

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

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

*División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli,
C.P. 54740, Estado de México. E-mail: nestormm05@hotmail.com,
elizabethps75@yahoo.com.mx., ganemq@hotmail.com, quintana@servidor.unam.mx.*

RESUMEN

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

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

ABSTRACT

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

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

www.medigraphic.com

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

Hasta la fecha, muy pocos trabajos han sido publicados acerca del desarrollo de ACUS a escala nanométrica. Wheatley y cols.⁷ (2004) lograron separar por centrifugación poblaciones de tamaño nanométrico (450-690 nm) de una suspensión de microburbujas obtenidas mediante sonicación de una solución de Span[®] 60 y Tween[®] 80 en presencia de octafluoropropano. Sin embargo, la principal desventaja de estas "nanoburbujas" es su poca estabilidad *in vitro*. Adicionalmente, un trabajo reciente de estos mismos autores amplió la información acerca de este tipo de sistemas, pero sin poder solucionar el problema de estabilidad⁸. Asimismo, Bloch y cols.⁹ (2005) han descrito la preparación de

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

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

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

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

MÉTODOS

Preparación y caracterización de las nanopartículas

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

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

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

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

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

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

JEM-2010 (Japón) a 200 kV. La determinación de la densidad fue llevada a cabo mediante la separación de las nanopartículas en un gradiente de sílica coloidal formado *in situ* durante la ultracentrifugación en un rotor modelo 90Ti (Beckman, USA) a 5°C y 10,000 rpm durante 3 horas. En el tubo de centrifuga fueron colocados 7.5 mL de Percoll® al 45 % v/v en NaCl 0.15 M junto con 200 µL de la dispersión de las nanopartículas. En un tubo por separado, fueron colocados marcadores de densidad constituidos por micropartículas de diferentes densidades, adicionados bajo las mismas condiciones que las muestras y usados para la calibración externa de las bandas formadas. La distancia entre la parte superior del menisco y la banda (altura) fue determinada mediante un Vernier (Digitex®, USA). La densidad de las nanopartículas fue situada gráficamente mediante la interpolación de su altura en una curva obtenida a partir de las alturas de los marcadores de diferente densidad.

Evaluación *in vitro*

Se construyó un dispositivo formado por un tubo de ultracentrifuga (16 x 76 mm) de policarbonato, el cual se perforó con la finalidad de formar dos ventanas centradas y opuestas de 10 x 50 mm. Posteriormente, el tubo se forró con látex (obtenido de un guante quirúrgico) y fue sellado con un tapón de baquelita. El tapón de baquelita se perforó de tal forma que se introdujo una manguera de 2 mm de diámetro la cual se conectó a una jeringa de 20 mL (Figura 1). En dicho dispositivo se inyectaron 15 mL de la dispersión de nanopartículas en una concentración de aproximadamente 5x10⁸ partículas/mL determinada por medio del Nanosizer N4 Plus® (Coulter, USA). Después, el dispositivo fue sometido al ultrasonido por el lado de la ventana utilizando como amplificador una bolsa de acoplamiento (bolsa con agua) colocada debajo del dispositivo, el estudio se realizó con un equipo de US comercial en modo B marca Mitsubishi, equipado con un transductor convexo, trabajando a una frecuencia central de 3.5 MHz, la imagen obtenida fue impresa directamente del equipo, digitalizada y convertida en escala de grises a 8 bits utilizando un scanner Hewlett Packard Modelo 5100C a una resolución de 600 dpi. Dicha imagen fue analizada mediante el software Image v.1.35p (National Institutes of Health, USA), para ello se definió la región de interés (RDI) correspondiendo en lo posible a la ventana del dispositivo y se obtuvo el valor promedio de la escala de grises (VPEG), así como el histograma correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de las nanopartículas

