o presente momento, não existe nenhum ACU aprovado pela FDA/EUA que não pertença à primeira ou à 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. Logo, é de se esperar que existam, atualmente, diversos grupos de pesquisa no tema, e, portanto, uma elevada variedade de possibilidades, caminhos possíveis, a serem desenvolvidos. Tornando-se, assim, impraticável tentar seguir uma linha cronológica linear da literatura científica produzida. Contudo, alguns fatos importantes serão mencionados aqui. Com os ACUs capazes de carrear fármacos, entende-se, assim, que os ACUs não mais funcionam apenas para diagnóstico, mas também para teranóstica. Neste ínterim, grupos de pesquisa começaram a modificar as estruturas das

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

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 o histórico dos ACUs, há um elevado investimento em nanobolhas (nBs) capazes de permear tecidos biológicos e aderir a camadas mais internas (CAI et al., 2015). Estas não se limitam à circulação sanguínea, como no caso das microbolhas - MBs, e beneficiam-se do efeito EPR – *Enhanced Permeability and Retention*, causado pelo aumento dos espaços endoteliais durante processos de neovascularização e inflamação, que atingem de 200 a 600 nm, extravasando os vasos sanguíneos e retendo-se no espaço endotelial do tecido lesionado (SHEERAN et al., 2011). Essas estruturas nBs, no entanto, possuem menos contraste entre os tecidos alvos e o seu arredor, se comparadas com as MBs, pois nBs estão fora da faixa de tamanho ideal para entrar em ressonância com o ultrassom de clínico (1 - 7 μ m), não produzindo harmônicos das frequências de uso comum (2-15 MHz) (CALLIADA et al., 1998). Outro grupo investe nas nBs produzidas por microrganismos, como forma de obter um produto final homogêneo com maior resposta à ultrassonografia (SHAPIRO et al., 2014), tais grupos fazem uso de frequências mais elevadas, até 60 MHz (FOSTER et al., 2000) o que inclui as biomicroscopias ultrassônicas de alta frequência, que podem ser utilizadas para interagir com nBs⁹ (DAEICHIN et al., 2014; FOSTER et al., 2002; JAFARI et al., 2014; SIRSI et al., 2010). Ainda, surgindo recentemente, grupos buscam produzir contraste com nano-gotas, capazes de sofrerem vaporização ao interagir com o campo de ultrassom (ROJAS; DAYTON, 2018). Em pesquisa, portanto, pode-se apresentar uma faixa de frequências utilizadas em ultrassonografia, no alcance de 1 MHz a 45 MHz (JABLONOWSKI et al., 2016), podendo chegar a 60 MHz quando o objetivo é avaliar nBs.

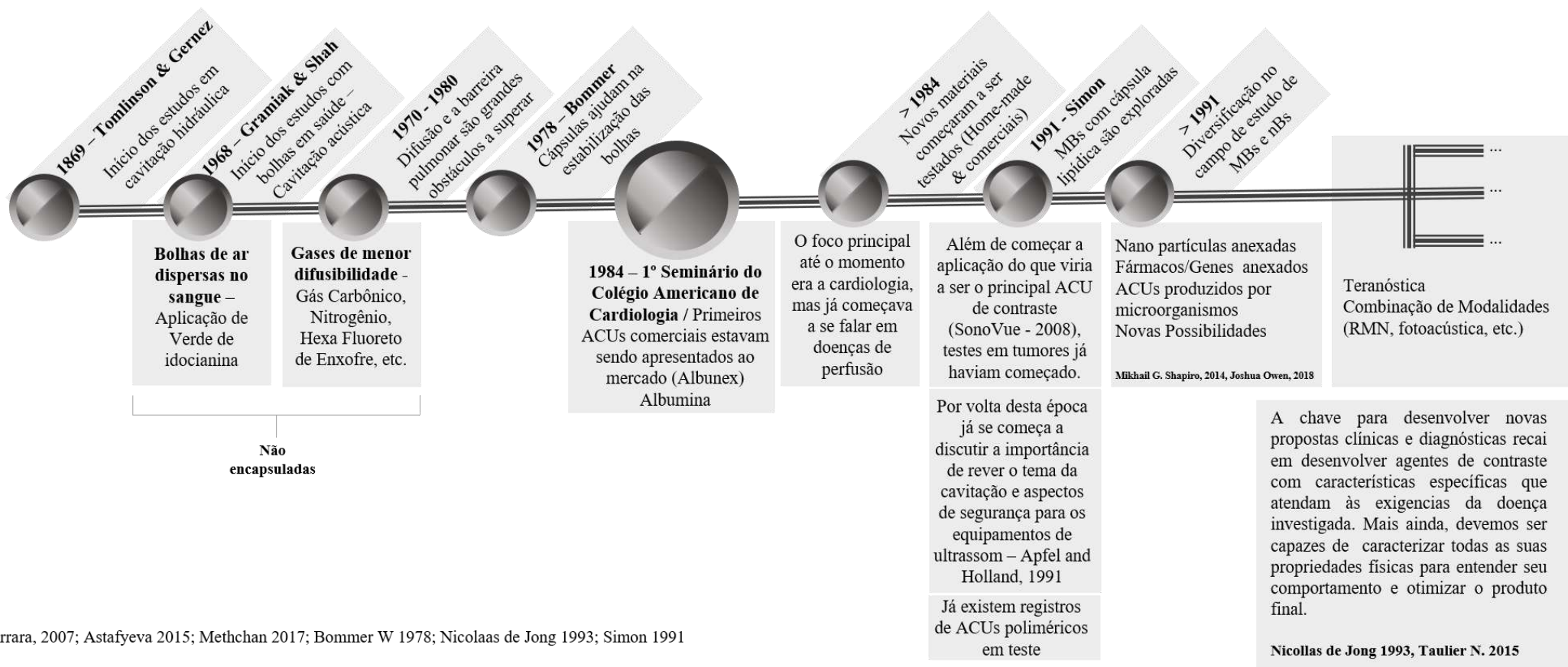
⁹ Cabe ressaltar que o aumento da frequência eleva a resolução das imagens adquiridas, porém compromete a penetração do feixe de ultrassom, limitando-se a regiões superficiais como as camadas epiteliais.

Ainda com foco no tratamento, alguns grupos aplicam os ACUs associados à técnica de HIFU¹⁰, que se beneficia dos ACUs para localizar o tecido alvo e gerar danos maiores e mais concentrados ao tecido lesionado, aproveitando-se da cavitação que ocorre no local de disparo do ultrassom (CHENG et al., 2015; CORREAS et al., 2001; KOVATCHEVA et al., 2015).

Outros grupos buscam desenvolver cápsulas modificadas, como por exemplo, contendo nanopartículas de óxido de ferro, permitindo que os ACUs sejam utilizados 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 o da ultrassonografia. Perceberam também que o efeito observado no 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. 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⁻¹ (SCIALLERO et al., 2016).

Um ponto importante 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, deve-se ser capazes de caracterizar 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* (2018). A Figura 3 esquematiza a evolução das ACUs.

¹⁰ Técnica utilizada para ablação de tecidos lesionados, campo da estética, entre outros.



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

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

Até aqui foram apresentadas as principais variedades existentes de ACUs. Sendo que alguns estão disponíveis para comercialização, enquanto outros 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 e, no Canadá, Europa e Ásia, para usos fora da cardiologia, desde o início dos anos 2000. O Definity® (Lantheus Medical Imaging), existente no mercado mundial desde 2001, que é utilizado para cardiologia e perfusão do ventrículo esquerdo, é um outro ACU bem difundido e bastante estudado no meio científico (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). Dentre os ACUs poliméricos, encontrava-se o POINT Biomedical (EUA)¹¹. 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 os poliméricos; ou seja, resultando em maior contraste de imagem. Porém, os poliméricos destacam-se por sua potencialidade em sofrer alterações químicas, que os tornam ideais para sofrerem alterações estruturais e por suas propriedades mecânicas, mais adequadas para transporte de fármacos do que os ACUs com cápsulas de lipídio e fosfolipídios e por serem mais estáveis, uma vez que cápsulas poliméricas resistem mais à dissolução e à pressão acústica do que as lipídicas ou proteicas, além de terem maior densidade que o ar e baixa solubilidade em água (PISANI et al., 2008; ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Mais

¹¹ A empresa encontra-se com status de falência.

uma vez, cabe lembrar 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. Portanto, tanto poliméricas quanto fosfolipídicas tem seu papel de importância em suas utilizações.

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 listados todos os ACUs comerciais existentes.

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

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

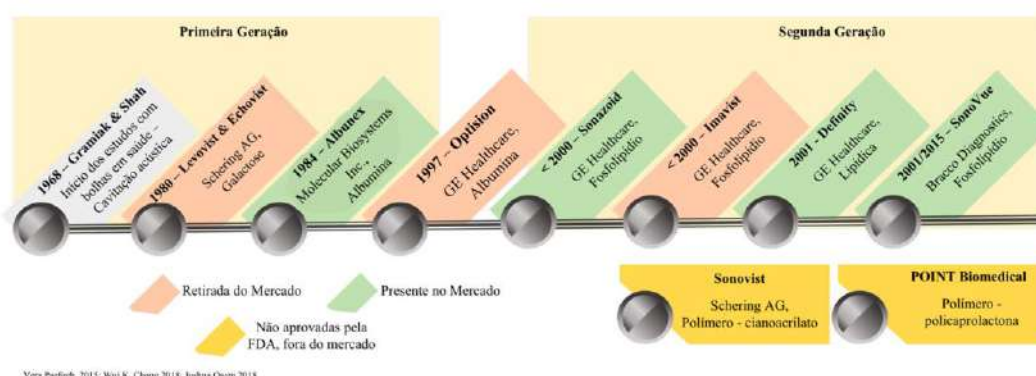


Figura 4: Linha do tempo do surgimento dos principais ACUs comerciais. Imagem de autoria própria.

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, foram de 0,006%, com casos

raros de relatos mais graves como hipotensão, broncoespasmos, urticária e prurido. Portanto, os efeitos colaterais 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. Assim, como contraindicação pela FDA/EUA há 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 para 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).

Proteína (Albumina)	(Fosfo)lipídeos	Polímeros
-	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(ϵ -CAPROLACTONA)

A poli(ϵ -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)¹² (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⁻¹, o que favorece seu uso como biopolímero de degradação lenta¹³ (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 completa da PCL de peso molecular de 50.000g/mol pode variar de 1 a 4 anos¹⁴, tendo com média 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 de 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 flexão é apresentado com o valor de 0,4GPa

¹² 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.

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

¹⁴ 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).

e o alongamento na ruptura de 300 a 500%¹⁵ (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003; MIDDLETON; TIPTON, 2000). Esta característica elastomérica da PCL é importante para proporcionar maior estabilidade e ecogenicidade dos ACUs (F. DOMENICI et al., 2019)¹⁶ 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.

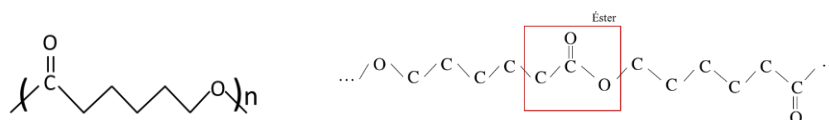


Figura 6: Representação em bastão da estrutura do mero da policaprolactona e ao lado uma parte da cadeia polimérica construída pela ligação éster entre os meros. Imagem de autoria própria.

¹⁵ 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.

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

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 físicoquímicas e de suas propriedades mecânicas. Por consequência, essas alterações afetam suas características de solubilidade, propriedades iônicas, padrões e tempo de degradação, entre outras. Assim, 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 o 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 de duas formas: por compressão e rarefação (chamadas ondas longitudinais) ou por cisalhamento (chamadas ondas transversais). Essa propagação ocorre através de um meio capaz de reagir elasticamente e transmitir a energia vibratória emitida¹⁷. Quando a frequência desta onda é superior a 20 kHz, recebe o nome de ultrassom (ALAIN DURAND; JEAN-MARIE ESCANYE, 2013; FISH, 1990). Nesse trabalho apenas ondas longitudinais serão tratadas. Neste tópico serão apresentados alguns conceitos de física de propagação acústica, que formam a base dos estudos de ultrassom.

VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO

A velocidade de propagação da onda (c) depende do comprimento de onda (λ) e da frequência desta (ν), dada pela Equação 1.

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

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

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

em que K_s é o coeficiente de rigidez e ρ é a densidade do meio. Portanto, quanto mais rígido¹⁸ e menos denso¹⁹ for o meio, mais rapidamente as ondas se propagam.

¹⁷ Portanto uma onda mecânica, diferentemente de uma eletromagnética, não se propaga no vácuo.

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

¹⁹ A velocidade de transmissão diminui à medida que a massa das partículas aumenta.

IMPEDÂNCIA ACÚSTICA

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

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

sendo P_0 a pressão máxima e U_0 a velocidade máxima 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 ao espalhamento do feixe de ultrassom.

REFLEXÃO

A ultrassonografia convencional é baseada na técnica de pulso-eco. A amplitude do eco, por sua vez, depende da diferença de impedância entre os meios. Pode-se definir um Coeficiente de Reflexão (R) conforme a Equação 5:

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

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

O aumento da reflexão pode ser induzido no tecido pela administração de contrastes, favorecendo diagnósticos que necessitem destacar a região do tecido alvo. Com por exemplo, um conjunto de agentes 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 voltaria ao emissor, produzindo ecos de maior amplitude, quando comparado os ecos sem a presença ACUs. A Figura 7 ilustra este processo.

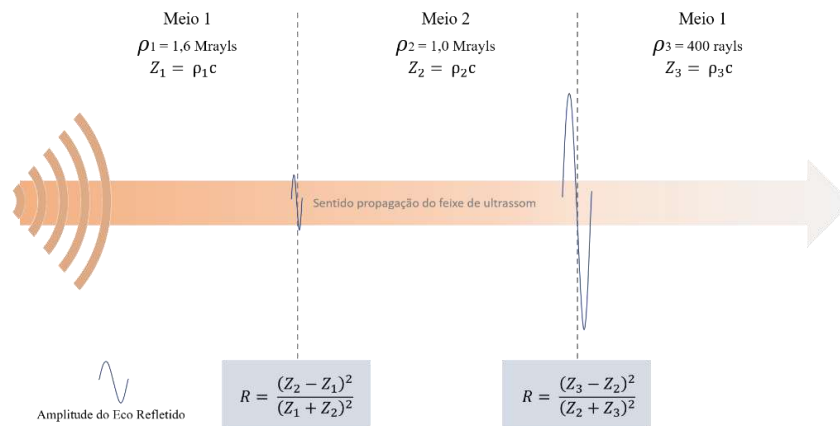


Figura 7: Reflexão da onda de ultrassom incidente ao atingir uma interface de meios com impedâncias diferentes. A reflexão é maior quando a diferença de impedância também é maior entre os meios. Imagem de autoria própria.

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 reflexão²⁰, 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.

²⁰ 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.

ESPALHAMENTO

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 de ultrassom é convertida em calor. Já o espalhamento ocorre quando as partículas do meio são da ordem de grandeza do comprimento de onda incidente e, ao serem atingidas, passam a vibrar, emitindo energia em todas as direções. Em suma, a atenuação caracteriza-se pela redução na amplitude do eco da onda de ultrassom que retorna à face do transdutor, durante a passagem por um meio, sendo que cada material atenua as ondas em graus variados e crescentes com a frequência aplicada (FISH, 1990). A Figura 8 ilustra este processo.

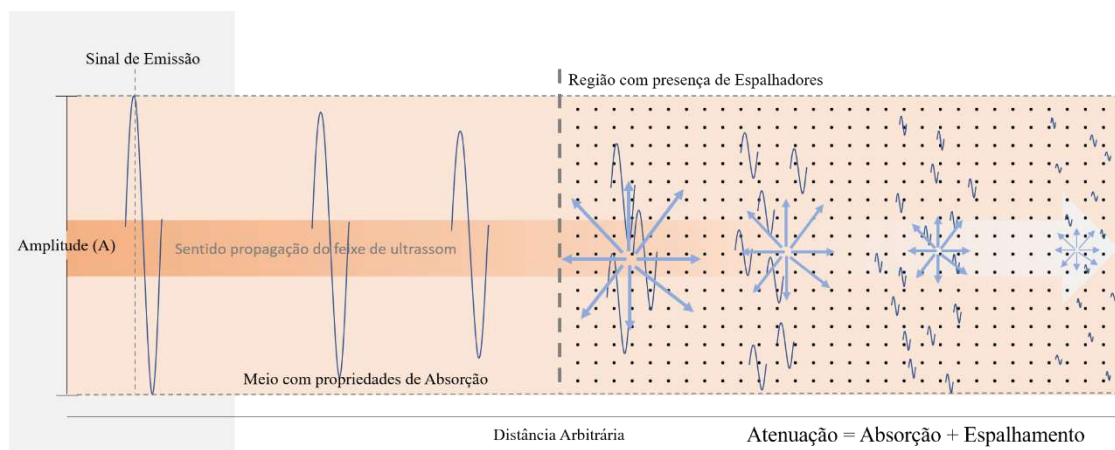


Figura 8: Esquema da atenuação de uma onda de ultrassom em um meio. A primeira parte do meio não possui material espalhador, apenas propriedades absorptivas. A segunda parte possui material espalhador, portanto ocorrem tanto o espalhamento quanto a absorção. As partículas atingidas pelas ondas passam a vibrar, espalhando a energia recebida. A intensidade do sinal é representada pela amplitude da onda em azul. Imagem de autoria própria.

Aqui, no entanto, o espalhamento é o foco, pois quanto maior for a concentração de materiais espalhadores (ACUs) em uma região, maior poderá ser o retorno acústico²¹ (retroespalhamento - *backscatter*). Assim, com a presença dos ACUs, os ecos locais de uma dada região retornam em

²¹ 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), do tamanho destas, da forma, da densidade da partícula e do meio, e como já dito, da atenuação da onda de ultrassom ao longo do trajeto (HAIM AZHARI, 2010; HASEGAWA et al., 1993).

padrões diferentes, elevando o contraste, quando comparados aos ecos recebidos quando na ausência dos ACUs²² (FERRARA; POLLARD; BORDEN, 2007; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Neste ponto, importante acrescentar que o espalhamento contribui basicamente para o aspecto granulado (*speckle*) em imagens modo-B (FISH, 1990).

