

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

*Sistemas poliméricos coloidais como meios de contraste
em Imageologia por Ressonância Magnética*

Sofia Ribeiro Gameiro

Coimbra, 2004

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

*Dissertação conducente à obtenção do grau de Mestre sob orientação
dos Professores Rogério Gaspar e Carlos Geraldes no âmbito do III
Curso de Mestrado em Tecnologias do medicamento*

Sofia Ribeiro Gameiro

Coimbra, 2004

Agradecimentos

Agradecer é um processo potencialmente injusto. O autor incorre sempre no risco de inadvertidamente omitir alguém. Para que tal não aconteça aqui fica registada a minha profunda gratidão a todos aqueles que, das mais diversas formas, me ajudaram ao longo de todo o percurso que aqui culmina, com a defesa desta tese. A todos vós, o meu sincero Obrigado. Bem hajam!

No entanto, houve pessoas de importância crucial em todo o processo e aos quais serei eternamente grata.

Ao saudoso Professor Doutor António Pinho Brojo o meu especial Obrigado por ter tornado possível o III Curso de Mestrado em Tecnologias do Medicamento.

Ao meu orientador Professor Doutor Rogério de Sá Gaspar por me ter permitido trabalhar na sua equipa, pela sua orientação e por todo o apoio que sempre demonstrou.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Carlos Geraldês por me ter proporcionado todas as condições inerentes à realização de grande parte do trabalho desta tese. Pelo seu apoio, orientação e enorme valia científica, o meu muito Obrigado.

À Professora Doutora Helena Gil por me ter proporcionado as condições necessárias à síntese dos quelatos de Gd(III).

À Professora Doutora Maria José Moreno pelo apoio na discussão do mecanismo de formação dos ligandos sintetizados neste trabalho.

À minha Amiga e colega Cristina Isabel Fonseca por tudo o que não é preciso escrever e que nem se pode descrever. À Margarida. Há coisas e pessoas que ficam connosco para sempre.

A todos os meus colegas e funcionários de ambos os laboratórios por todo o apoio e colaboração. Um especial Obrigado à Gabriela Duarte.

Aos meus amigos espalhados pelo planeta que sempre acreditaram que este trabalho era possível. Ao António, à Margarida, ao Tiago, à Jenny, à Jackie, à Elsa, ao Cyprian, à Rosa e ao Gabi e a tantos outros, Obrigado por estarem lá.

The last but certainly not the least, aos meus pais, por me apoiarem incondicionalmente desde sempre. Priceless!

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Índice</i>	<i>ii</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>v</i>
<i>Resumo</i>	<i>vi</i>
<i>Abstract</i>	<i>vii</i>
<i>Objectivos propostos e organização da tese</i>	<i>viii</i>

Capítulo 1 – *Introdução Geral*

1.1. Imageologia por Ressonância Magnética	2
1.1.1. Conceitos de Ressonância Magnética	2
1.1.1.i. Produção de magnetização líquida	3
1.1.1.ii. Magnetização e obtenção de contraste de imagem	7
1.1.1.iii. Relaxação de <i>spin</i>	9
1.1.2. Agentes de contraste em Imageologia por Ressonância Magnética	14
1.1.2.1. Agentes de contraste de Gd (III)	17
1.1.2.2. Mecanismo de acção dos quelatos paramagnéticos de Gd (III)	20
1.1.2.2.i. Relaxação da esfera interna	21
1.1.2.2.ii. Relaxação da esfera externa	22
1.2. Aplicação de sistemas coloidais em terapêutica e diagnóstico	24
1.2.1. Tipos de sistemas coloidais	25
1.2.1.1. Lipossomas	25
1.2.1.2. Nanopartículas	30
1.2.2. Sistemas coloidais em Imageologia	33
1.2.2.1. Sistemas coloidais em Imageologia por Ressonância Magnética	34
1.2.2.1.A. Lipossomas	35
1.2.2.1.B. Nanopartículas	41