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

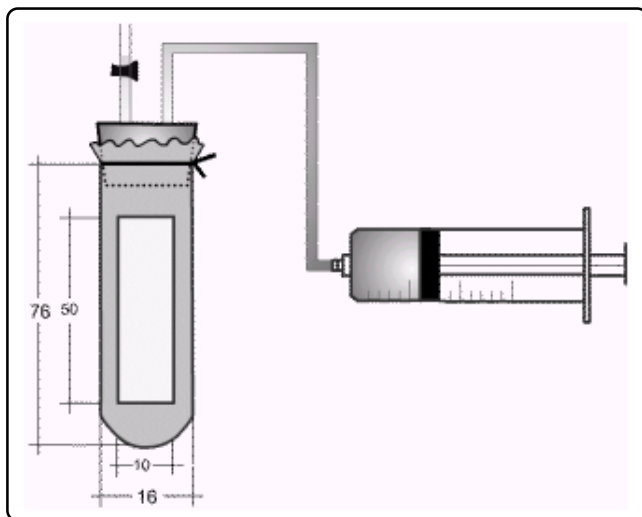


Figura 1. Esquema del dispositivo elaborado para la determinación de la ecogenicidad *in vitro* de las nanopartículas (unidades en mm).

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

Evaluación *in vitro*

Primeramente, con respecto al dispositivo podemos afirmar que

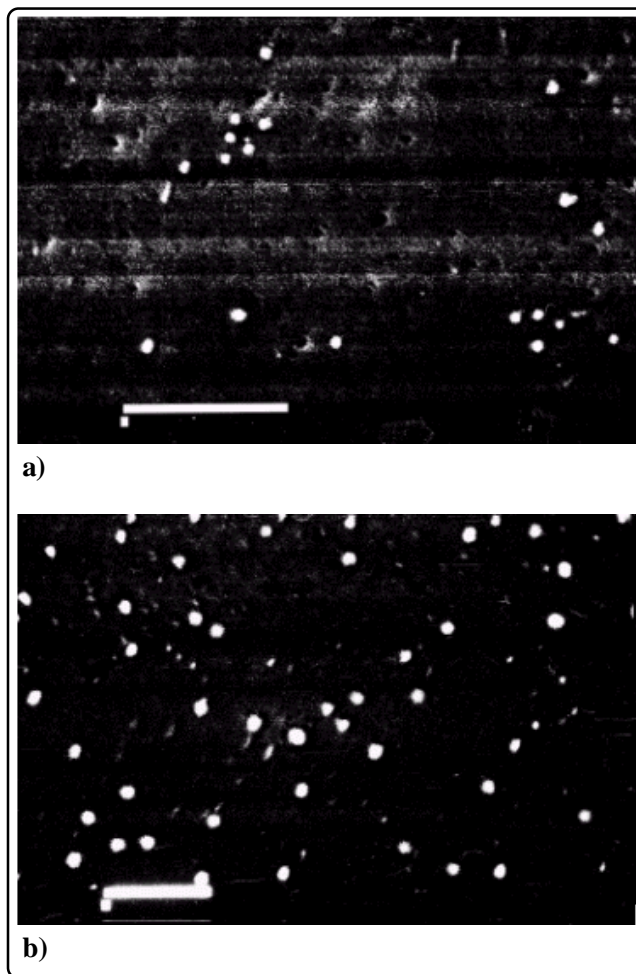


Figura 2. Micrografías obtenidas por MEB para las nanopartículas formadas por PLGA posteriores a la liofilización. a) Nanoesferas de PLGA; b) nanopartículas de PLGA formadas con 12.5% de naftaleno. 15000 x Barra= 1µm

éste cumplió con el objetivo planteado al permitir que las ondas ultrasónicas atravesaran la ventana creada y se lograra observar el líquido inyectado en su interior. En general, en las imágenes (Figura 5) se ve el dispositivo bien definido debido a que las ondas ultrasónicas rebotan principalmente en la región rígida del tubo. Entre las dos paredes que delimitan al tubo se observa una región de menor brillo la cual está constituida por el líquido inyectado, en esta sección es donde fue delimitada la RDI. La zona de alto brillo por debajo del dispositivo está dada por la bolsa de acoplamiento que es un sistema constituido por una bolsa de plástico la cual en su interior tiene agua, ésta sirve para amplificar estructuras que tienen bajo contraste o que son muy pequeñas.