ACUs, quando em suspensão, encontram-se em concentrações de 10^6 a 10^9 partículas por mililitros. Além disso, como os diâmetros das partículas são menores que o comprimento de onda, essa condição é favorável ao espalhamento 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 eco retroespalhado captado pelo transdutor 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, o efeito observado não é fruto da 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 9 ilustra este fenômeno.

²² 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.

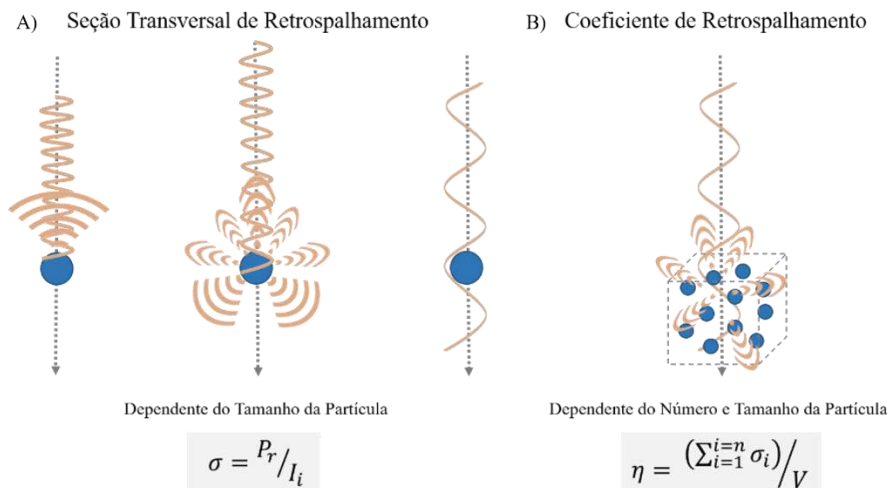


Figura 9: Espalhamento do ultrassom diante de partículas. Comportamento teórico do espalhamento para uma única partícula (A) e o comportamento teórico do espalhamento diante de partículas dispersas em um volume (B). Seção Transversal de Retrospalhamento (σ) em que P_r - Potência retroespalhada e I_i - Intensidade incidente. O Coeficiente de Retrospalhamento (η) está em função do número de Seções Transversais de Retrospalhamento (σ_i) e da distribuição do tamanho das partículas. V - Volume. Imagem de autoria própria.

A estas interferências coerentes provocadas pelo somatório de duas ou mais ondas de um sinal espalhado, dá-se o nome, em ultrassonografia, de *speckle*, que por vezes é classificado como ruído de sinal ou como importantes atributos de imagem em exames clínicos, sendo usado para diferenciar um tecido normal de um anormal. Portanto, alvo de estudos durante anos (DANTAS; COSTA; LEEMAN, 2005; LIZZI et al., 1987; SHRIKI, 2014) (Figura 10). 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. As técnicas que envolvem ACUs são uma alternativa para solucionar essas limitações (DANTAS; COSTA; LEEMAN, 2005).

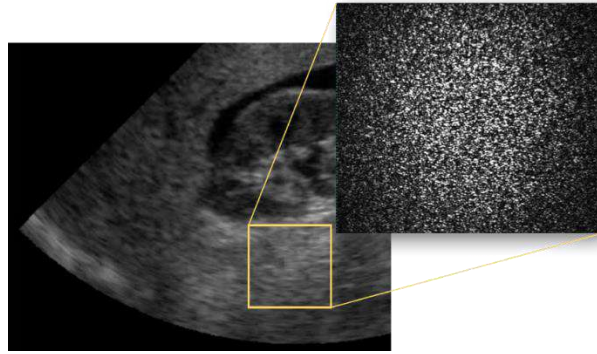


Figura 10: Speckle, ou interferências coerentes, comuns em imagens ultrassonográficas e originárias do fenômeno de espalhamento e interferência entre ondas no meio de propagação. Imagem de autoria própria.

Uma outra forma de melhorar a resolução das 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 à atenuação (FISH, 1990). Com isso, cabe ao clínico ou pesquisador, escolher a melhor frequência, os transdutores, parâmetros, modos e técnicas com as quais vai trabalhar (DESAILLY et al., 2016; SHRIKI, 2014) (Figura 11). Ainda em relação à frequência, ACUs são capazes de gerar harmônicos de suas frequências de excitação, assim sendo, quanto maior a frequência utilizada, menores 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.

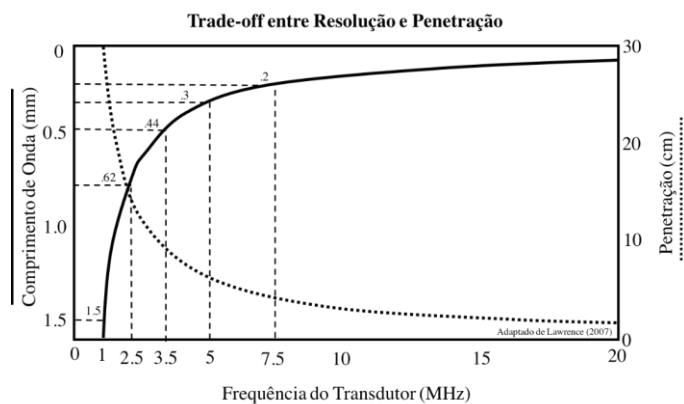


Figura 11: *Trade-off* entre resolução e penetração. Quanto maior a resolução obtida com o aumento de frequência menor a profundidade alcançada.

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 de imagens diagnósticas, a ultrassonografia é considerada de custo baixo, não invasiva, portátil, passível de aplicação em tempo real, fácil de focalizar, permite tratamentos personalizados, sem efeitos colaterais e com radiação não ionizante (DIZEUX et al., 2016; FANG YANG et al., 2008; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017).

A base desta modalidade consiste em obter os sinais refletidos nas interfaces e os retroespalhados pelos meios. Um grupo de elementos piezoelétricos²³ é eletricamente excitado, gerando um feixe que se propaga ao longo do meio e emite ecos e se espalha. Os ecos refletidos e retroespalhados são captados de volta pelo conjunto de elementos piezoelétricos ao longo do tempo. Assim, assume-se a velocidade média de propagação em tecidos moles²⁴ de $1540 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 12) e os ecos são localizados a partir da multiplicação dessa velocidade pelos tempos de chegada respectivos. Com o sinal obtido e processado é gerada uma linha de imagem.

²³ 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).

²⁴ 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.

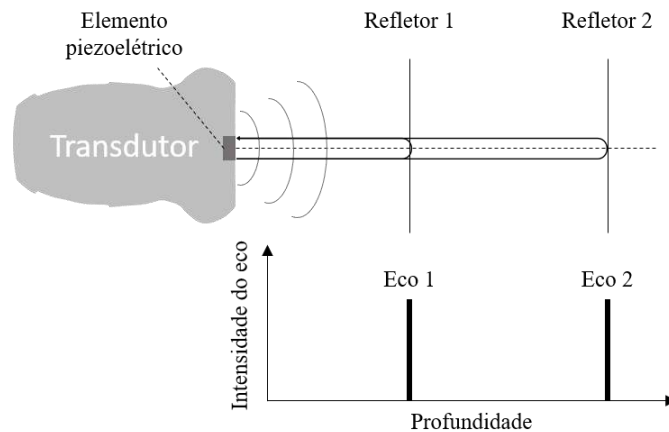


Figura 12: Esquema de sinais dos ecos de retorno, após interação de um único disparo com refletores em um meio sem atenuação. Um único elemento piezoelétrico do transdutor é retratado neste esquema, o que torna este esquema semelhante ao que ocorre no ultrassom modo-A. Ao emitir o sinal mecânico, a onda 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. Imagem de autoria própria.

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, linha por linha. Quanto maior a amplitude do sinal, mais próximo ao valor máximo da escala de cinza esta imagem será representada (FISH, 1990; HAIM AZHARI, 2010; LARS HOFF, 2001) .

Este processo é realizado para todos os elementos piezoelétricos do transdutor do equipamento, que são dispostos em *Arrays*. Assim, é possível formar uma sequência de sinais convertidos em escala de cinza e dispostos lado a lado, formando uma imagem proporcional aos padrões temporais e de amplitude dos ecos obtidos. A isso, é dado o nome de imagem ultrassonográfica modo-B. A Figura 13 ilustra este processo, bem como mostra algumas limitações da técnica que serão levantadas logo à frente.

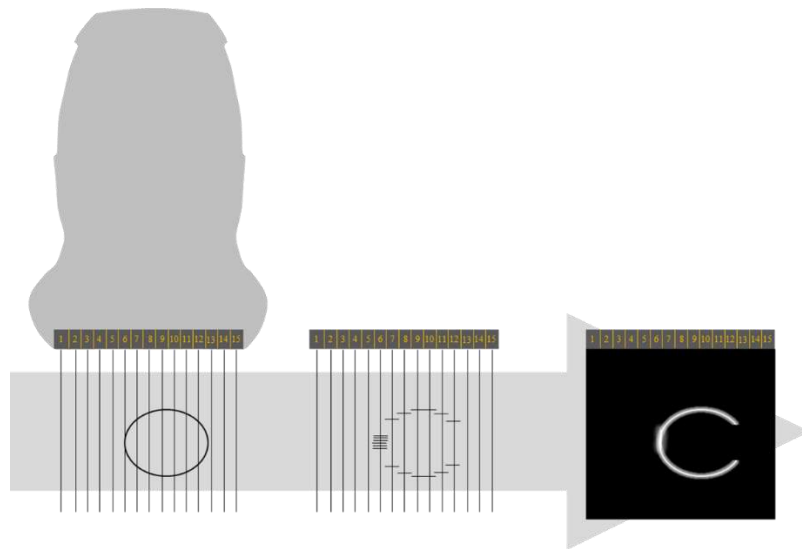


Figura 13: Representação do modo-B. Nesta representação, foram dispostos 15 elementos piezoelétricos em sequência. Cada elemento funciona como descrito nas duas figuras anteriores. Ao serem colocados em *Array*, a imagem ganha forma. Contudo, pode-se observar que a técnica possui alguns limites de resolução. Imagem de autoria própria.

Na Figura 14 há imagens ultrassonográficas de um coração, usadas aqui como ilustração, procurando mostrar as limitações de contraste e resolução, bem como a formação da imagem modo-B em linhas de corte bem definidas e espaçadas (imagem à esquerda). A imagem da esquerda é um dos primeiros registros feitos, na história da ultrassonografia, por Douglass Howry, em 1951. Os avanços tecnológicos da ultrassonografia permitiram uma melhora considerável nas imagens (direita), contudo, ainda há questões referentes à baixa resolução e quanto à capacidade de distinção de interfaces entre dois tecidos moles. Isto ocorre pela baixa diferença de impedância entre os tecidos²⁵, o que diminui a intensidade do eco que retorna ao transdutor vindo dessa interface (FISH, 1990; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). Neste ponto, é que os 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.

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

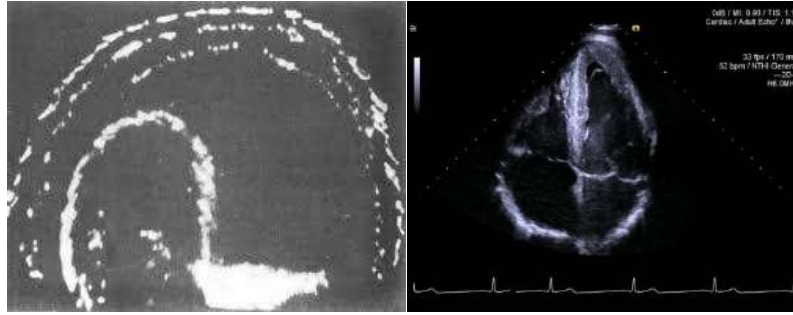


Figura 14: A evolução da tecnologia de ultrassonografia. Na imagem da esquerda é possível notar a formação das linhas de imagem com pouca resolução e pouca distinção entre elementos na imagem. A da direita representa uma categoria de aparelhos mais recente, que possibilita a distinção entre estruturas e com resolução bastante melhorada.

4.5 FREQUÊNCIA DE REPETIÇÃO DE PULSO - PRF e CICLO DE TRABALHO – *DUTY CYCLE*

A técnica de excitação ultrassônica chamada de pulso-eco consiste em uma coleção de pulsos, ou trem de pulsos, de ondas mecânicas (comumente senoidais) com intervalos constantes e parâmetros idênticos. Daí surge o conceito de Frequência de Repetição de Pulso (PRF), que significa o número de vezes que o pulso será emitido no intervalo de tempo, sendo exibido em Hz. Reciprocamente, o conceito de Período de Repetição de Pulso (PRP) mostra o intervalo de tempo entre a emissão de um pulso e o seguinte. Portanto, o PRP é dado pelo inverso do PRF (FISH, 1990; HAIM AZHARI, 2010).

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 terapêuticos do ultrassom (quando for o caso). Em geral, equipamentos de ultrassonografia utilizam PRF e DC baixos, 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 (Figura 15).

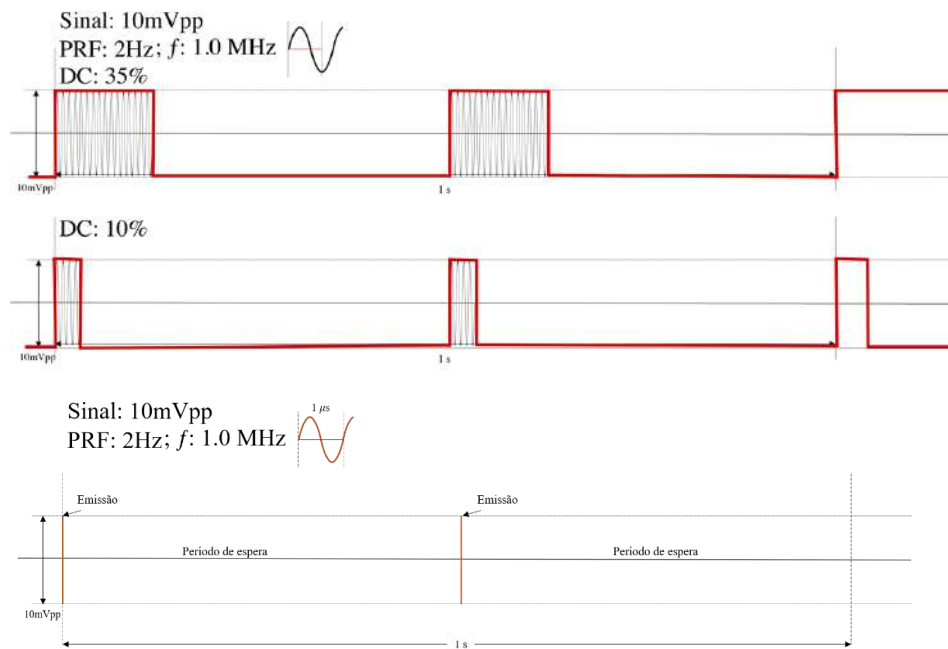


Figura 15: Ciclo de Trabalho, *Duty Cycle*. Aproveitando o conceito de PRF, o DC acrescenta o tempo em que o sinal permanece ativo no meio, sendo calculado como um percentual do tempo total em que o sinal é emitido no intervalo de tempo. Frequência de Repetição de Pulso, PRF. Corresponde à frequência de disparos de um sinal de ultrassom em um determinado meio. Na imagem superior é exposto uma PRF de 35%, em que o sinal emitido permanece ativo em 35% do intervalo de tempo entre os pulsos. Na segunda imagem, a PRF é de 10%, ou seja, o sinal emitido permanece ativo em 10% do intervalo de tempo entre os pulsos. Na imagem inferior, é exibido um sinal de PRF de 2Hz, ou seja, emitido no meio duas vezes no intervalo de 1 segundo. Percebe-se que esta frequência independe do sinal de excitação que é de 1MHz. A imagem é apenas ilustrativa para apresentar os conceitos. Imagem de autoria própria.

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

4.6 CAVITAÇÃO

A história da cavitação na ciência data de meados dos anos 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 às mesmas 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 mencionada 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 ambos sejam processos de cavitação, esta pode ser dividida, apropriadamente, em duas principais categorias. A primeira, chamada de cavitação hidráulica, 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 (Browniano), estão constantemente submetidas a frequentes colisões. Na presença de ondas sonoras, cada pequeno volume do líquido passa a ter as 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). O processo de formação das bolhas ocorre a partir da pressão negativa local, quando as moléculas de ar começam a se juntar. Quando o ciclo de pressão vira positivo, dois fenômenos podem acontecer: (a) a bolha pode colapsar e voltar ao seu tamanho original no próximo ciclo negativo (cavitação estável) ou; (b) as bolhas vão crescendo lentamente a cada ciclo negativo de pressão, até atingirem um tamanho suficiente para serem

implodidas num próximo ciclo positivo de pressão, formando novos núcleos para cavitação (cavitação instável).

Na cavitação estável, as 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). Já na cavitação instável (ou cavitação Inercial), as bolhas oscilam linear e não-linearmente e radialmente, porém com maior liberação de energia do que a cavitação estável, levando ao colapso violento das bolhas, resultando no aumento rápido e localizado de temperatura e de estresse, no aparecimento de forças de cisalhamento, ondas de choque, turbulência, microjatos e a fragmentação da cápsula da bolha (ASHOKKUMAR, 2011; INSERRA et al., 2014); em geral sob efeito de pressões acústicas superiores a 1,0 Mpa, quando a bolha já existe no meio (SHI et al., 2000) e entre 16,0 e 21,0 Mpa, quando esta não está presente no meio, ou seja, não existem núcleos para cavitação²⁶ (HERBERT; BALIBAR; CAUPIN, 2006), produzindo um espectro de banda larga contendo os harmônicos e subarmônicos da frequência fundamental emitida (APFEL; HOLLAND, 1991).

Além da pressão acústica, outros fatores como a inércia, a viscosidade e a tensão superficial do meio contribuem para o fenômeno de cavitação. Quanto menos tempo disponível para o crescimento da bolha, menor as chances de cavitação. Sendo assim, Apfel & Holland propuseram em 1991 um índice que é 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 dos ACUs e ao ponto de ruptura das mesmas e é utilizado como fator de segurança dos ultrassonógrafos, não sendo permitido exceder o valor de 1,9 no ultrassom diagnóstico (APFEL; HOLLAND, 1991; BARNETT et al., 2000; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). O valor de 1,9 foi proposto depois que se publicaram

²⁶ 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 abordado mais à frente nesta tese.