Capítulo 2 - *Síntese e caracterização dos quelatos bisalquilamídicos de DTPA com Gadolínio*

2.1. Introdução	47
2.2. Materiais e métodos	49
2.2.1. Reagentes	49
2.2.2. Síntese e caracterização dos ligandos <i>bis</i> alquilamidas de DTPA	49
2.2.2.A. Síntese do derivado <i>bis</i> anidrido do DTPA	52
2.2.2.B. Síntese das <i>bis</i> alquilamidas de DTPA	52
2.2.2.B.i. <i>bis</i> metilamida de DTPA	52
2.2.2.B.ii. <i>bis</i> heptilamida de DTPA	53
2.2.2.B.iii. <i>bis</i> estearilamida de DTPA	53

2.2.2.C. Caracterização dos ligandos <i>bis</i> alquilamidas de DTPA e do intermediário <i>bis</i> anidrido do DTPA	55
2.2.3. Síntese e caracterização dos quelatos <i>bis</i> alquilamidas de DTPA com Gadolínio	55
2.2.3.A. Síntese dos quelatos <i>bis</i> alquilamidas de DTPA com Gadolínio	55
2.2.3.A.i. Gd-DTPA- <i>bis</i> metilamida	55
2.2.3.A.ii. Gd-DTPA- <i>bis</i> heptilamida	56
2.2.3.A.iii. Gd-DTPA- <i>bis</i> sestearilamida	56
2.2.3.B. Detecção de Gd(III) livre por complexação com Arsenazo III	57
2.2.3.C. Caracterização dos quelatos <i>bis</i> alquilamidas de DTPA com Gadolínio	57
2.2.3.C.1. ICP-AES	57
2.3. Resultados e Discussão	61
2.3.1. Caracterização do derivado <i>bis</i> anidrido de DTPA	61
2.3.2. Síntese e caracterização das <i>bis</i> alquilamidas de DTPA	62
2.3.2.i. <i>bis</i> metilamida de DTPA	62
2.3.2.iii. <i>bis</i> heptilamida de DTPA	65
2.3.2.iii. <i>bis</i> sestearilamida de DTPA	67
2.3.3. Síntese e caracterização dos quelatos <i>bis</i> alquilamidas de DTPA com Gd (III)	71
2.3.3.i. Gd-DTPA- <i>bis</i> metilamida	71
2.3.3.ii. Gd-DTPA- <i>bis</i> heptilamida	71
2.3.3.iii. Gd-DTPA- <i>bis</i> sestearilamida	72

Capítulo 3 - Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas coloidais

3.1. Introdução	75
3.2. Material e Métodos	82
3.2.1. Materiais	82
3.2.2. Metodologias gerais	82
3.2.2.1. Preparação das nanopartículas pelo método inicial	82
3.2.2.2. Liofilização das nanopartículas	83
3.2.2.3. Caracterização físico-química	83
3.2.2.3.i. Avaliação da distribuição granulométrica	83
3.2.2.3.ii. Avaliação da carga de superfície	83
3.2.2.3.iii. Avaliação da eficácia de encapsulação e teor de quelato	84
3.2.2.3.iii. Avaliação da recuperação de quelato na suspensão final de nanopartículas	84
3.2.3. Metodologias específicas	85
3.2.3.A. Ensaio preliminares	85
3.2.3.B. Ensaio de otimização da eficácia de encapsulação	86
3.2.3.B.I. Gd(DTPA- <i>bis</i> sestearilamida)	86
3.2.3.B.I.1. Aumento do peso molecular do polímero	86
3.2.3.B.I.2. Diminuição da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa	86
3.2.3.B.II. Gd(DTPA- <i>bis</i> morfinoetilamida)	87