El análisis de las imágenes digitalizadas se basó en obtener el valor promedio de escala de grises (VPEG) de la RDI. El VPEG es determinado asignándole a la imagen (la cual deberá estar en formato de escala de grises) valores desde 0 hasta 255, en donde

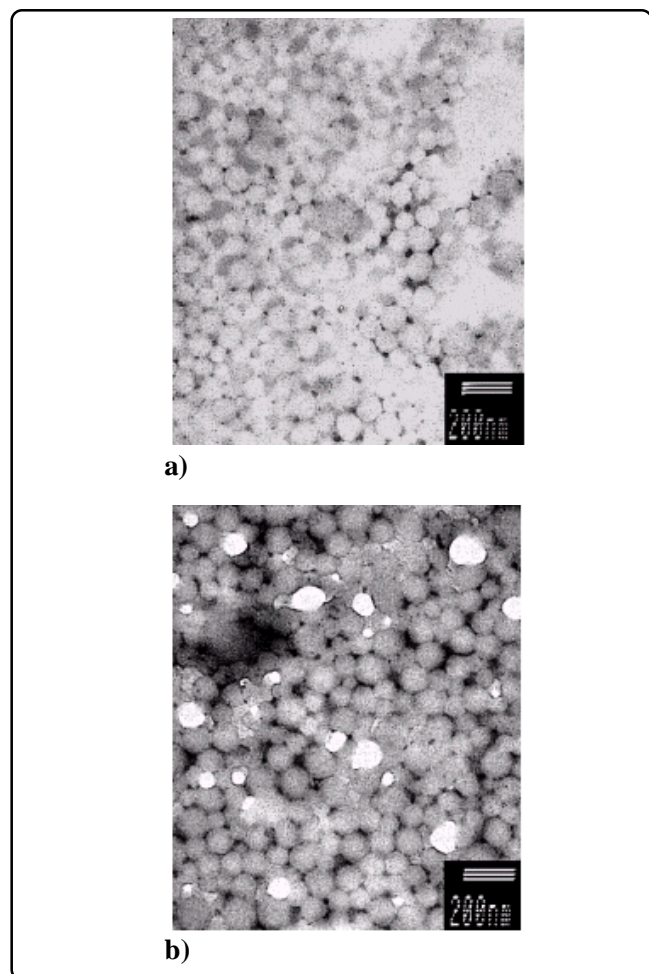


Figura 3. Micrografías obtenidas por MET para las nanopartículas formadas por PLGA posteriores a la liofilización. a) Nanoesferas de PLGA; b) nanopartículas de PLGA formadas con 12.5% de naftaleno. 20000 x.

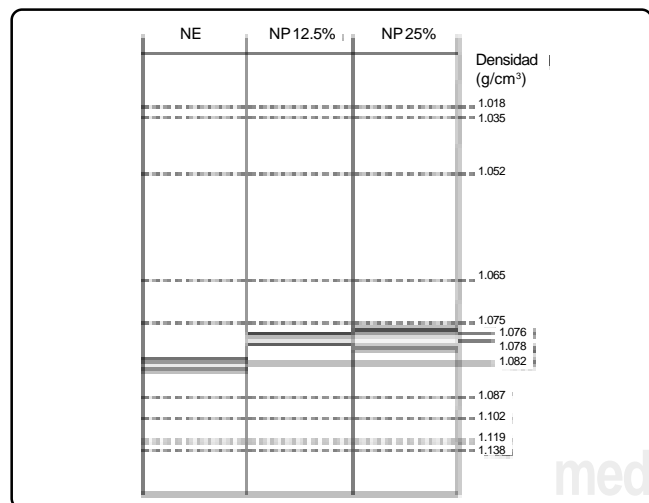


Figura 4. Bandas de las nanoesferas (NE), nanopartículas (NP) formadas con 12.5% y 25% de naftaleno y estándares externos generados con Percoll® mediante centrifugación.