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 valor de pressão da onda mecânica, em Mpa, e o valor da raiz quadrada da frequência central do transdutor, em MHz. O menor valor de pico (também chamado de pico negativo de pressão - PNP) representa o máximo de descompressão que ocorrerá no meio (AMMI *et al.*, 2006). A Figura 16 ilustra a variação de pressão em função do tempo e a Figura 17 mostra a variação volumétrica de uma microbolha sob ação do campo acústico. A Equação 6 mostra o cálculo do índice Mecânico.

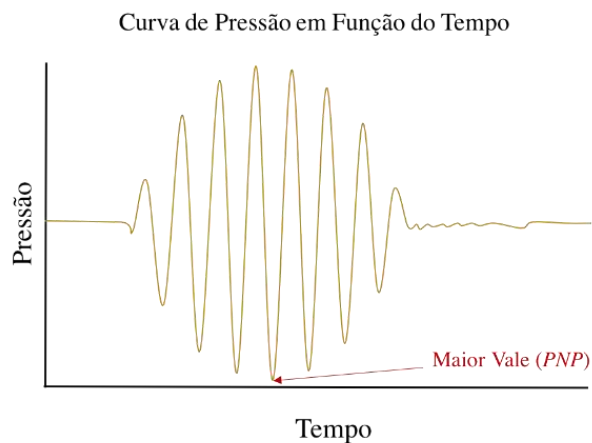


Figura 16 Curva ilustrativa da pressão em função do tempo. Observa-se o perfil da uma onda mecânica com um pico negativo de pressão demarcado (Maior Vale). Imagem de autoria própria.

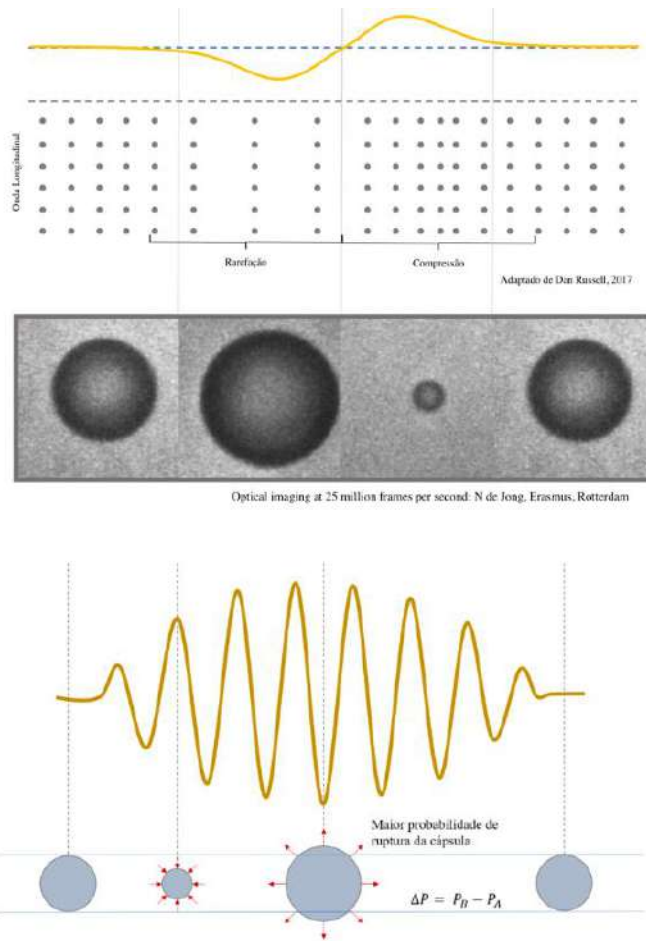


Figura 17: Esquema do comportamento de uma microbolha interagindo com uma onda de ultrassom. (STRIDE, 2009). Acima a representação dos campos de rarefação e compressão de um meio durante a passagem de uma onda mecânica longitudinal. As imagens em P&B estão relacionadas à Rarefação e a Compressão que ocorre nas bolhas presentes nestes mesmos campos apresentados. O esquema final corresponde a uma representação esquemática mista das duas imagens superiores.

$$IM = \frac{PNP [MPa]}{\sqrt{f [MHz]}} \quad \text{Equação 6}$$

em que PNP 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 15 MHz, seria necessária a aplicação de uma pressão acústica superior a 7,4 MPa e, para um de 5 MHz,

uma pressão acústica superior a 4,2 MPa. Portanto, utilizar apenas este parâmetro como forma de análise não é de todo o ideal. Por outro lado, a frequência mais aplicada, neste tipo de estudo, *in vitro* é de 1 MHz ou 1,1 MHz, 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 deveriam explicitar a faixa de frequência utilizada, para que se tenha uma ideia do I.M. Peter P. Chang realizou seu trabalho em agentes de contraste feitos de albumina, a Alunex[®] a 1,1 MHz (CHANG *et al.*, 2001).

O efeito da pressão negativa relativa tem impactos importantes sobre os tecidos biológicos e sobre os ACUs. 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). Podendo provocar efeitos deletérios ao organismo, por isso é importante que todo equipamento de ultrassonografia exiba o valor do I.M. que está sendo aplicado ao tecido. Alguns estudos relacionados aos ACUs e ao I.M. indicam que níveis baixos do I.M. ($I.M. < 0,1$)²⁷ resultam em menor destruição das cápsulas que atuam como espalhadores eficientes, devido à grande diferença entre compressibilidade e densidade dos ACUs comparadas ao plasma sanguíneo que os cerca. Os ACUs, 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 assíncronos com a onda incidente. Nesta faixa, os ACUs começam a produzir efeitos não lineares, com respostas harmônicas ($2f, 3f, \dots$) à frequência fundamental emitida (f) e também produzem respostas subarmônicas ($f/2, f/3, \dots$) que são utilizadas para destacar o tecido das regiões com ACUs

²⁷ Os valores de Índice Mecânico apresentados são estimados para agentes de contraste com cápsula lipídica, como o caso do ACU 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 sobre o efeito da espessura da cápsula sobre o sinal de retorno. Os valores apresentados servem como balizadores para o entendimento do conceito.

das 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 dos 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). Cada novo agente de contraste sintetizado tem a sua própria combinação de pressões acústicas e I.M. que causam as destruições destes. Assim torna-se imperativo identificar as condições de segurança para cada caso²⁸ (SHI et al., 2000).

A ruptura dos 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 à bolha; ou seja, uma cápsula, de determinado material e sua espessura; tamanho do núcleo da bolha e de seu raio (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).

4.7 MODO CONTRASTE EM ULTRASSONOGRAFIA - CEUS

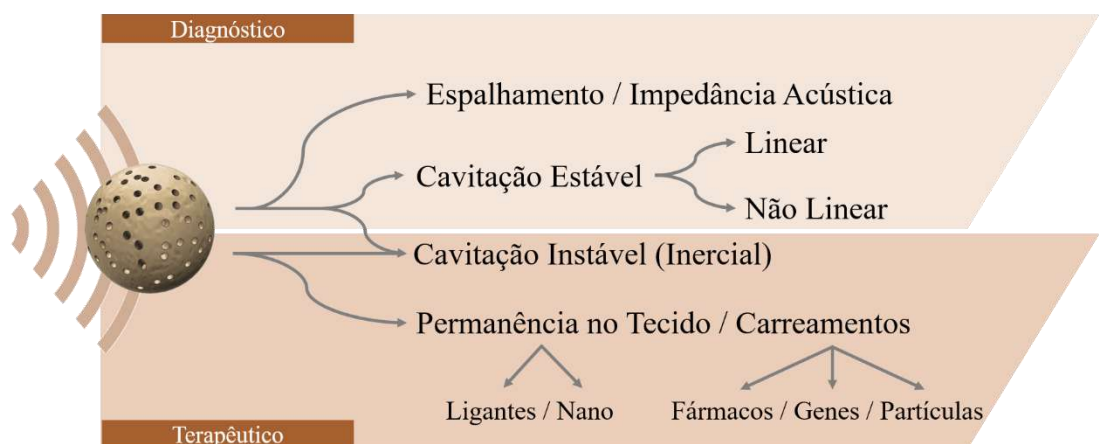
Com as primeiras aprovações para uso clínico dos ACUs, os fabricantes de equipamentos de ultrassonografia não demoraram para desenvolver um produto específico para estes novos tipos de materiais. Estes equipamentos contam com *softwares* para operar o modo contraste, com frequência de amostragem superior à tomografia computadorizada e à 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

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

comparado às duas outras categorias de imagem citadas (BARR, 2017). Os *softwares* possuem tais capacidades pois apresentam técnicas como inversão de pulso, que extraem 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, provoca a eliminação (*clearance*) dos 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 porque o tempo médio de circulação dos atuais ACUs de segunda geração são de 5 min, num procedimento de exame estipulado em 3 min. Ainda, o volume de dados gerados por exame é bastante superior ao de uma ultrassonografia convencional, requerendo um sistema de armazenamento externo, na maioria das vezes (BARR, 2017).

A Figura 18 traz um breve resumo do tópico apresentado com as aplicações de cada técnica na clínica médica.



Joshua Owen, 2018; Wui K. Chong, 2018; STRIDE, 2009

Figura 18: Resumo das aplicações Terapêuticas e Diagnósticas dos ACUs. Imagem de autoria própria.

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 em um processo água-óleo-água (A/O/A). Sintetizadas, as cápsulas devem ser analisadas 1) com um microscópio óptico para uma verificação 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 um microscópio eletrônico de varredura (MEV) para averiguação 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 dos 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 dos ACUs, fase esta realizada no Laboratório de Imagens Biomédicas (LIB – *Laboratoire d’Imagerie Biomédicale*). O LIB pertence à Universidade Paris 6, *Université Pierre et Marie Curie/UPMC* de Paris, que possui vasta experiência e tecnologia na área. Nesta fase, buscou-se analisar o 1) retroespalhamento; 2) a estabilidade temporal e; 3) a resposta à pressão acústica. A Figura 19 resume as fases e os métodos a serem utilizados no projeto.



Figura 19: Resumo das fases e dos métodos a serem empregados no projeto. A) Fase 1 – síntese e análise estrutural das cápsulas. B) Fase 2 – análise das propriedades acústicas dos ACUs. Imagem de autoria própria.

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

Neste projeto foram utilizados os PVAs²⁹ da empresa 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. 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, é o elemento disperso durante a preparação das cápsulas 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⁻¹,

²⁹ É amplamente utilizado nas indústrias, sendo principalmente utilizado para revestimentos de fibras, adesivos, emulsões, filmes para embalagem e agricultura, bem como para a produção de poli(vinil butiral). Ainda, apresenta baixa citotoxicidade, sendo bastante utilizado 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).

chamados de PCL10 e PCL45, respectivamente (TUBA; OLÁH; NAGY, 2014). As propriedades mecânicas da PCL, com o aumento da massa molecular do polímero a PCL45 tem um comportamento, a princípio, mais elastomérico e menos quebradiço do que a PCL10 (CHAO-JING et al., 2013; LIM; KIM; YOON, 2002), o que seriam propriedades mais interessantes para a interação com o campo acústico.

5.3 FORMAÇÃO DAS MICROCAPSULAS

Neste processo, a primeira emulsão³⁰ ocorre pela adição de 200 µl de solução aquosa de Poli(álcool vinílico) 1% (PVA) em solução de clorofórmio³¹ (20 ml) contendo 500 mg de polímero (PCL). Após este processo, o conteúdo é emulsificado com equipamento Ultra-Turrax IKA T-10 basic e elemento dispersor +S10N-10G³² em banho de gelo por 5 min. Esta emulsão (A/O)³³ é, então, vertida em 20 ml 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 um sistema de rápida evaporação do clorofórmio, formando poros³⁴. A suspensão de ACUs é, então, lavada três vezes por centrifugação a $480g^{\vec{}}$, 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e liofilizado (Liofilizador Liotop L101) por outras 24 h, a aproximadamente

³⁰ Sistema água, óleo e anfifílico, opticamente isotrópico e termodinamicamente estável (DANIELSSON; LINDMAN, 1981).

³¹ A PCL pode ser solubilizada em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, entre outros.

³² O Ultra-Turrax é um equipamento capaz de entregar energia a um sistema por forças de cisalhamento, promovendo a dispersão e homogeneização do meio.

³³ 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” representam o componente hidrofílico, ou aquele que é solúvel em água e o “O” representa os que seriam mais propensos a serem solúveis em materiais oleosos ou mais corretamente, aqueles hidrofóbicos.

³⁴ Neste trabalho, os dois métodos foram realizados, produzindo microcápsulas com e sem poros de 45.000 e 10.000 g/mol.

zero atm a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, formando um pó de coloração branca que é armazenado em frascos de polipropileno sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pronta para uso³⁵. A Figura 20 mostra a bancada de trabalho desta parte do experimento. O liofilizador pertence ao Laboratório de Biopolímeros da COPPE.

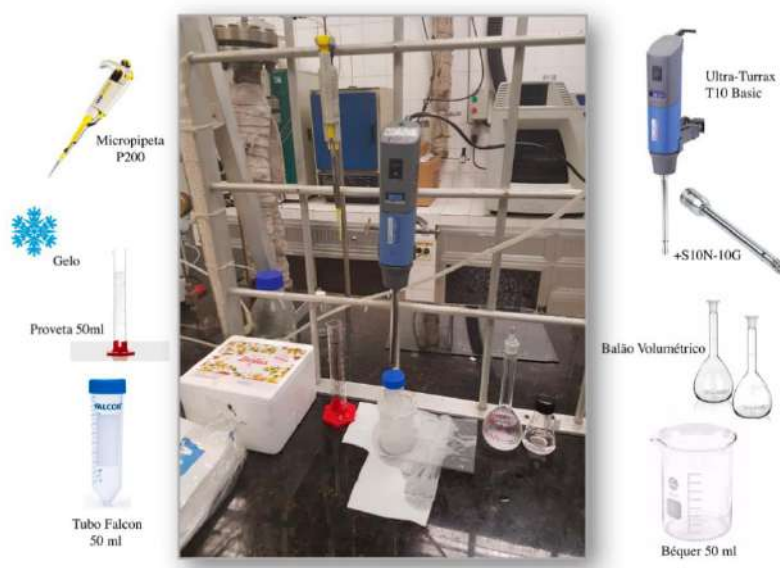


Figura 20: Foto da bancada de trabalho para a produção dos ACUs. Todos os equipamentos utilizados estão listados. Todos os experimentos foram feitos no Instituto de Macromoléculas da UFRJ, no LCPRB. Imagem de autoria própria.

5.4 ANÁLISE PRELIMINAR DOS ACUs E CONTAGEM POR CÂMARA DE NEUBAUER

Uma balança de precisão (Shimadzu-AY220, Classe I, Brasil) com quatro casas decimais e exatidão de 0,001 g foi utilizada para medir 0,01 g do pó de ACUs. Em seguida, 10 ml de H₂O 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 50 μl para microscopia. O microscópio ótico

³⁵ O trabalho de Jean-Marc Hyvelin mostra recomendações para o procedimento de armazenagem e resuspensão das ACUs.

(Evos® XL Core Image System, Thermo Fisher Scientific, Brasil), é utilizado para uma análise inicial dos ACUs, visando determinar a presença de grumos e se foram produzidos, ou não, materiais esféricos, de tamanhos regulares. Para isso, foi utilizada a lente objetiva de 20x, proporcionando um aumento de 200x

Outros 50 µl são coletados para a Câmara de Neubauer que também é levada ao microscópio para a contagem dos ACUs. O processo de contagem ocorre como descrito a seguir: Quatro quadrantes de 1 mm² de base e 0,1 mm de altura são registrados em uma imagem, que é, então, processada pelo software ImageJ®, utilizando plugins nativos. A Figura 21 exibe a câmara de Neubauer com os seus quadrantes. O processamento das imagens ocorre em alguns passos. Primeiro, as imagens são convertidas para 8 bits e, então, ajustadas 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, as configurações do microscópio são mantidas para os 4 quadrantes e todas as amostras. O passo seguinte completa os buracos em branco com a função *Fill_holes*. A imagem é, então, convertida para máscara (*mask*), onde 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/mm³) e o volume da câmara (0,1mm³), pode-se obter a concentração de ACUs por mililitro e ACUs por grama.

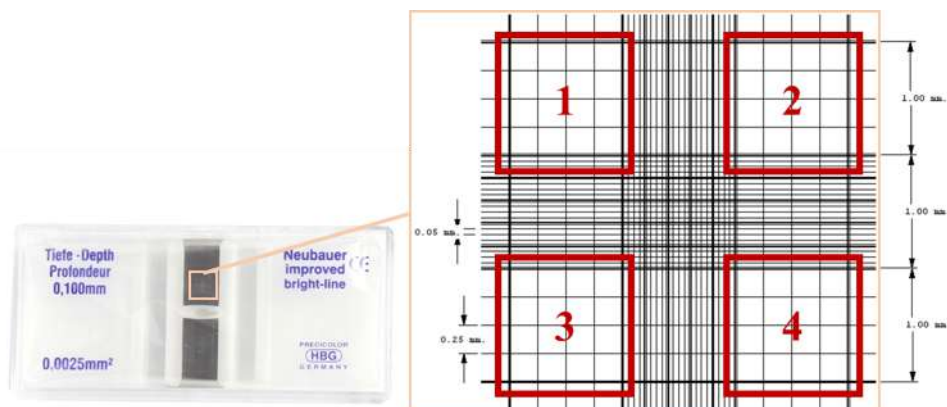


Figura 21: Câmara de Neubauer e ilustração das divisões internas que formam os quadrantes da câmara de Neubauer para a contagem do material. Imagem de autoria própria.

5.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A MEV (ISM-6460LV - JEOL), é utilizada neste projeto para a análise detalhada da superfície dos ACUs (x500, x2.000 e x5.000 com aceleração de voltagem de 10kV e resolução de 3,00 nm)³⁶, visando obter informações quanto à morfologia da cápsula, como, por exemplo, se encontram-se esféricas e íntegras e se há resíduos do meio externo (PVA). Segundo Abdelwahed et al., não são raros os relatos de autores alegando a presença de PVA na superfície dos ACUs, mesmo após sucessivas lavagens (ABDELWAHED et al., 2006).