3.2.3.B.II.A. Produção de nanosferas pelo método inicial	87
3.2.3.B.II.A.1. Influência do peso molecular do polímero	87
3.2.3.B.II.A.2. Influência do tipo de polímero	88
3.2.3.B.II.A.3. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa	89
3.2.3.B.II.B. Produção de nanosferas por modificação do método inicial	89
3.2.3.B.II.B.1. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa	90
3.2.3.B.II.B.2. Influência da concentração de polímero na fase orgânica	90
3.2.3.B.II.B.3. Influência da utilização conjunta de polímeros de peso molecular díspar	90
3.2.3.B.II.B.4. Influência da adição do lípido DOTAP à fase orgânica	90
3.3. Resultados e discussão	91
3.3.1. Ensaio preliminares	91
3.3.2. Ensaio de otimização da eficácia de encapsulação	99
3.3.2.I. Gd(DTPA- <i>bis</i> estearilamida)	99
3.3.2.I.1. Influência do aumento do peso molecular do polímero	99
3.3.2.I.2. Influência da diminuição da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa	101
3.3.2.II. Gd(DTPA- <i>bis</i> morfolinoetilamida)	101
3.3.2.II.A. Produção de nanosferas pelo método inicial	102
3.3.2.II.A.1. Influência do peso molecular do polímero	102
3.3.2.II.A.1.1. PLGA	102
3.3.2.II.A.1.2. PLA	106
3.3.2.II.A.2. Influência do tipo de polímero	109
3.3.2.II.A.3. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa	114
3.3.2.II.B. Produção de nanosferas pelo método inicial modificado	117
3.3.2.II.B.1. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa	117
3.3.2.II.B.2. Influência da concentração de polímero na fase orgânica	120
3.3.2.II.B.3. Influência da utilização conjunta de polímeros de peso molecular díspar	121
3.3.2.II.B.4. Influência da adição do lípido DOTAP à fase orgânica	124
Capítulo 4 - Avaliação do potencial de nanopartículas poliméricas como agentes de contraste em IRM	
4.1. Introdução	127
4.2. Material e métodos	129
4.2.1. Material	129
4.2.2. Métodos	129
4.3. Resultados e discussão	130
Capítulo 5 – Conclusão geral	136
Bibliografia	140

Abreviaturas

α -T, alfa-tocoferol;
B-DSPE, diestearoilfosfatidiletanolamina biotinizada;
Chol, colesterol;
Cu, Zn-SOD, superóxido-dismutase;
DC_{15:0}PG, dipentadecanoilfosfatidilglicerol;
DCP, dicetilfosfato;
DMPE-PEG₂₀₀₀, dimiristoilfosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 2000;
DOTAP, cloreto de 1,2-dioleoil-3-propanoato de trimetilamónio
DPPC, dipalmitoilfosfatidilcolina;
DSPC, diestearoilfosfatidilcolina;
DSPE-PEG₅₀₀₀, diestearoilfosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 5000;
DSPG, diestearoilfosfatidilglicerol;
DTPA, ácido dietilenotriamino pentacético;
Gadofrina-2, Gd₂-[mesoporfirina-IX-13,17-*bis*(2-oxo-4,7,10,10-tetra-(carboxilatometil)-1,4,7,10-tetraazadecil)-diamida];
Gd(DTPA-HPA₂), Gd-(dietilenotriaminapentacetato-*bis*heptilamida);
Gd(DTPA-MA₂), Gd-(dietilenotriaminapentacetato-*bis*metilamida);
Gd(DTPA-MEA₂), Gd-(dietilenotriaminapentacetato-*bis*metoxietilamida);
Gd(DTPA-MPEA₂), Gd-(dietilenotriaminapentacetato-*bis*morfolinoetilamida);
Gd(DTPA-SA), Gd-(dietilenotriaminapentacetato-monoestearilamida);
Gd(DTPA-SA₂), Gd-(dietilenotriaminapentacetato-*bis*estearilamida);
Gd-(EOB-DTPA), Gd-etoxibenzil-dietilenotriaminopentacetato.
Gd-ABE-DTTA, Gd-[N-(2-butiloxietil)-N'-(2-etiloxietil)-N,N'-*bis*[N'',N''-*bis*(carboximetil)acetamida]-1,2-etanodiamina];
HBsAg, antigénio de superfície do vírus da Hepatite B;
HMPAO, oxima da hexametilpropilenamina;
HSPC, fosfatidilcolina hidrogenada de soja;
Mn(DTPA-SA), Mn-(dietilenotriaminapentacetato-monoestearilamida);
Mn(EDTA-DDP), Mn-[etilenodiaminatetracetato-mono(dihidroxiopropildecil)amida];
MTP-PE, muramiltrifosfato-fosfatidiletanolamina;
N-SLBA, N-estearilactobionamida;
OOPS, dioleoilfosfatidilserina;
PBCA, poli-(cianoacrilato de butilo);
PC, fosfatidilcolina;
PE, fosfatidiletanolamina;
PHCA, poli-(cianoacrilato de hexilo);
POPC, palmitoiloleoilfosfatidilcolina;
PS, fosfatidilserina;