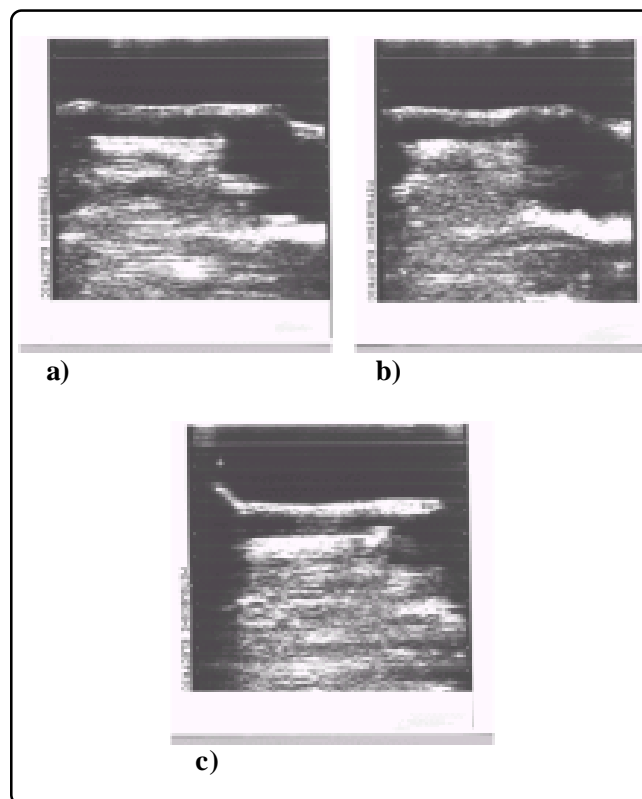


Figura 5. Ultrasonogramas digitalizados de los diferentes sistemas probados. a) Blanco (agua desionizada), b) nanoesferas; c) nanopartículas elaboradas con 25% de naftaleno.

0 corresponde al negro puro y 255 al blanco puro; de esta manera el VPEG es el tono promedio de los píxeles analizados. Es importante mencionar que el software utilizado, Image v.1.35p (National Institute of Health, USA), es un programa desarrollado para el análisis de imágenes médicas utilizado en técnicas como son: el US, la resonancia magnética nuclear, la tomografía computarizada, entre otras. El VPEG es equivalente a un índice que proporciona un estimado de la cantidad de color blanco o negro presente en la imagen. Por lo tanto, en este caso si el sistema es capaz de aumentar el contraste, éste se verá traducido en un aumento en el brillo y, por ende, en una mayor cantidad de tonos blancos, por lo que el VPEG deberá desplazarse a la derecha en comparación con un sistema de menor contraste. Este tipo de análisis ya ha sido utilizado en la determinación de la ecogenicidad de algunos ACUS como SonoVue® y algunos otros trabajos de investigación^{19,20}. La Figura 6 muestra los histogramas de frecuencia de la escala de grises para cada uno de los sistemas evaluados y en la Tabla I se reporta el VPEG. De manera general las tendencias de los sistemas analizados son en todos los casos distribuciones sesgadas hacia la izquierda. Además una característica importante es que contienen nanopartículas que presentan una distribución bimodal en donde una de estas modas corresponde al valor para el blanco puro. Por otra parte se observa que el VPEG del sistema blanco presenta el menor valor numérico, sin embargo, este valor puede