³⁶ 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 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO

A distribuição de tamanho da população de ACUs e a verificação da formação de grumos foi estimada por espalhamento de luz estático – SLS, usando o equipamento Mastersizer Malvern 2000, utilizando água pura como dispersante, culminando em 0,01 g/ml de diluição e aplicando uma taxa de obscurescência de 12% (MELO et al., 2012). O equipamento utiliza um sistema de laser focalizado, 633nm, que incide sobre as amostras e mede o espalhamento, do tipo Mie, do feixe utilizando sensores fotossensíveis. O espalhamento ocorre em diversos ângulos que é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, analisando uma faixa de tamanho de 0,02 μ m a 2000 μ m (MALVERN, 2017). Todas as análises foram feitas em triplicatas.

5.7 PREPARO E FILTRAGEM DAS AMOSTRAS

Neste trabalho, todas as amostras foram calculadas para estarem em uma concentração final de $2 \cdot 10^7$ ACUs/mL, considerando dois fatores: 1) ACUs poliméricos não possuem muitos estudos na literatura a respeito da concentração de uso ideal, nem de cavitação e que estimasse um limiar de ruptura para estes superior ao convencional, usado para outros agentes de contraste para ultrassom e; 2) associando ao efeito escudo reportado por Peter P. Chang, 2001 e Azzdine Y. Ammi, 2006 que afirmam que o aumento da concentração de ACUs eleva o limiar de ruptura (AMMI et al., 2006; CHANG et al., 2001), abaixo da concentração, inicialmente prevista, mas ainda assim, 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 dos dados referentes à contagem das bolhas na câmara de Neubauer, que serão apresentados no capítulo de RESULTADOS (6.2 OS NOVOS GRUPOS DE ACUs). As amostras foram pesadas em uma balança (Satorius Class1), com cinco dígitos de precisão e posteriormente ressuspendidas em água MilliQ®, em um total aproximado de 5 mL. Elas são vagarosamente homogeneizadas pela inversão do tubo

Falcon 15 ml, por 10 vezes e, homogeneizadas lentamente, com o auxílio da micropipeta P5000 por 30 vezes, favorecendo a solubilização do PVA na água e liberando os ACUs para filtragem. Após este processo, as amostras passam por um filtro hidrofílico de Náilon ou Nylon³⁷ com porosidade de 10 μm (Merck Millipore, Tullagreen, Irlanda), acoplado a uma seringa de 10 ml, para a retirada de eventuais grumos e ACUs com diâmetro superior ao desejado (Figura 22).

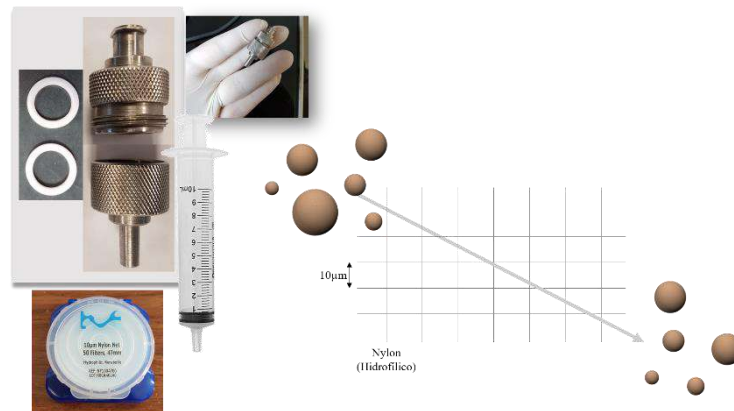


Figura 22: Esquema para filtragem dos ACUs. Uma seringa conectada a um adaptador de filtro-seringa, munido com o filtro de Náilon 10 μm . Os dois *o-rings* mostrados ao lado do adaptador metálico servem para a vedação do sistema interno. Imagem de autoria própria.

5.8 PROPRIEDADE MECÂNICA

A propriedade mecânica (módulo de Young) das amostras foi adquirida 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 <10nm, de geometria simétrica e revestida com alumínio espelhado de espessura 30nm (Figura 23). A ponteira é designada para operação em modo de contato e contato intermitente.

³⁷ Existem diversos tipos de Náilon, o tipo em questão não foi informado pelo fabricante.

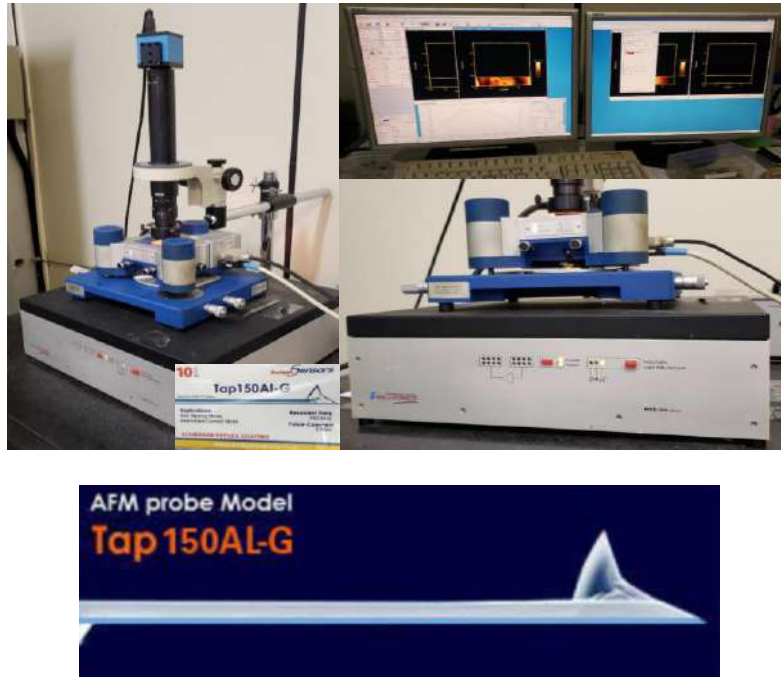


Figura 23: Imagem de um microscópio de força atômica JPK. Equipamento destinado à análise das propriedades mecânicas dos ACUs.

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 8×8 (Figura 24).

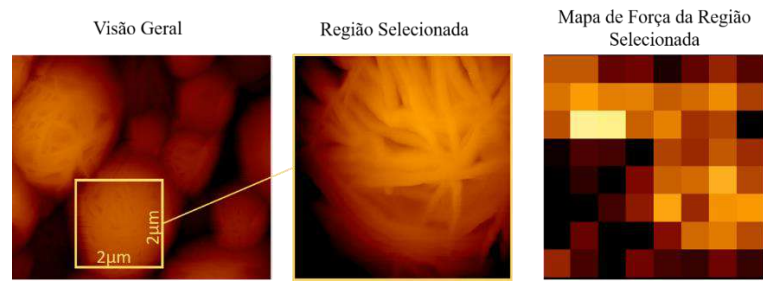


Figura 24: Processo de análise de uma região por AFM. Uma região de $2 \times 2 \mu\text{m}$ é seleccionada para a medição, resultando no mapa de força.

As forças geradas pelo mapa são analisadas pela inclinação da curva de retração (Slope da curva de retração) (Figura 25). 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 seleccionada. Rigidez, esta, obtida pelo ajuste linear da curva e dada em $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$. A força de adesão (F_{ad}) é dada pelo ponto mínimo da curva, correspondendo à posição de máxima força de adesão.

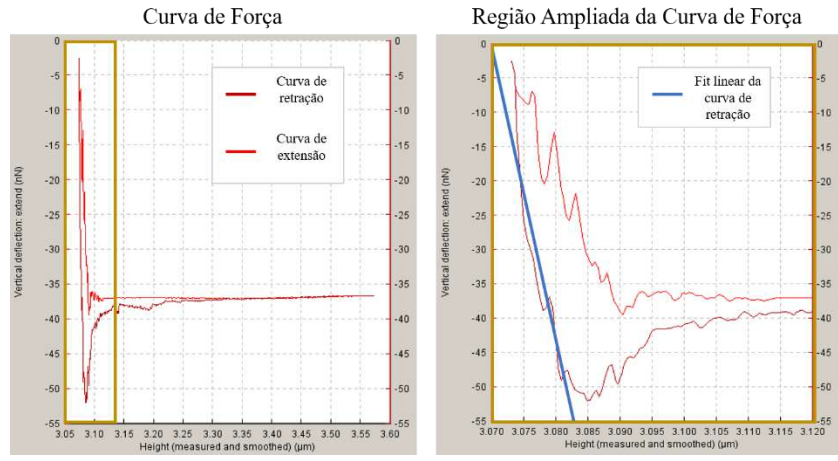


Figura 25: Curva de Força da AFM. A curva de força é obtida utilizando dados do mapa de força gerado anteriormente.

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 ν corresponde ao coeficiente de Poisson do ligante, α a metade do ângulo da ponta do AFM, F_{max} a força para máxima indentação e δ_{max} , a profundidade máxima de indentação (ABEDALWAFI et al., 2012; ENGELBERG; KOHN, 1991b).

5.9 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 ao coeficiente de rigidez e corresponde a $1/k\rho$. Em que k é o módulo de compressibilidade da PCL (455MPa) (ESHRAHGI; DAS, 2010; RAGAERT et al., 2014) e ρ é a densidade do polímero (1,145g/cm³, informação do fornecedor).

5.9 AVALIAÇÃO DO RETROESPALHAMENTO - ULTRASSOM EM MODO PULSO-ECO

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 em que se propaga, 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 pelos ACUs em suspensão, bem como é o mesmo princípio utilizado nos equipamentos de ultrassonografia.

Sendo assim, foram utilizados: um gerador de função (Olympus, 5077PR Square Wave Pulse/Receiver); três transdutores ultrassônicos submersíveis monoelemento de 0,5 mm de diâmetro, sendo um de 2,25 MHz (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 para acomodar a amostra; um osciloscópio (LeCroy Wave Surfer 424) e um posicionador eletrônico dos transdutores microcontrolado por computador e por um motor de passos. A Figura 26 e a Figura 27 exibem os equipamentos e as configurações experimentais para as análises de pulso-eco, respectivamente.



Figura 26: Equipamentos utilizados na configuração experimental para as análises de pulso-eco.

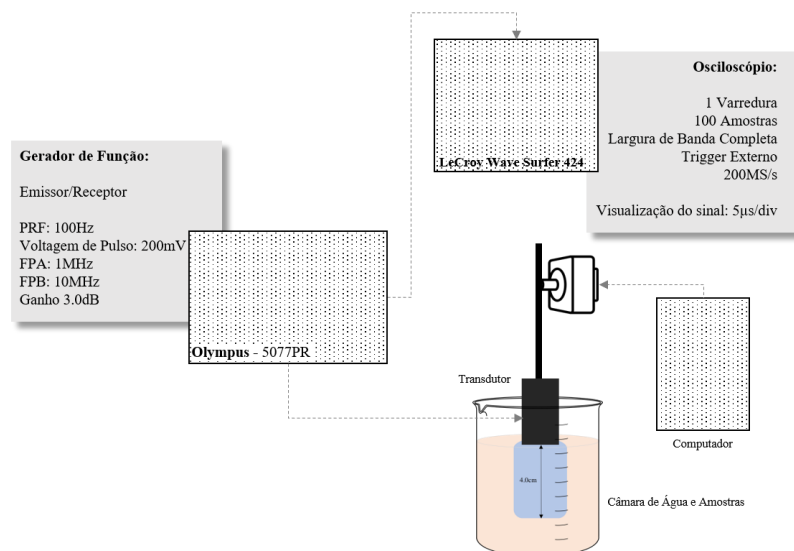


Figura 27: Configuração experimental para as análises de pulso-eco.

O gerador de função permite produzir sinais elétricos de frequências conhecidas e mantém fixos: a PRF em 100 Hz, o filtro passa altas em 1 MHz, o filtro passa baixas em 10 MHz (desligado apenas quando operando na frequência de 10 MHz), o ganho em +3 dB e a tensão em 200 mV, 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 somente ou com as amostras ou a 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 2,25 MHz e 5 MHz para as respectivas frequências e transdutor de 10 MHz excitado nas frequências de 7,5 MHz e 10,0 MHz.

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 20 µm, 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)³⁸. Por último, todas as amostras são comparadas a um *phantom* de ágar correspondente aos tecidos moles, 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 etapa, os quais foram processados em um programa desenvolvido em Matlab® (The MathWorks, Inc, R2015a). A comparação da intensidade do eco de retorno em dB foi estimada aplicando-se a Equação 9 (ASTAFYEVA et al., 2015a).

$$RS_{AR} = 20 \cdot \log_{10} \frac{S_A}{S_R} \quad \text{Equação 9}$$

Em que S_A corresponde ao valor do máximo do espectro de frequência 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 corresponde ao máximo do espectro do sinal da referência, a qual sempre será a água. A configuração experimental é apresentada na Figura 28.

³⁸ 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.

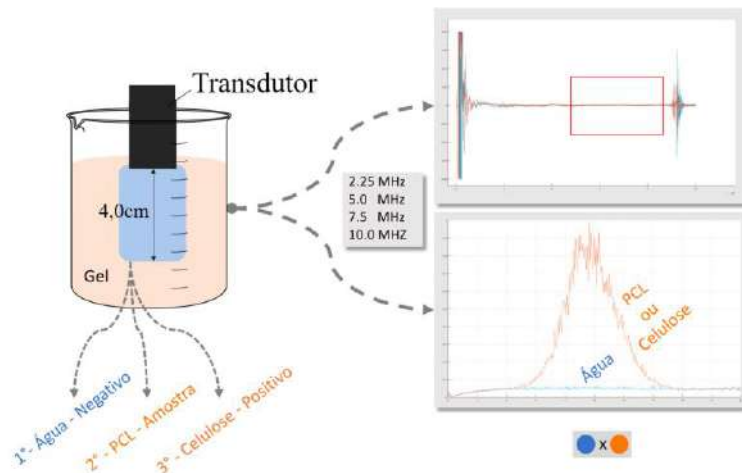


Figura 28: Ilustração da configuração experimental proposta para a análise dos ACUs. Aplicou-se água na câmara para obtenção dos primeiros sinais de referência para todas as frequências estipuladas. Em seguida as PCL foram analisadas diante da mesma configuração e por último, a celulose. A imagem mostra dois sinais típicos dos experimentos, um no domínio do tempo (acima) e outro no domínio da frequência (abaixo). Imagem de autoria própria.

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 (x'). Assumindo a velocidade de propagação (c) em $1480\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, a 20°C , pode-se estimar o posicionamento dos ecos na escala temporal apresentada no osciloscópio utilizando a Equação 10

$$t = x' \cdot c^{-1} \quad \text{Equação 10}$$

em que t é o tempo apresentado no osciloscópio.

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 29). A mesma janela foi aplicada em

todas as medições. Foram realizadas três repetições para cada amostra ($n=3$), sempre coletando cem sinais processados em um programa desenvolvido em Matlab®.

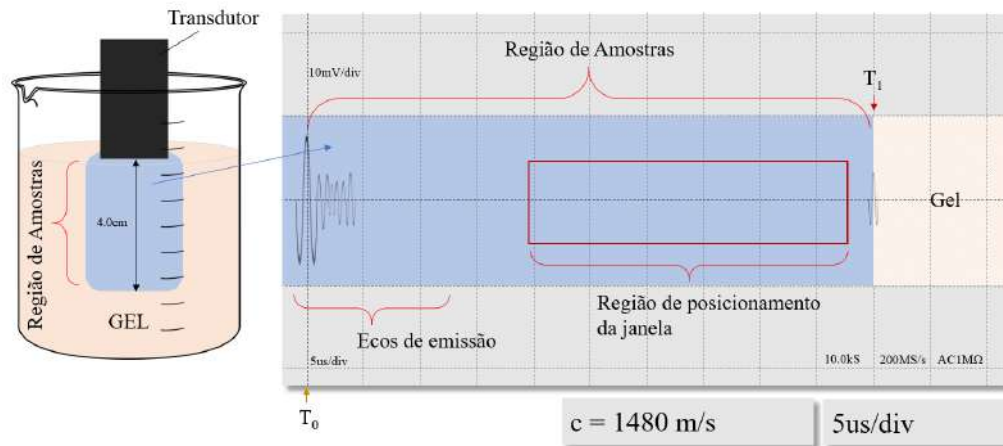


Figura 29: Estimando o posicionamento da janela de observação do sinal. Utilizando a Equação 10 é possível estimar a região de interesse e as posições dos ecos de emissão (T_0) e reflexão gel-água (T_1). A janela deve ser posicionada entre os dois picos e ligeiramente afastada dos picos de emissão. A região de posicionamento da janela corresponde ao espaço da câmara que contém as amostras, partículas ou simplesmente água. Imagem de autoria própria.

A região de posicionamento da janela foi escolhida com base na observação da média de cem sinais e, após o posicionamento da janela, esta foi mantida para todas as análises futuras. Com a janela fixa foi realizada a FFT de cada um dos cem sinais das amostras e obtida a média dos módulos das FFTs, fazendo um único espectro para análise (Figura 30).

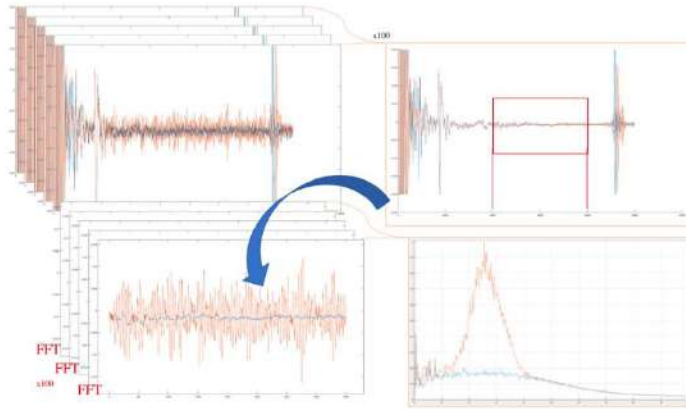


Figura 30: Os módulos da FFT dos cem sinais foram promediados para obtenção de um único sinal para análise. Imagem de autoria própria.

Este mesmo espectro médio foi submetido a um ajuste polinomial do tipo Spline³⁹ para minimizar os efeitos do ruído e extrair um valor mais livre de ruídos para S_A^2 e S_R^2 (Figura 31).

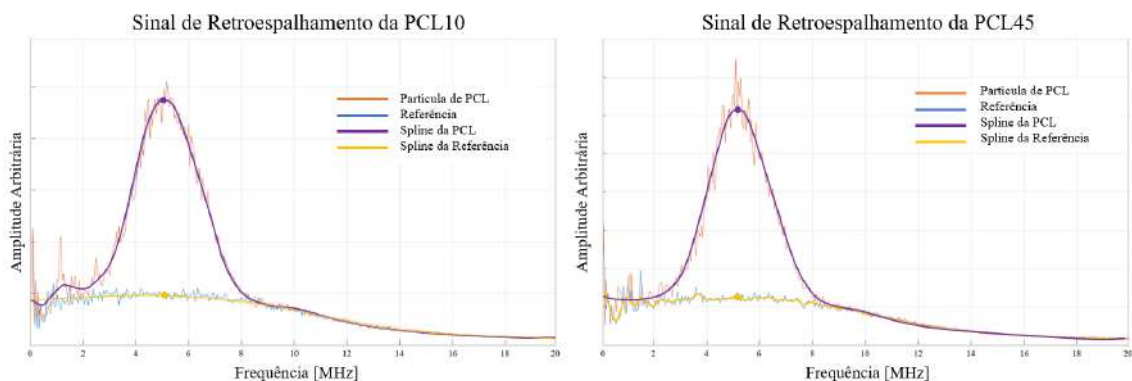


Figura 31: Espectros médios dos sinais de retroespalhamento dos ACUs de PCL10 e PCL45, em comparação com a água, usando um transdutor de 5 MHz. Implementação da curva *Spline* sobre as FFTs. As curvas polinomiais do tipo *Spline* foram ajustadas, sobre os sinais de FFT, possibilitando comparar o comportamento 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 5 MHz, frequência central do transdutor utilizado e representada nesta imagem.

³⁹ Spline é uma função, polinomial, definida por múltiplas subfunções, cada subfunção aplicada a um determinado intervalo do domínio da função principal. Para projetos futuros sugere-se realizar ajustes gaussianos no pico do sinal.

5.10 ESTABILIDADE TEMPORAL DOS 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. Contudo, a presença de poros nas cápsulas dos ACUs e o conteúdo de ar representam o principal ponto crítico à estabilidade destes ACUs, 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 5.9 AVALIAÇÃO DO RETROESPALHAMENTO - 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 dos ACUs, seguiram-se os preceitos levantados no capítulo intitulado 4.6 CAVITAÇÃO, porém, é necessário fazer alguns comentários iniciais. A literatura científica traz diversos nomes para o resultado da cavitação na cápsula dos 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 poliméricos, por exemplo, tendem a ter uma espessura de cápsula superior aos demais tipos, numa faixa, em 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 do 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 poliméricos, em geral, permaneçam intactos após eventos de cavitação, não havendo fragmentação dos mesmos, mas, sim, ruptura e a consequente ejeção destes da região em que se encontram (XIONG et al., 2011), produzem fortes sinais não-lineares, que permitem 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 PCR⁴⁰ que serve de recipiente, posicionando o conteúdo da suspensão no tanque acústico. Como cada tubo de PCR contém 250 µL e como todas as amostras para experimentos são produzidas em triplicata, com seis parâmetros diferentes, são necessários no mínimo 4,5 mL de produto final (ACUs em suspensão), distribuídos em 18 tubos de PCR, contendo as amostras. Cada tubo de PCR é, individualmente, posicionado no ponto confocal entre o transdutor de emissão e o hidrofone e, então, o sistema é ativado.

b. CONFIGURAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS

Foi utilizado um equipamento dedicado, do LIB/Paris. O método consiste em utilizar um gerador de frequências (Agilent, modelo 33250A,) que produz um sinal tipo *burst*, que passa por um amplificador de sinal RF (AR france, modelo 150A100B, França), seguido de um monitor de potência *Power Reflexion Meter*⁴¹ (Rohde & Schwartz, Modelo NRT, Alemanha) para medir a reflexão e a intensidade entregue ao transdutor – HIFU (Sonic Concepts, modelo

⁴⁰ Tubo de PCR é um pequeno tubo de ensaio de 250µl destinado a equipamentos de PCR - *Polymerase Chain Reaction*.

⁴¹ Em nota, o fabricante afirma que o equipamento é transparente ao sistema e a interferência produzida nos dados gerados ou coletados é nula.

Y-107, USA), que converterá o sinal em uma onda mecânica (Figura 32). O ultrassom se propaga, então, em um tanque acústico com água degaseificada a uma temperatura de 36 a 37 °C controlada pelo equipamento de degaseificação⁴² (Sonic Concepts, modelo WDS-105+, USA)⁴³. 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 (Figura 33). A cavitação é monitorada usando um transdutor focalizado de banda larga que funciona como hidrofone (Sonic Concepts, modelo Y-107, USA).

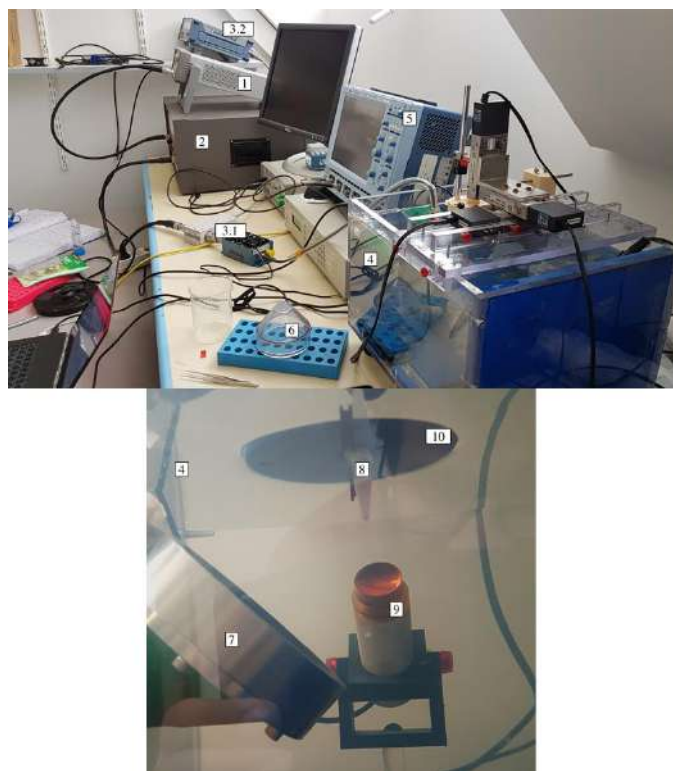


Figura 32: Equipamentos utilizados na configuração experimental para as análises da resposta à pressão acústica. 1 – Gerador de Frequências; 2- Amplificador de Sinal; 3.1 – Espelhador de Sinal; 3.2 - Monitor de Potência; 4 - Tanque de água; 5 - Osciloscópio; 6 – Funil para posicionamento da amostra; 7 – HIFU; 8 – Tubo PCR para amostras; 9 – Hidrofone; 10 – Absorvor acústico. Imagem de autoria própria.

⁴² As temperaturas utilizadas baseiam-se na temperatura do corpo humano, torando o experimento mais próximo das condições de operação na clínica médica.

⁴³ 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 esse estudo foi realizado em nBs que deveriam ser submetidas a processos de vaporização, diferenciando-se fisicamente do caso deste trabalho.

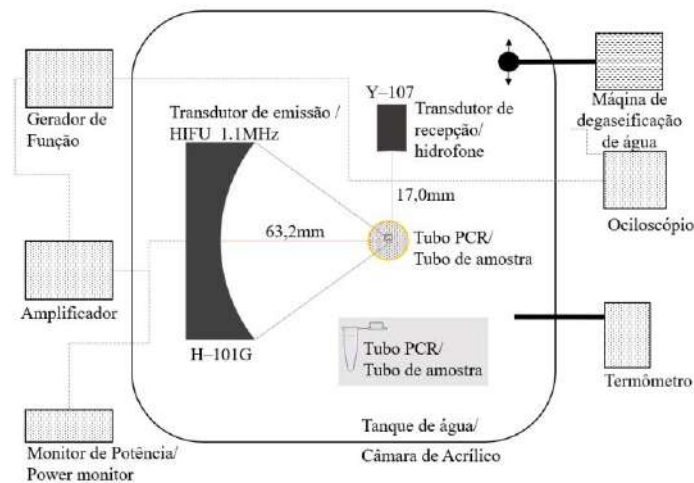


Figura 33: Configuração experimental para as análises da resposta à pressão acústica. Imagem de autoria própria.

c. ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Para iniciar a abordagem, foi estabelecida qual seria a pressão acústica máxima que poderia ser aceita em uma possível utilização na clínica, chegando-se ao limite superior de 1,9 de I.M., sem ultrapassar 3,0 MPa⁴⁴ (BARNETT et al., 2000; BRAYMAN et al., 1996; CHANG et al., 2001). Pelos cálculos do I.M., na frequência proposta de 1,1 MHz, a pressão acústica deveria obrigatoriamente estar próxima a 2 MPa para obter o I.M. desejado. Fixado este Limite Clínico, outras configurações ainda precisavam ser estabelecidas, portanto, Clínica I e Clínica II foram propostas, com 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 34 ilustra este esquema experimental.

⁴⁴ Valor referente ao PPN e não à amplitude total.

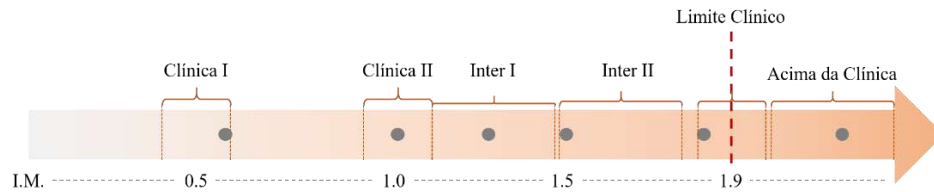


Figura 34: Abordagem experimental proposta para a análise da resposta à pressão acústica. Imagem de autoria própria.

Para viabilizar estes valores de I.M é necessário definir outros parâmetros, como a frequência a ser empregada que, como mencionada acima, foi de 1,1 MHz. 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 proposta uma PRF de 100 Hz (com PRP de 10 ms). Um ciclo de trabalho de 5% e um tempo de processo total de 20 s, ou seja, o equipamento permanece ligado por 20 s, 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. O valor do ganho disposto na tabela corresponde a um parametro do equipamento utilizado.

	Fixo					Amp. [mVpp]	Pressão Acústica** [Mpa]		Índice Mecânico	
	<i>f</i> [MHz]	PRF [Hz]	PRP [ms]	DC [%]	DS [s]	Entrada	Saída / Esperado		Calculado / Esperado	
Clínica 1	1,1	100*	10	5	20	163 / Ganho 07	1,03 ± 0,40	P = 1,0	0,45 ± 0,19	= 0,5
Clínica 2						163 / Ganho 09	1,99 ± 0,29	P = 2,0	0,95 ± 0,01	= 1,0
Inter 1						100 / Ganho 11	2,66 ± 0,02	2,0 < P < 3,0	1,27 ± 0,02	1,0 < I.M. < 1,5
Inter 2						120 / Ganho 11	3,22 ± 0,05	3,0 < P < 3,5	1,53 ± 0,02	Inter 1 < I.M. < 1,9
Limite da Clínica***						163 / Ganho 10	3,64 ± 0,15	3,5 < P < 3,9	1,73 ± 0,02	Inter 2 < I. M. < 1,9
Acima da Clínica						163 / Ganho 11	4,46 ± 0,10	P > 4,0	2,13 ± 0,04	I.M. > 1,9

* Reduzindo a 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 também foi utilizada por na metodologia de estudo de Paul S. Sheeran *et al.* que para avaliar nano-gotas como agentes de contraste para ultrassom, utilizaram pressões de 1,43 a 4,97 MPa 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 foram aplicadas 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 35 exibe o painel de interface GUI do programa em MATLAB®, que permite fornecer, como entrada, os parâmetros de amplitude, PRF, DC e DS.

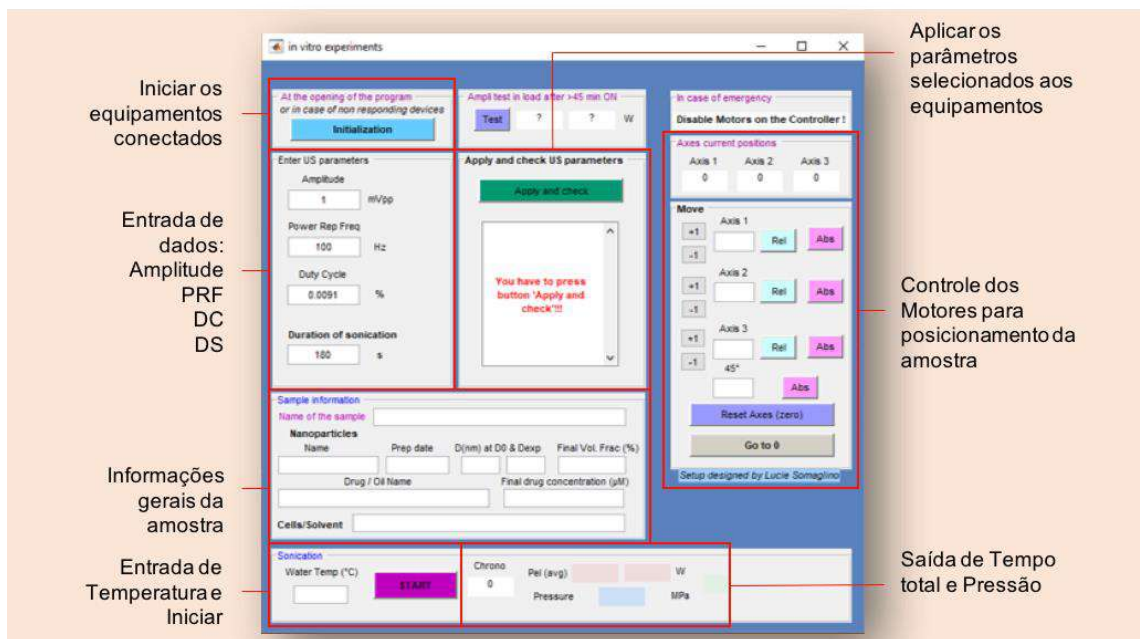


Figura 35: Interface GUI do programa escrito em Matlab®. Imagem de autoria própria.

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

RESULTADOS

6.1 OS PRIMEIROS GRUPO DE ACUs

As observações iniciais dos primeiros ACUs foram feitas, visualmente, ao ressuspender 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 36. Estes ACUs deveriam se apresentar com o aspecto turvo leitoso e, não, em uma formação com grumos nítidos em suspensão.

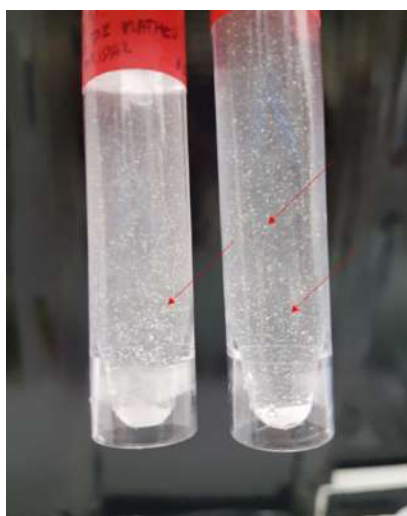


Figura 36: Fotografia dos Primeiros Grupos de ACUs poliméricos. Nítida presença de grumos.

Os ACUs foram, em seguida, submetidos a microscopia óptica, com o objetivo de avaliar se estes encontravam-se no formato esférico, se existia alterações de tamanho ou formação de grumos. Esta primeira avaliação serve para identificar possíveis erros na síntese das cápsulas, antes de dar continuidade às demais avaliações. A Figura 37 mostra alguns dos ACUs sintetizados. As imagens representam quatro regiões diferentes de uma mesma lâmina, com uma amostra representativa dos ACUs produzidos nos primeiros grupos. Todas as cápsulas aparentam possuir formato esférico, correspondendo ao esperado.

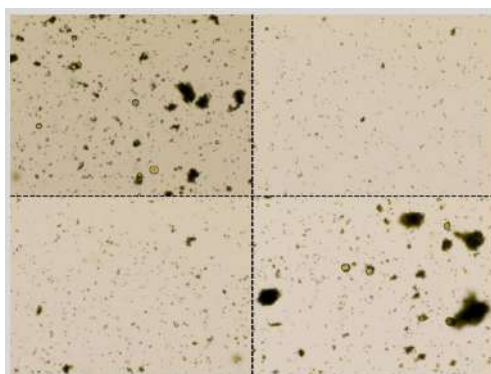


Figura 37: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200. Grumos presentes.

Continuando a análise, as amostras foram submetidas à MEV, buscando visualizar a morfologia das cápsulas. Na Figura 38 são expostas as imagens referentes aos ACUs dos Primeiros Grupos. A Figura 39 exhibe a presença de PVA aderido à cápsula de PCL, em que duas imagens iguais são dispostas, sendo uma original em escala de cinza e a outra, colorida, para destacar a presença de PVA (Azul) aderido à cápsula dos ACUs (Verde ou amarelo).