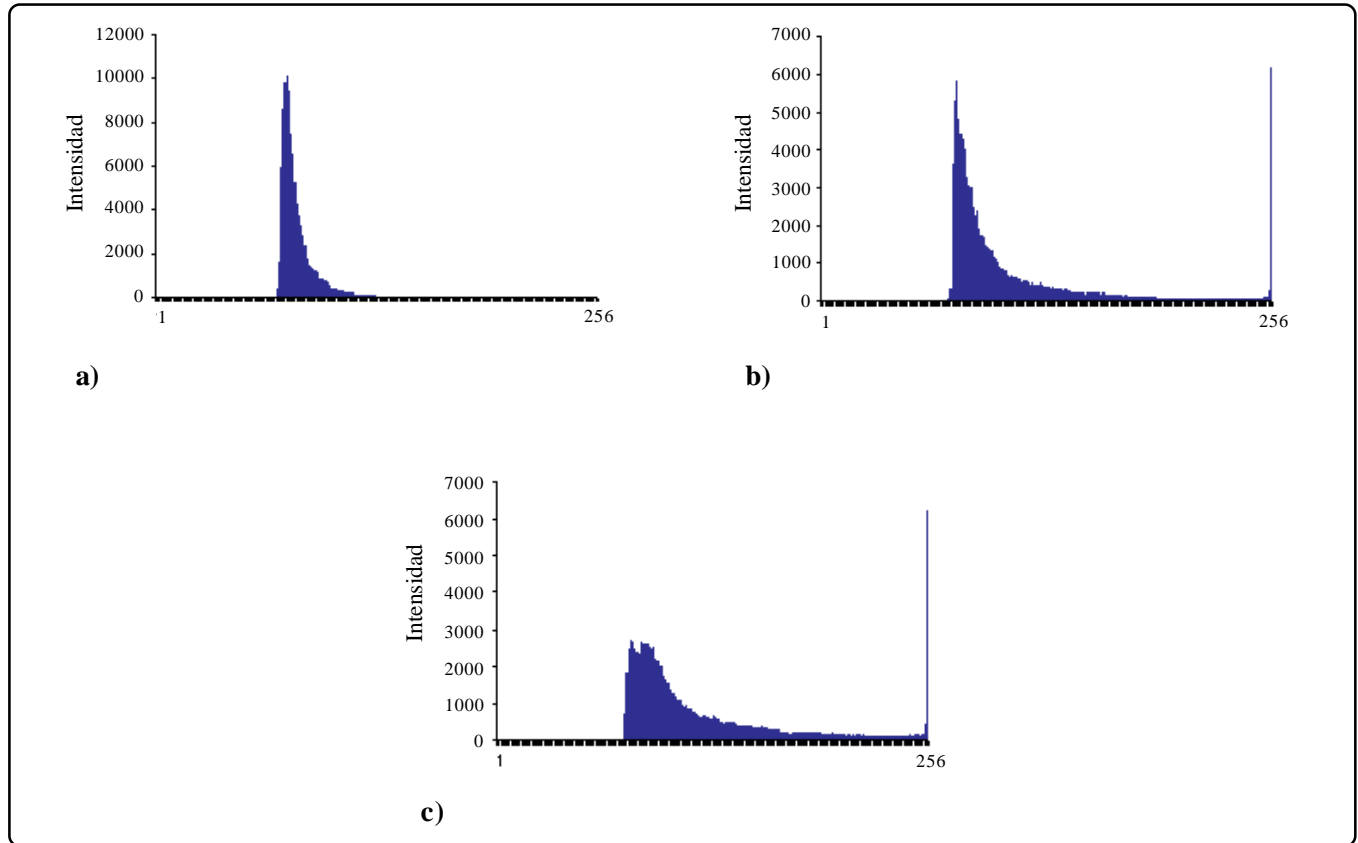


Figura 6. Histograma de distribución del valor asignado en la escala de grises para la RDI de cada uno de los ultrasonogramas analizados. a) Sistema blanco, b) nanoesferas; c) nanopartículas elaboradas con 25% de naftaleno.

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

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

considerarse alto teniendo en cuenta que se trata únicamente de agua, esto nos indica la presencia de artefactos, siendo el principal el asociado con la impresión de las imágenes de US, las cuales presentaron una serie de líneas blancas causadas por la impresora, sin embargo, esto fue constante para todas las impresiones. Considerando lo anterior se observa que las preparaciones formadas únicamente del polímero, es decir, las nanoesferas, presentan un ligero grado de ecogenicidad que es indicado por el aumento del VPEG en comparación con el sistema blanco. Esto puede considerarse normal, ya que las nanoesferas también pueden comportarse como dispersores acústicos. De igual manera se observa una ecogenicidad superior a la de las nanoesferas para el caso de las nanopartículas elaboradas con

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

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

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

corresponden a la mitad de los valores teóricos calculados.