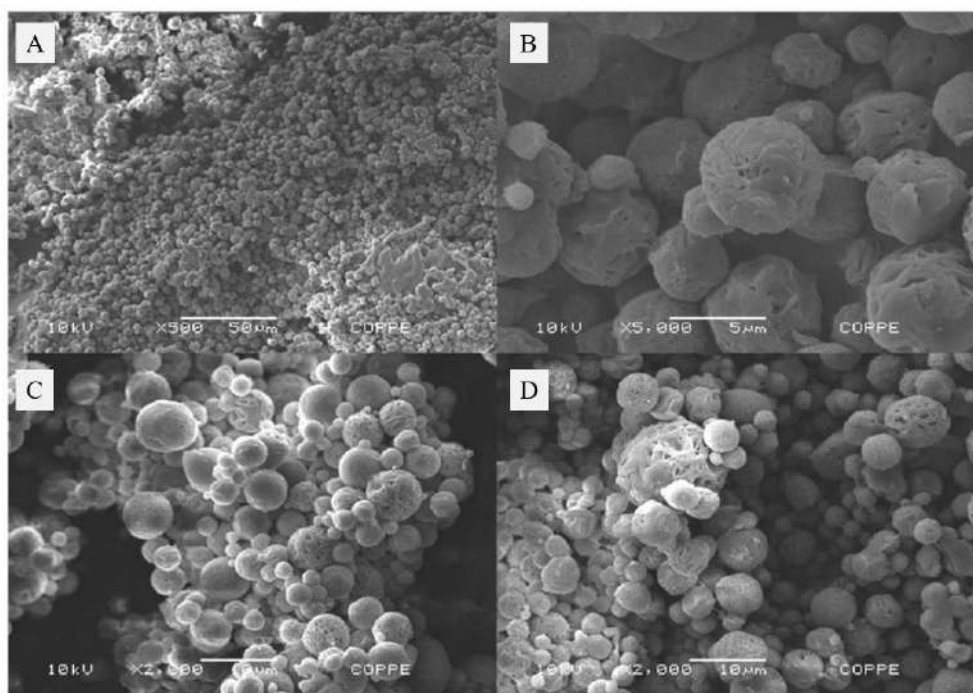


Figura 38: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa dos ACUs, referentes aos Primeiros Grupos. Visão geral dos aumentos de x500, x2000 e x5000. A) No aumento de x500 pode-se perceber um grande grumo de cápsulas. B) No aumento de x5000 observa-se o detalhe das cápsulas, mostrando que estas possuem poros e formato esférico. C) e D) Nos de x2000 é possível observar os grumos em maior detalhe, percebendo a presença do PVA aderido à superfície. É possível ainda notar que a grande maioria das cápsulas no campo observado possuem tamanho inferior a $10\mu\text{m}$.

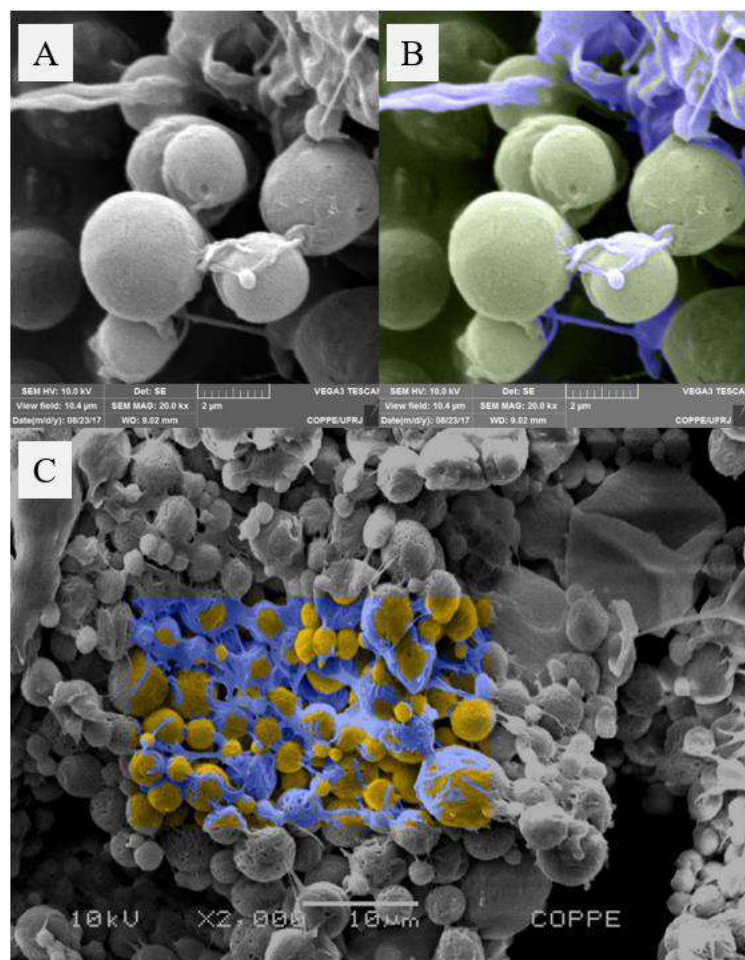


Figura 39: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura exemplificando a presença de PVA aderido à cápsula de PCL dos ACUs: A) MEV original em escala de cinza e B) e C) colorida para destacar a presença de PVA (Azul) aderido à cápsula dos ACUs (Verde ou Amarelo).

A partir deste ponto, observou-se que era necessário alterar a metodologia de produção dos 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, facilitando 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 dos 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.

6.2 OS NOVOS GRUPOS DE ACUs

Estes novos grupos, sintetizados com as alterações descritas no item anterior, 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 40)

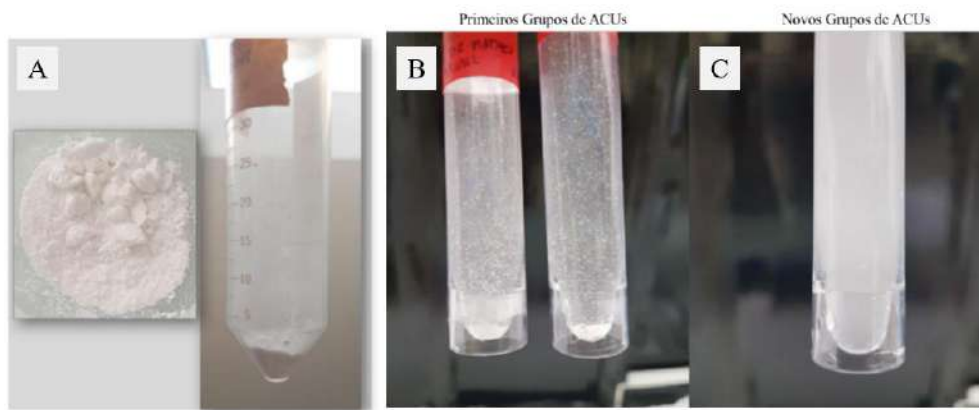


Figura 40: Imagens dos novos grupos de ACUs. A) Seco em forma de pó, B) o primeiro grupo em suspensão e o C) novo grupo de ACUs em suspensão.

À microscopia óptica, todas as cápsulas, agora produzidas, aparentavam possuir formato esférico, com grumos menos aparentes que nos Primeiros Grupos (Figura 41).

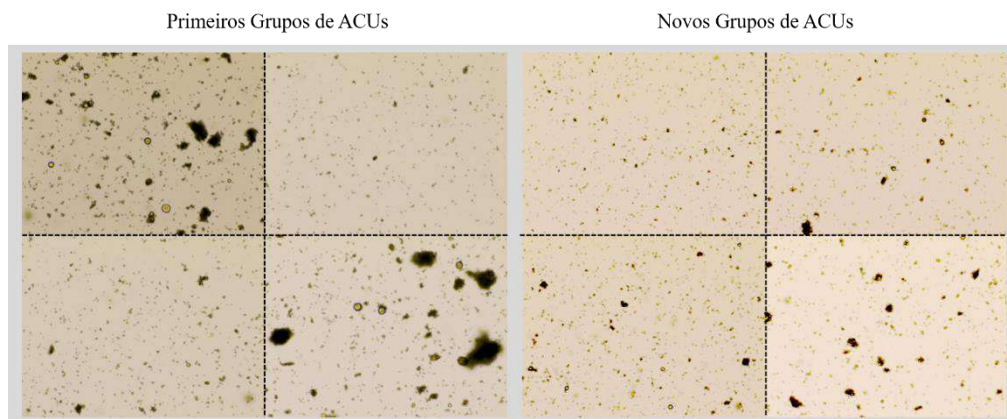


Figura 41: Imagem de microscopia ótica com ampliação de x200. Grumos menos nítidos e menos volumosos nos novos grupos.

Na visualização por MEV, percebe-se pouco PVA aderido às cápsulas de PCL. Percebe-se, ainda, que apresentam um aspecto esférico com porosidades (Figura 42).

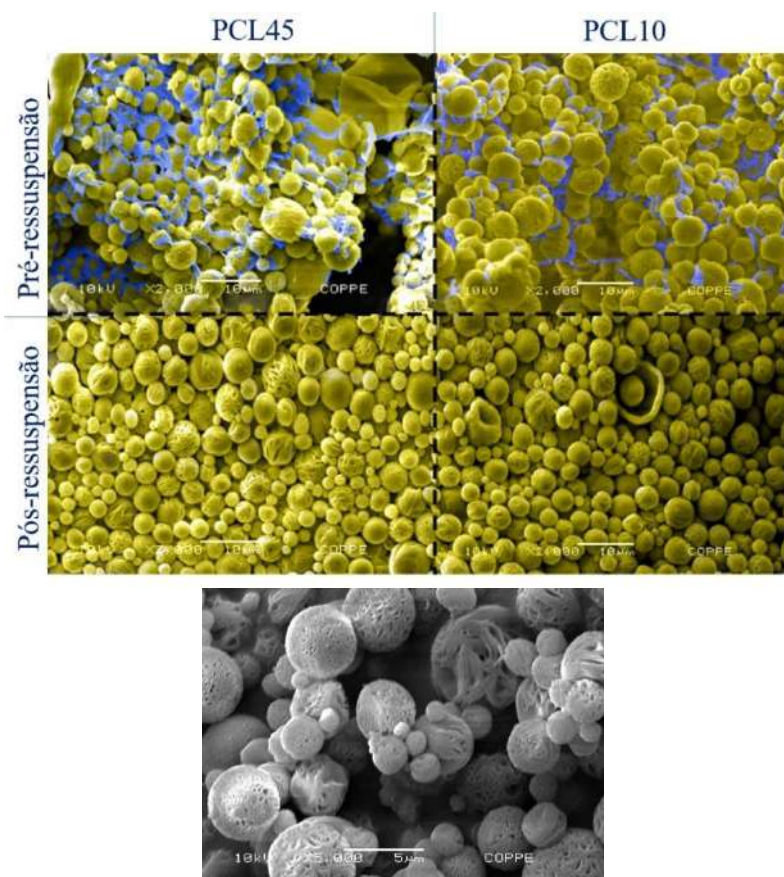


Figura 42: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa dos ACUs, referentes aos Novos Grupos. As imagens na parte superior mostram as cápsulas antes da ressuspensão em água e as abaixo mostram as mesmas cápsulas após a ressuspensão. As imagens da esquerda mostram PCL45 e à direita, PCL10. Todas as imagens são anteriores à filtração. A Imagem destacada ao fim corresponde a uma aproximação de x5000 para uma do grupo PCL45. PVA aderido (Azul) à cápsula dos ACUs (Amarelo).

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 obtido⁴⁵. Os ACUs produzidos com PCL10 tiveram suas concentrações estimadas em $0,84 \cdot 10^{10} \pm 0,14$ ACUs/g. Os produzidos com PCL45 tiveram suas

⁴⁵ Como os grupos iniciais produziram muitos grumos e, portanto, considerados inadequados, não foi possível avaliá-los nesta etapa.

concentrações estimadas em $1,06 \cdot 10^{10} \pm 0,20$ ACUs/g. As concentrações obtidas são suficientes para atingir a dose necessária para CEUS (cerca de 10^8 ACUs \cdot ml⁻¹) (HYVELIN et al., 2013).

A distribuição do diâmetro médio das duas populações de ACUs apresentaram valores de $6,4 \pm 1,3\mu\text{m}$ no percentil de 50% e $14,8 \pm 3,7\mu\text{m}$ no percentil de 90% e diâmetro máximo de $45\mu\text{m}$ (Figura 43). Com esses dados ficou nítida a necessidade de impor um limite ao tamanho máximo à população, ou seja, $10\mu\text{m}$. Como encontravam-se em um tamanho inferior a $10\mu\text{m}$, em sua grande maioria, isto pode ser resolvido com filtragem. No total foram produzidos três grupos de PCL45 e dois de PCL10.

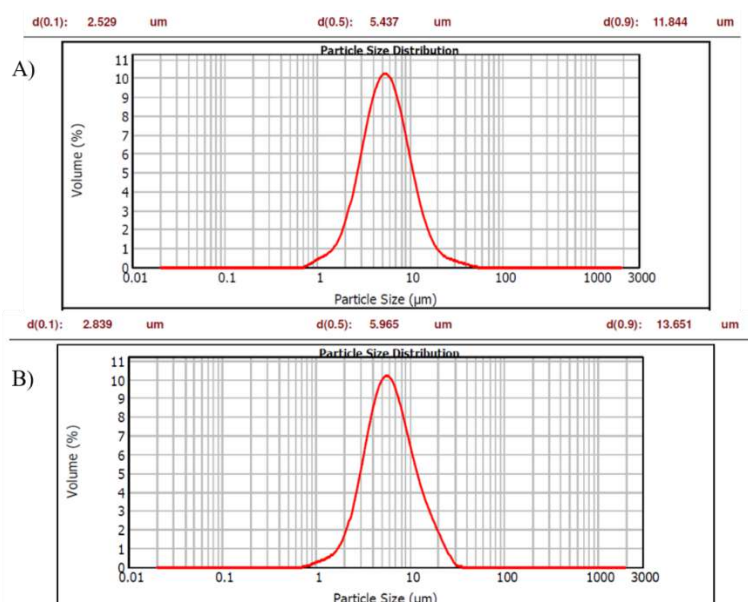


Figura 43: Curva da distribuição do tamanho dos ACUs referente a PCL45 (A) e PCL10 (B).

6.3 FILTRAGEM DOS ACUs

Os resultados da MEV em associação com as microscopias óticas e com os SLS revelaram a presença de PVA aderido aos ACUs, com a formação de eventuais grumos e ACUs acima do tamanho de $10\mu\text{m}$, assim, optou-se por um filtro de Náilon com abertura de poro de $10\mu\text{m}$. A escolha desta abertura se deve a três fatores principais: primeiro, partículas muito grandes podem

obstruir a luz dos vasos sanguíneos e resultar em embolias e lesões ao vaso e/ou ao tecido adjacente (TALU et al., 2007); segundo, é consenso na literatura atribuir o valor de 10 μ m como o limite superior para o tamanho de um ACU (TALU et al., 2007); terceiro, este é o tamanho em que seriam aproveitados na maior parte, cerca de 90% das partículas que foram geradas.

A primeira filtragem resultou em um filtrado translúcido, com raros ACUs em solução, vistos somente em microscopia ótica, provavelmente devido à presença do PVA externo aderido às cápsulas e ao próprio PVA não dissolvido na solução aquosa.

Para solucionar esta limitação, foi adotado um procedimento de ressuspensão e filtragem, descrito em 5.7 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 \cdot ml $^{-1}$, com uma taxa de aproveitamento médio de 82%, dentro do esperado pelos resultados do SLS. As imagens dos ACUs filtrados podem ser observados na Figura 44.

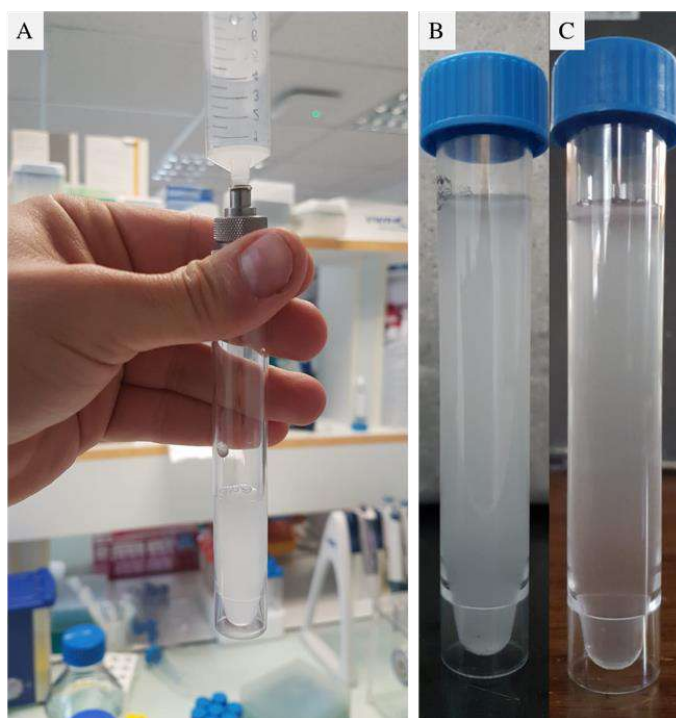


Figura 44: Filtragem dos ACUs. Em (A) processo sendo realizado, (B) e (C) ACUs após filtragem, sendo (B) logo após a filtração e (C), minutos depois.

6.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPESSURA DE CÁPSULA

O mapa da curva de retração obtido por AFM indicou 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 em 5.9 ESTIMATIVA DA ESPESSURA DAS CÁPSULAS, resultando em uma espessura de cápsula estimada de $24,8 \pm 1,7$ nm e $17,2 \pm 1,6$ nm para PCL10 e PCL45, respectivamente.

6.5 RETROESPALHAMENTO

Obtidas as FFTs das amostras de PCL e controles positivos (celulose), *phantom* de tecidos moles (BRUNETTE et al., 2001; MADSEN; FRANK; DONG, 1998) e controles negativos (água), pôde-se, primeiro, observar o comportamento do espectro dos sinais (Figura 45). Assim, percebe-se que para a referência, a água, não há sinais significativos de retroespalhamento, o que é coerente com este tipo de meio, que não possui elementos espalhadores. Os sinais de espalhamento referentes às amostras, são nítidos, coerentes com as frequências de excitação propostas, apresentando aspecto ruidoso e abertura de banda quanto maior for a frequência de excitação.

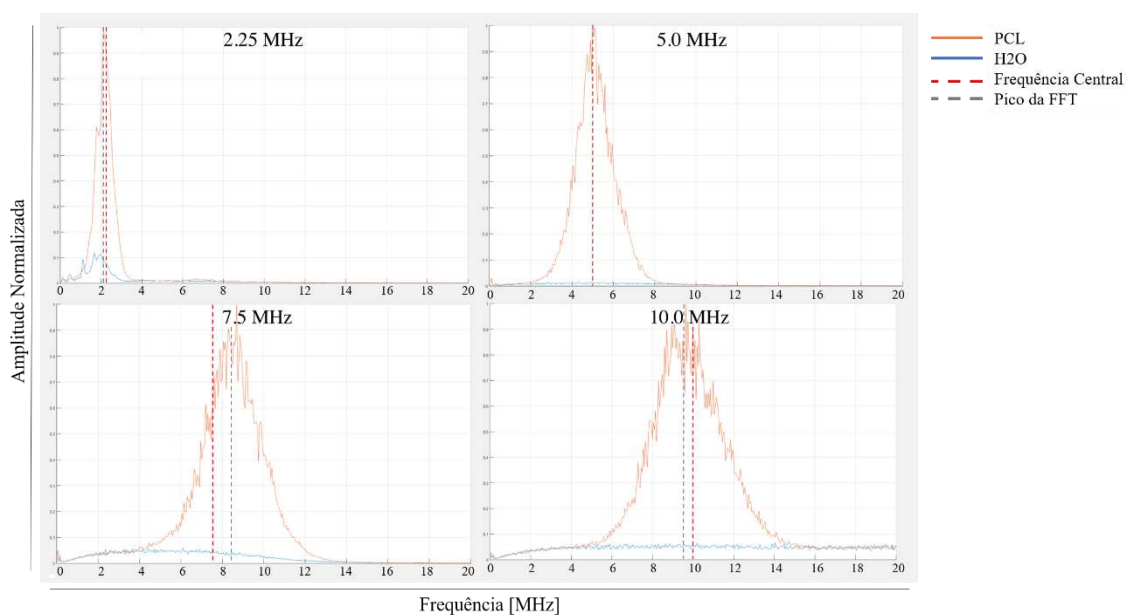


Figura 45: Sinais de módulo da FFT típicos de cada frequência avaliada. Em laranja o sinal da PCL e em azul o sinal da água. As linhas vermelhas correspondem a frequência central de excitação, de cada

respectivo transdutor utilizado. As linhas cinzas correspondem ao pico da FFT foi localizado. Os sinais apresentados foram obtidos da PCL45.

Em seguida, foi realizada um ajuste do tipo Spline, sobre as curvas de módulo de FFT. Tomou-se, então, o pico de cada curva interpolada e aplicou-se a Equação 9 para obtenção da SNR em dB em função da frequência, possibilitando, assim, comparar o comportamento de cada amostra de PCL (Figura 46). A Tabela 4 complementa, numericamente, o gráfico apresentado.

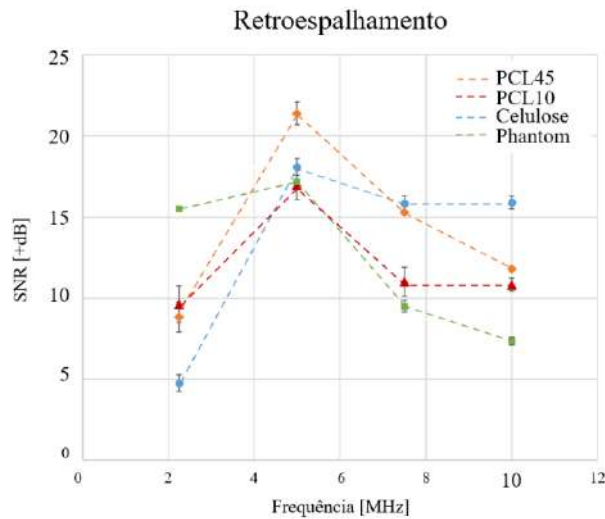


Figura 46: Padrão de retroespalhamento das amostras de PCL. As duas populações de PCL são dispostas, PCL10 e PCL45, vermelho e laranja, respectivamente. Os controles são dispostos em azul para a celulose e em verde para o *phantom*.

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 o da PCL10, sobretudo nas frequências superiores a 5 MHz. 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 7,5 MHz, se igualando à mesma em 7,5 MHz e sendo superada a partir desta. Assim, também, verifica-se que PCL45 possui o maior valor de retroespalhamento, +21,38 dB, a 5 MHz, sendo superior à celulose em +3,28 dB. Contudo, possui o menor valor a 2,25 MHz, +4,78. O *Phantom* de tecido apresenta a maior intensidade de retroespalhamento a 2,25 MHz, +15,36 dB, e decai significativamente após os 5 MHz, apresentando as menores intensidades de retroespalhamento das séries, +10,01 dB e +7,62 dB, respectivamente, provavelmente devido à atenuação característica de tecidos biológicos induzida, aqui, pelo uso da glicerina (MADSEN et al., 1978).

6.6 ESTABILIDADE TEMPORAL

A estabilidade temporal dos ACUs foi estudada seguindo o mesmo princípio do retroespalhamento, que 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 47), com a PCL45 sendo também analisada dia a dia (Figura 48). Esses resultados mostram que os ACUs perdem capacidade de retroespalhamento com o tempo, mesmo que a cápsula de PCL permaneça estável por mais de doze meses (IQBAL et al., 2015; METHACHAN; THANAPPRAPASR, 2017). A Tabela 5 mostra numericamente que a maior perda da intensidade de retroespalhamento na PCL45 ocorre nas primeiras 24 h, com queda de até 9,4 dB a 5MHz e 5,9 dB a 7,5 MHz. Todos os grupos tendem a estabilizar em uma intensidade de retroespalhamento similar no dia 7.

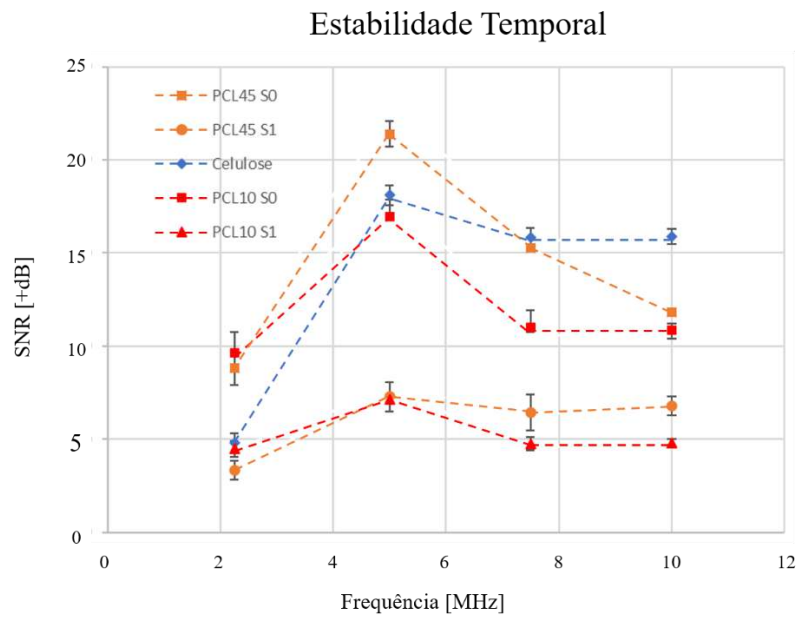


Figura 47: Análise da estabilidade temporal das amostras de PCL no intervalo de uma semana (S0 – Semana Zero e S1 – Semana Um). Em azul é apresentado o controle, celulose. Em vermelho é disposta a PCL10 no dia zero e pontilhada uma semana depois. Em laranja é disposta a PCL45, linha cheia no dia zero e pontilhada uma semana.

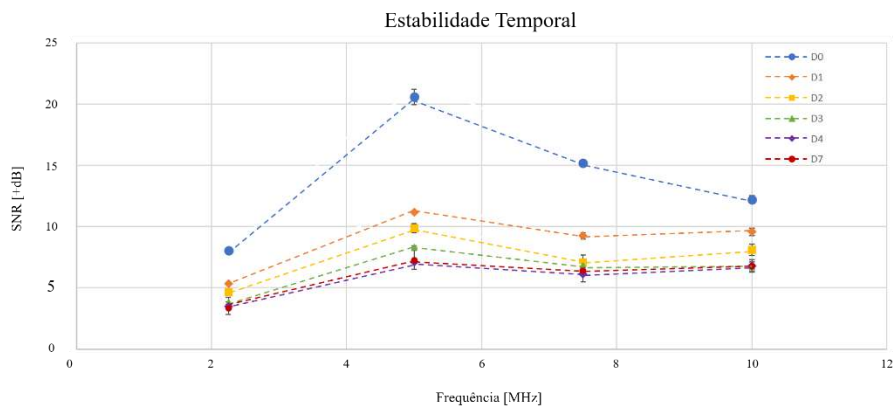


Figura 48: Análise da estabilidade temporal da amostra de PCL45 no intervalo de 7 dias. A linha Azul cheia representa o dia zero da amostra e as linhas pontilhadas, os demais dias.

Tabela 5: Valores do retroespalhamento referentes à análise de estabilidade das amostras de ACUs.

Amostra (Dia)		Acompanhamento Diário do Retroespalhamento em +dB			
		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 módulos de FFT, como os apresentados na Figura 49. Estes gráficos mostram a componente principal (1,1 MHz) do sinal e o correspondente 2º harmônico (2,2 MHz), utilizado para compor os gráficos da resposta dos ACUs à pressão acústica.

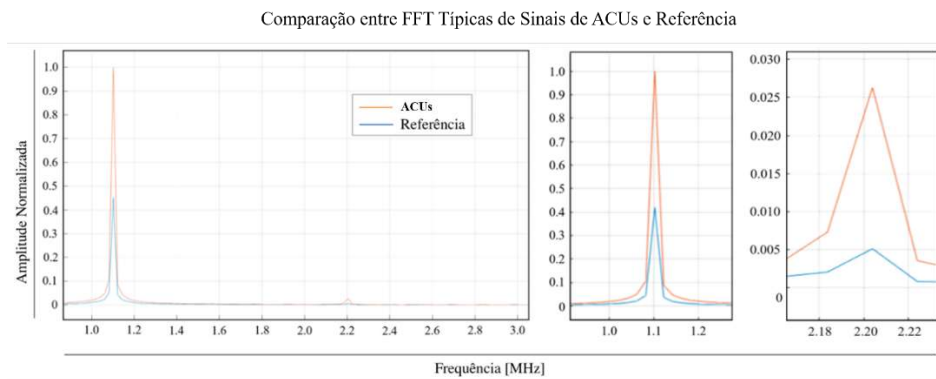


Figura 49: Comparação entre os sinais de FFT dos ACUs e da referência. O sinal sobreposto é apresentado na esquerda. Nos quadros ao lado deste são apresentados os sinais destacados do componente principal e do segundo harmônico, respectivamente. A figura destaca um sinal de FFT de uma PCL45.

A partir de gráficos como os da figura anterior, com os sinais do 2º harmônico da FFT apresentados foi gerada a Tabela 6 e o respectivo gráfico da resposta dos ACUs à pressão acústica (Figura 50).

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

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

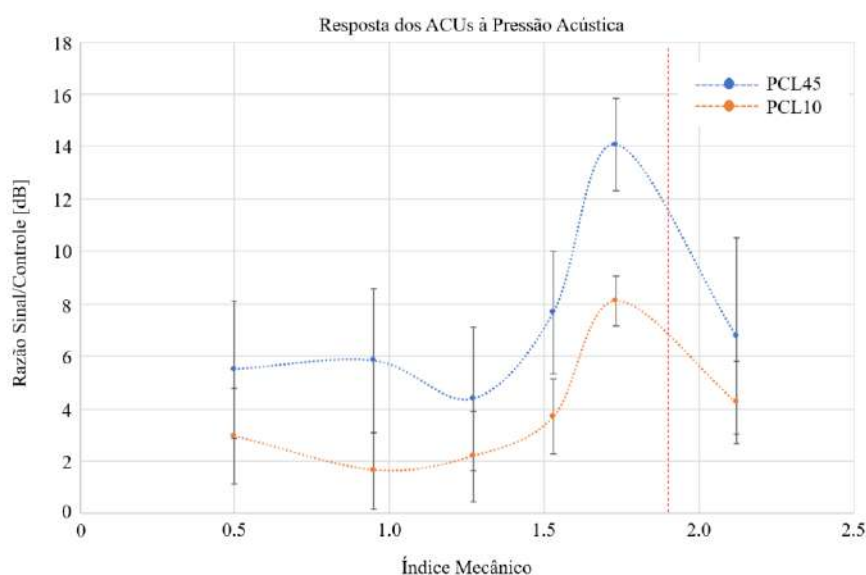


Figura 50: Gráfico da resposta acústica dos ACUs, em função do I.M. Em azul, a PCL45 e em laranja, a PCL10. A linha tracejada em vermelho demarca o valor limite de I.M. para a clínica (1,9).

Deste gráfico é possível perceber que a PCL45 exhibe uma resposta à pressão acústica de maior intensidade que a PCL10 para todos os valores de I.M. Observa-se ainda, que o pico para ambas as curvas ocorre para valor de I.M. próximo ao limite recomendado para a clínica; ou seja, um pouco abaixo de 1,9, com os valores de Razão Sinal/Controle (RSC) de +14,08dB e +8,11dB para PCL45 e PCL10, respectivamente.

DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta a discussão do que foi apresentado até aqui, a iniciar pela motivação da escolha de ACUs poliméricos de PCL dentre todas as opções possíveis, assim como da motivação de não escolher um ACU comercial já testado e aprovado pela FDA/EUA para desenvolvimento de novos campos de estudo. Em seguida, serão discutidos os resultados da tese, suas características e potenciais aplicações, 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 somente no contraste produzido por estas partículas, melhorando a interpretação de diagnósticos ao evidenciar estruturas anatômicas que antes possuíam baixo ou nenhum contraste entre si. Contudo, um dos maiores desafios para estes ACUs é a estabilidade temporal durante a circulação pelo sistema vascular. Uma forma de resolver este problema é com a substituição da cápsula fosfolipídica por uma polimérica (ODDO et al., 2017; SONG et al., 2018). Por outro lado e contrário a este argumento, as cápsulas feitas de polímeros tendem a ser mais rígidas e, por consequência, a 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 das 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 terapêutico destas cápsulas poliméricas, haja vista que partículas/esferas poliméricas são, em geral, a opção para estas modalidades terapêuticas (ODDO et al., 2017). Como mostrado neste trabalho, as cápsulas de PCL apresentaram módulos elásticos suficientemente baixos, para que suas cápsulas fossem de espessuras até dez vezes inferiores ao descrito na literatura, contribuindo para a ecogenicidade delas.

Como adjuvante à 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, podendo ser facilmente superiores a 12 meses (MORENO RAJA et al., 2019).

Ainda, cabe esclarecer que, até o momento, não existe ACU polimérico 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, apenas, como campos experimentais, até aqui (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018; OWEN et al., 2018).

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

7.2 PRIMEIROS ACUs PRODUZIDOS

Antes de iniciar qualquer teste em ACUs é importante observar se estes estão de acordo com o esperado para os procedimentos propostos. Para isso, a observação qualitativa a olho nu e por microscopia ótica são fundamentais, estas duas entregam uma resposta rápida sobre o estado das partículas produzidas (cápsulas esféricas formadas, pouca formação de grumos, em concentração suficiente, tamanhos uniformes e próximos a $10\mu\text{m}$). Em seguida, a avaliação em MEV, que pode ser mais demorada, é útil para trazer informações a respeito da estrutura morfológica das cápsulas, completando a observação inicial delas (íntegras, esféricas, com poros, com tamanhos não muito maiores que $10\mu\text{m}$, pouco PVA aderido às cápsulas).

Logo, ao ressuspender os ACUs dos primeiros grupos, em água, evidenciaram-se a presença de grumos, formando um aspecto flocular das partículas e o que se esperava era que estivessem com o aspecto turvo leitoso e não, em uma formação em flocos, com grumos nítidos em suspensão (BHATTACHARJEE, 2016; CHANAMAI; MCCLEMENTS, 2000).

A análise por microscopia óptica mostrou que os ACUs se encontravam no formato esférico, com tamanhos variados e, ainda, comprovou a forte presença de grumos. Embora esféricas, o que era esperado, a presença de grumos tornou inviável a continuação dos experimentos.

Contudo, a análise em MEV ainda era importante para obter as informações morfológicas, na tentativa de entender o que poderia ter ocorrido e se realmente eram cápsulas, como o desejado. A MEV exibiu a presença de cápsulas porosas com PVA aderido a estas. Não é raro encontrar relatos de PVA aderido às cápsulas poliméricas (ABDELWAHED et al., 2006), sendo 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 dos ACUs poliméricos e para proteger a estrutura das cápsulas durante o processo de liofilização (MORENO RAJA et al., 2019). Porém, observou-se que era necessário alterar procedimentos na metodologia de dupla emulsão para produção destas cápsulas.

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

Embora trabalhos recentes tendam a usar o acetato de etila 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), podendo representar uma vantagem adicional às ACUs poliméricas, que possuem, em geral, cápsulas mais resistentes que as fosfolipídicas.

7.3 NOVA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DOS ACUs

Como não foi 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 dele na água. Pois, o PVA é um polímero solúvel em água e suas propriedades dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise. Por ser rico em hidroxilas, há formação de ligações de hidrogênio fortes entre esses grupos intramoleculares e intermoleculares, é sabido que quanto maior a massa molar, mais forte são as ligações intra e intermoleculares e mais coeso é o polímero (ARANHA; LUCAS, 2001). Sendo assim, buscou-se um PVA de massa molar mais baixa e menor grau de hidrólise e, portanto, maior solubilidade em água. Essa alteração foi feita para facilitar a remoção da fase externa de PVA após o processo de fabricação das microcápsulas.