Como puede observarse, el uso de los ACUS de tamaño submicrónico aún está en desarrollo y falta la comprensión de los fenómenos que permitan entender la relación entre la respuesta generada y el tamaño de partícula, además de los parámetros asociados a la composición de los ACUS.

CONCLUSIONES

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

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Tec. Rodolfo Robles y al IQ Iván Puente por su asesoramiento en la Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión, respectivamente. Al Tec. J. Ignacio García por el apoyo en la búsqueda bibliográfica.

REFERENCIAS

1. Lewin, P.A. *Quo vadis medical ultrasound?* *Ultrasonics* **42**, 1-7 (2004).
2. Nayaran, P. Development and characterization of hollow polymeric microcapsules for use as contrast agent for diagnostic ultrasound. Ph.D. Thesis, Drexel University (1999).
3. Morawski, A.M., Lanza, G.A. & Wickline, S.A. Targeted contrast agent for a magnetic resonance imaging and ultrasound. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 1-4 (2005).
4. Gramiak, P.M. & Shah, P.M. Echocardiographic of the aortic root. *Invest. Radiol.* **3**, 356-366 (1968).
5. Goldberg, B. Contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.* **26**, S33-S34 (2000).
6. Hwang, J., *et al.* Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments *in vivo*. *Ultrasound Med. Biol.* **31**, 553-564 (2005).
7. Wheatley, M.A. & Oeffinger, B.E. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics* **42**, 343-347 (2004).
8. Wheatley, M.A., Forsberg, F., Dube, N., Patel, M. & Oeffinger, B.E. Surfactant-stabilized contrast agent on the nanoscale for diagnostic ultrasound imaging. *Ultrasound Med. Biol.* **32**, 83-93 (2006).
9. Bloch, S.H., Short, R.E., Ferrara, K.W. & Wisner, E.R. The effect of size on the acoustic response of polymer-shelled contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.* **31**, 439-444 (2005).
10. Fessi, H., Devissaguet, J.P. & Puisieux, F. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d' une substance, sous forme de nanocapsules. *Eur. Patent* EP 274 961 (1998).
11. Quintanar-Guerrero, D., Alléman, E., Fessi, H. & Doelker, E. Preparation and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **24**, 1113-1117 (1998).
12. Leroux, J., Alléman, E., Doelker, E. & Gurny, R. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur J Pharm Biopharm.* **41**, 14-18 (1995).
13. The Merck Index. 17th ed. CD-ROM
14. El-Sherif, D. & Wheatley, W.A. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J. Biomed. Mater. Res.* **66A**, 347- 355 (2003).
15. Cui, W., *et al.* Preparation and evaluation of poly(l-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **73B**, 171-178 (2005).
16. Straub, J.A., *et al.* Porous PLGA microparticles: AI-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography. *J. Control. Release* **108**, 21-32 (2005).
17. Teixeira, M., Alonso, M.J., Pinto, M.M.M. & Barbosa, C.M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* **59**, 491-500 (2005).
18. Chawla, J.S. & Amiji, M.M., Biodegradable poly(o-caprolactone) nanoparticles tumor targeted delivery of tamoxifen. *Int. J. Pharm.* **249**, 127-138 (2002).
19. Goddi, A., *et al.* *In vitro* analysis ultrasound second generation contrast agent diluted in saline solution. *Radiol. Med.* **104**, 569-579 (2004).
20. Bekerddjian, R., *et al.* Potential of gold-bound microtubules as a new ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.* **28**, 691-695 (2002).
21. Jong, N., Hoff, L., Skotland, T. & Born, N. Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: Theoretical considerations and some measurements. *Ultrasonics* **30**, 95-103 (1992).
22. Wheatley, M.A. & Oeffinger, B.E. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics* **42**, 343-347 (2004).
23. Couture, O., *et al.* Investigating perfluorohexane particles with highfrequency ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* **32**, 73-82 (2006).
24. Wheatley, M.A., Forsberg, F., Dube, N., Patel, M. & Oeffinger, B.E. Surfactant-stabilized contrast agent on the nanoscale for diagnostic ultrasound imaging. *Ultrasound Med. Biol.* **32**, 83-93 (2006).