Com isto, durante a ressuspensão, os grumos foram mais facilmente desfeitos e a massa de PVA aderida à parte externa da cápsula foi 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 quando em conjunto com o congelamento a -60°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 ressaltar 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 dos 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 trealose⁴⁶, durante o processo de liofilização (ABDELWAHED et al., 2006) ou pode ser reduzido diretamente da síntese dos 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 PRODUZIDOS COM A NOVA ESTRATÉGIA – NOVO GRUPO

Para esta etapa foram produzidos 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 40 e 42 no item 6.2 OS NOVOS GRUPOS DE ACUs, exibiram uma foto representativa do produto final obtido após os processos de síntese das cápsulas, com partículas finas em forma de pó e na 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 ressuspendê-las 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 dos ACUs produzidos. De imediato percebeu-se que os novos grupos

⁴⁶ A trealose é um material caro e serviria apenas para a fase de liofilização, sendo ainda, necessário encontrar outro material para estabilizar a emulsão durante a fase de síntese. O material em questão não parece ser viável neste processo.

possuíam menos grumos e, também, 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 à MEV, para visualizar a morfologia das cápsulas. Ao comparar os dois grupos, foi possível identificar que o novo grupo apresentava menos PVA aderido às cápsulas de PCL, o que contribui para a melhor ressuspensão destas. Percebe-se, ainda, que 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 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 material⁴⁷. No total, foram produzidos dois grupos de PCL10 e três grupos de PCL45. Os ACUs produzidos com PCL10 tiveram sua concentração estimada em $0,84 \cdot 10^{10} \pm 0,14$ ACUs/g. Os produzidos com PCL45 tiveram suas concentrações estimadas em $1,06 \cdot 10^{10} \pm 0,20$ ACUs/g. As concentrações são suficientes para atingir a dose típica prevista como necessária para CEUS, na ordem de grandeza de 10^8 ACUs \cdot ml⁻¹ (HYVELIN et al., 2013). Contudo, foi utilizado, neste trabalho, a concentração de $2 \cdot 10^7$ ACUs/mL, 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⁻¹ (SCIALLERO et al., 2016), somado ao fato de que os ACUs, aqui propostos, não são fosfolipídicos e os estudos com ACUs poliméricos, à base de PVA, utilizaram a concentração de $1 \cdot 10^6$ ACUs/mL (H. CHEN; D. EVANGELOU; D. GRISHENKOV, 2019).

A distribuição do diâmetro médio da população de ACUs apresentou valores de $6,4 \pm 1,3\mu\text{m}$ com desvio padrão de 50% e $14,8 \pm 3,7\mu\text{m}$ com desvio padrão de 90%; diâmetro máximo de $45\mu\text{m}$. O ideal para ACUs é de que estes estejam abaixo de $10\mu\text{m}$, para que circulem livremente

⁴⁷ Como os grupos iniciais produziram muitos grumos, e, portanto, consideradas inadequadas, não foi possível avaliá-las nesta etapa.

pela luz dos vasos sanguíneos e não causem embolia ou sejam filtrados pelos pulmões (CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018). Portanto, foi nítida a necessidade de impor um limite ao tamanho máximo à população de ACUs. Como, encontravam-se em um tamanho inferior a 10µm, 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.

O tamanho das partículas somado aos resultados da MEV, mostrando a presença de PVA aderido às 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 dos ACUs ao campo de ultrassom e geram variações espúrias que podem dificultar as análises (CHANG et al., 2001; CHONG; PAPADOPOULOU; DAYTON, 2018)

A primeira filtração resultou em um filtrado translúcido com raros ACUs em solução e vistos somente em microscopia ótica. O motivo para este acontecimento foi atribuído à presença do PVA externo ainda aderido às cápsulas e ao próprio PVA não dissolvido na 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 adotar um passo a passo de ressuspensão e filtração, descrito no item 5.7 PREPARO E FILTRAGEM DAS AMOSTRAS, desta Tese. Este procedimento permite que o PVA seja solubilizado, liberando os ACUs para filtração, ao mesmo tempo que não produz, teoricamente, interferências significativas nos 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 do ACU em solução, relativamente longo, levando 24 h para reduzir pela metade. Esta discussão será retomada mais adiante.

Eventualmente 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⁻¹, 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 14,8 μ m de diâmetro.

O processo de filtragem por seringa é desaconselhado para ACUs de fosfolipídios, pois, com a frágil membrana, estes são extremamente sensíveis à pressão e, portanto, a pressão interna na seringa seria suficiente para provocar o rompimento das mesmas, contudo, tal limitação não existe para os feitos de PCL, que suportam este procedimento sem sofrer danos à estrutura (DIZEUX et al., 2016).

Após verificação de 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. Com isso, esperava-se evitar a formação dos poros. A Figura 51 exibe a imagem em MEV deste novo grupo de cápsulas sem poros. Contudo, este grupo não foi levado para os testes de FASE II, pois as cápsulas não foram minimamente testadas antes do período previsto e não foram feitas em quantidade mínima necessária.

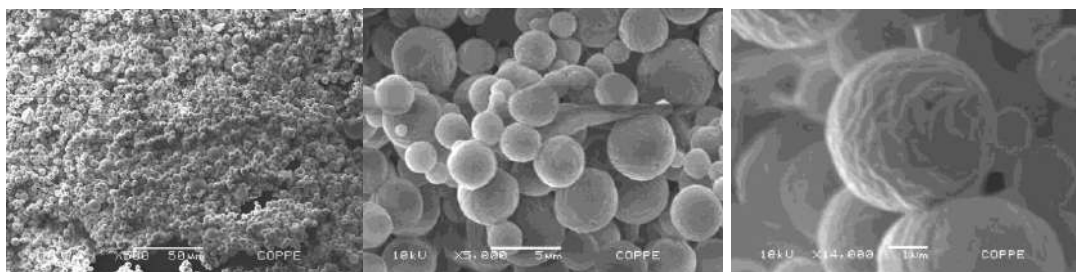


Figura 51: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura representativa dos ACUs feitos sob o procedimento de evaporação do solvente controlado.

7.7 AS CARACTERÍSTICAS DO RESTROESPALHAMENTO DOS ACUs

O sinal de retroespalhamento da celulose foi escolhido como de referência típico, conforme apresentado na literatura (BRUNETTE et al., 2001; MADSEN; FRANK; DONG, 1998), vale lembrar, contudo que, diferentemente dos ACUs, a celulose é formada de partículas sólidas e não, por 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 a frequência de excitação, esta abertura da banda ocorre por características inerentes aos transdutores (*broadband*). Para obtenção de uma curva do módulo de FFT suavizada, com menos interferência do ruído, foi ajustada uma curva polinomial do tipo Spline sobre os sinais de cada FFT (LI; LI; DONG, 2009).

Como foi dito nos 6.5 RETROESPALHAMENTO, Tabela 4, percebeu-se que existe uma diferença evidente entre o retroespalhamento da PCL45 e o da PCL10. Ambos começam mais ou menos no mesmo ponto, mas nos três pontos seguintes o da PCL45 tem valores maiores. A PCL45 também se destaca dos demais, por ser o único grupo de ACUs cujo retroespalhamento é maior do que o da referência, celulose e parece diminuir na direção da frequência 7,5 MHz. Assim, a PCL45 possui o maior valor de retroespalhamento, +21,4 dB, a 5,0 MHz, sendo superior ao da celulose em +3,3dB. A PCL45 também possui o menor valor de retroespalhamento, a 2,25 MHz, +4,8 dB, sendo superior apenas à referência. O *Phantom* de tecido apresenta a maior intensidade de retroespalhamento a 2,25 MHz, +15,4 dB e decai após os 5,0 MHz, apresentando as menores intensidades de retroespalhamento das séries, +10dB e +7,6dB, respectivamente, provavelmente devido à atenuação característica de tecidos biológicos, induzida aqui, pelo uso da glicerina (MADSEN et al., 1978).

O retroespalhamento da PCL45 é sempre superior à referência para as três primeiras frequências testadas, sendo inferior a esta, apenas, na frequência de 10 MHz. Ainda, a PCL45 é a que apresenta a melhor resposta na frequência de 5,0 MHz, sendo superior à referência, ao *Phantom* e à PCL 10. Já a PCL10 é inferior à referência nas três frequências maiores, sendo superior à referência apenas na frequência de 2,25 MHz, frequência na qual apresenta equivalência à PCL45. Comparando as PCLs, a PCL45 apresenta-se superior à PCL10 em todas as frequências testadas, principalmente nas frequências centrais. As comparações entre as

frequências testadas não guardam relação direta, pois as potências dos transdutores são diferentes entre si. Portanto, as comparações devem ser feitas, apenas, dentro de mesma frequência.

A PCL também produz contraste inferior aos 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 ACU, 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 DOS ACUs

Como já mencionado, 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 é o fator limitante desses ACUs, mas, sim, a presença dos poros nas cápsulas que permitem a difusão do ar do núcleo da cápsula para o meio externo (NOVARIO et al., 2005). Neste ponto, um fator visto como vantagem para o retroespalhamento e resposta à pressão acústica, inconvenientemente poderia ser o responsável pela redução do tempo de estabilidade destas ACUs no meio. Para avaliar isto, foi utilizada a mesma metodologia proposta para o retroespalhamento, podendo-se verificar a queda acentuada no retorno acústico nas primeiras 24 h, caindo progressivamente ao longo da semana, sugerindo que o ar contido nas cápsulas realmente sai por difusão, mas mesmo assim, este processo é dificultado pela presença da cápsula. Com isso, os ACUs poliméricos testados se apresentam mais estáveis que os fosfolipídicos, que duram em média de 10 a 20 min em solução, segundo a literatura (BARR, 2017; CAVALIERI et al., 2005), com tempo possível de aplicação também superior e com maior possibilidade de serem usados para técnicas de *drug-delivery* do que os fosfolipídicos. Ainda, ACUs por serem 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 DOS ACUs

Na maioria dos resultados não foi possível identificar os harmônicos de terceira ou quarta ordem do componente principal do sinal de 1,1 MHz, mas todos apresentaram o segundo harmônico (2,2 MHz). Cabe colocar, antes de discutir esses resultados, que a escolha da frequência de 1.1 MHz 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 5,0 MHz, 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 15,0 MHz (CALLIADA et al., 1998).

Dos gráficos formados 6.7 RESPOSTA À PRESSÃO ACÚSTICA, Figura 49, todos assemelharam-se a um processo de oscilação linear (STRIDE, 2009), comum entre ACUs poliméricos, porém distante de uma cavitação estável esperada e comum aos fosfolipídicos (Figura 52, adaptada de STRIDE, 2009). Isso se explica pelo fato de que cada agente de contraste se comporta de forma particular no campo de ultrassom, por exemplo, nos poliméricos, a cápsula espessa e rígida tende a atrapalhar esse processo de oscilação induzida pela pressão acústica. A espessura média de uma cápsula polimérica na literatura é de 100 a 200 nm (XIONG et al., 2011). As espessuras calculadas para os ACUs aqui produzidos, de 16 a 26 nm, ainda assim, apresentou-se insuficiente para esse tipo de evento. Some-se a isso, os módulos elásticos 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, menores do que os da literatura (ALLEN; KRUSE; FERRARA, 2001) e, sabendo que a PCL comporta-se de forma elástica em temperatura ambiente, tornando-o um polímero mais responsivo à pressão externa (ENGELBERG; KOHN, 1991a), mostram que a PCL tende a se destacar entre os polímeros, porém não se compara à estrutura de um fosfolipídio no quesito cavitação.

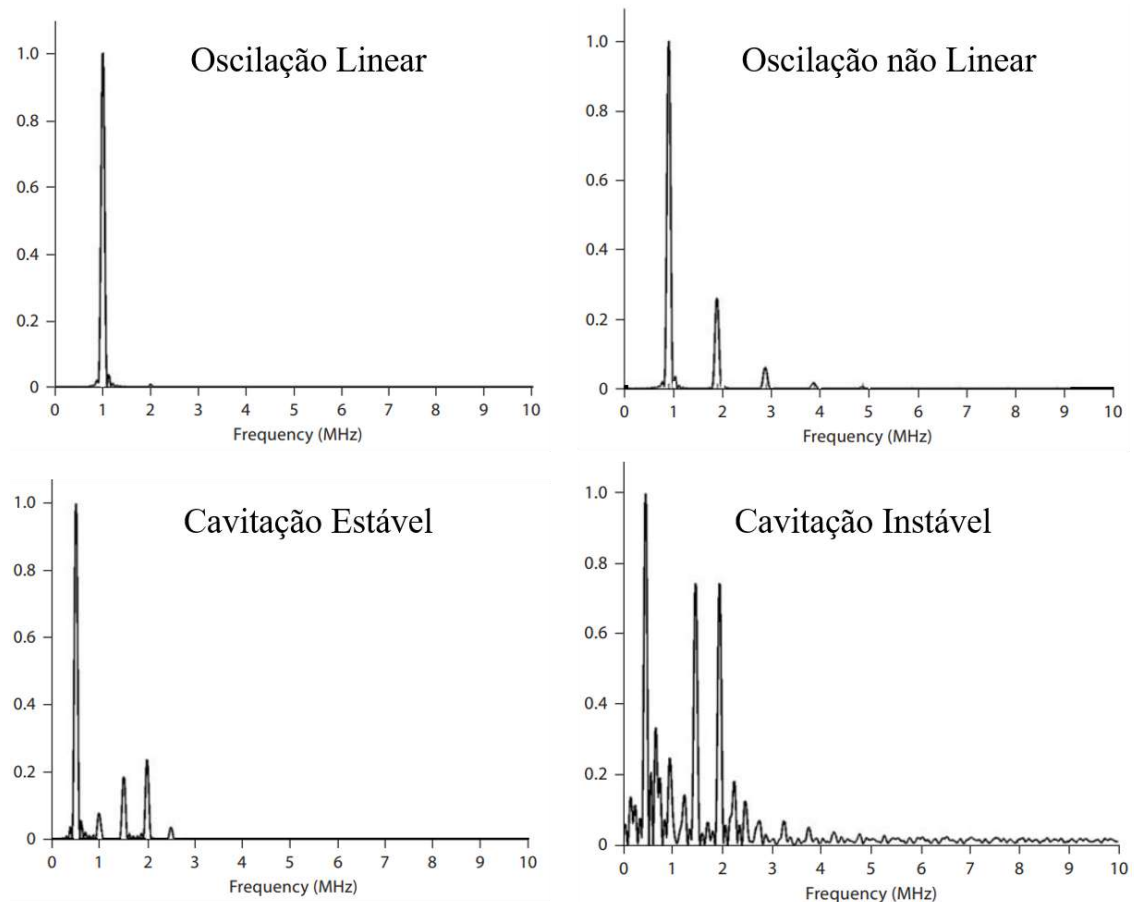


Figura 52: Comparação entre perfis de gráficos de FFT de sinais de respostas à pressão acústica de cápsulas fosfolipídicas. Superior esquerdo: Oscilação Linear, com um forte espectro da componente principal e um quase imperceptível pico no segundo harmônico. Superior direito: Oscilação não Linear, presença significativa dos harmônicos. Inferior Esquerdo: Cavitação Estável: Harmônicos e subarmônicos são visíveis. Inferior Direito: Cavitação Instável, apresentando um amplo espectro de frequências. Imagem adaptada de Stride 2009.

Comparando a PCL45 com a PCL10, é possível observar que a PCL45 exibe uma intensidade de pressão acústica superior à PCL10 em todas as análises. Observando o eixo do I.M. percebe-se que o maior valor de intensidade é obtido logo antes de atingir o valor limite aceitável para 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 mais exata, mas acredita-se que a pressão acústica, somada à fina espessura da cápsula porosa induza à 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 estariam sendo destruídas, não muito tempo depois de expostas.

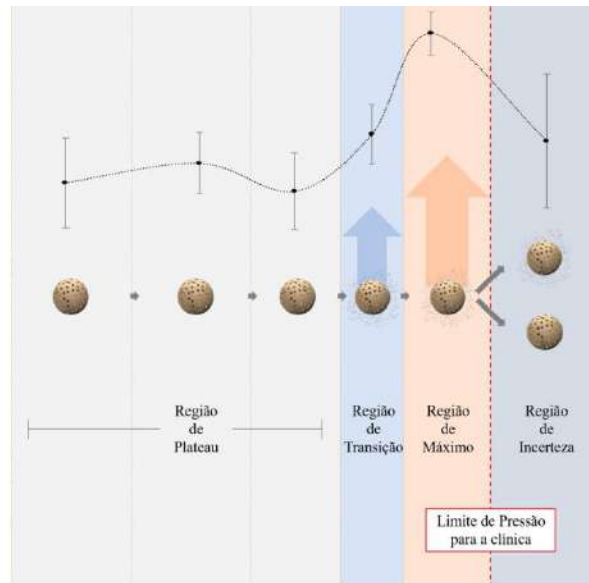


Figura 53: Ilustração descritiva da proposta de ação do campo acústico sobre os ACUs produzidos. Imagem de autoria própria.

CONCLUSÃO

Foram produzidos ACUs de PCL10 e PCL45 porosos, com maior estabilidade que ACUs fosfolipídicos e espessuras de cápsula mais finas do que os poliméricos já produzidos. Ambos com potencial para aplicações biomédicas, podendo ser destinados à ultrassonografia de contraste, *drug-delivery* e tratamentos com HIFU. Neste último, há duas possíveis utilidades, marcar o tecido alvo, assim como contribuir na produção de calor local. Os ACUs com PCL45 mostraram-se superiores aos com PCL10, 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, em tese, menos quebradiça que a PCL10, o que pode ter contribuído para os efeitos observados até aqui (Retroespalhamento e Resposta à Pressão Acústica). 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.

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 (ICES-11). v. 181, n. 2–3, p. 181–185, ago. 2010.
- ABEDALWAGA, M. et al. Mechanical Properties of Poly(ϵ -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^a 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.
- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. **Polímeros**, v. 11, n. 4, p. 174–181, 2001.
- 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 (ϵ -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.

CHENG, C.-Q. et al. Contrast-Enhanced Ultrasound for Evaluation of High-Intensity Focused Ultrasound Treatment of Benign Uterine Diseases. **Medicine**, v. 94, n. 16, 24 abr. 2015.

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.
- 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.
- ESHLAGHI, 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.
- 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.
- 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.
- KOVATCHEVA, R. et al. Ultrasound-guided high-intensity focused ultrasound treatment of breast fibroadenoma—a multicenter experience. **Journal of Therapeutic Ultrasound**, v. 3, 22 jan. 2015.
- 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(ϵ -caprolactone), poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2191–2197, 1 nov. 1996.
- LI, C.; LI, J.; DONG, P. **Spline Interpolation Based FFT Simulation Algorithm**. 2009 Fifth International Joint Conference on INC, IMS and IDC. **Anais...** In: 2009 FIFTH INTERNATIONAL JOINT CONFERENCE ON INC, IMS AND IDC. ago. 2009
- 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. et al. Tissue mimicking materials for ultrasound phantoms. **Medical Physics**, v. 5, n. 5, p. 391–394, out. 1978.
- 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- ϵ -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.
- RAGAERT, K. et al. **Bulk Mechanical Properties of Thermoplastic PCL**. 11 set. 2014
- 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(ϵ -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.