Resumo

A maioria dos meios de contraste utilizados na prática clínica para Imageologia por Ressonância Magnética são quelatos de Gd(III) de baixo peso molecular. Estes agentes de contraste são caracterizados por inespecificidade tecidual e baixa relaxividade T1, o que implica a administração de doses elevadas e limita a sensibilidade desta técnica de diagnóstico. O objectivo principal deste trabalho foi, pois, testar a hipótese de que a encapsulação de quelatos de Gd(III) em nanopartículas poliméricas coloidais aumentaria a sua relaxividade, sugerindo a possibilidade deste tipo de formulações poder ser utilizado no desenvolvimento de meios de contraste vectorizados para populações celulares específicas.

Para testar esta hipótese, recorreu-se aos poli (α -hidroxiácidos) PLA (ácido poli-láctico) e PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico)), dois tipos de polímeros biodegradáveis e autorizados para administração endovenosa. Foram ainda realizados alguns estudos com o polímero poli (ϵ -caprolactona). Os quelatos de Gd(III) utilizados incluíram cinco Gd(DTPA-*bis*alquilamidas), três das quais foram sintetizadas no âmbito deste trabalho e possuem cadeias laterais alquílicas saturadas de hidrofobicidade crescente. A formulação mais promissora foi avaliada por relaxometria a campo fixo (9 MHz) e a 20°C, obtendo-se a sua relaxividade T1.

A encapsulação dos quelatos de Gd(III) com hidrofobicidade crescente em nanopartículas não se traduziu num aumento linear da eficácia de encapsulação e teor de quelato associado. No entanto, a interacção do quelato GdDTPA-*bis*estearilamida com PLA 90 traduziu-se numa eficácia de encapsulação de 38.9%, indiciando a potencialidade para estudos futuros.

Os principais resultados obtidos com o quelato GdDTPA-*bis*morfolinoetilamida indicam que a sua encapsulação em nanopartículas de poliésteres é beneficiada pela presença de polímeros de baixo peso molecular (PM=6000) em associação com polímeros de elevado peso molecular (PM=63600). A utilização conjunta destes polímeros de PLGA permitiu encapsular eficazmente 45% do quelato, evitando as elevadas perdas de quelato registadas com outras formulações de poliésteres. Esta formulação permitiu aumentar a relaxividade do quelato 7 vezes, obtendo-se um valor médio de $r1$ médio de $37.1 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$. Os resultados obtidos foram descritos estatisticamente pelos parâmetros média e desvio padrão.

Os resultados aqui apresentados indicam o potencial de sistemas nanoparticulares de poliésteres como meios de contraste em IRM. As suas características de relaxividade e o seu potencial para vectorização cito-específica tornam este sistema coloidal muito promissor para o desenvolvimento de meios de contraste mais eficazes, mais sensíveis e com características farmacocinéticas moduláveis. Estas características permitiriam obter um diagnóstico mais precoce e com informação imageológica mais detalhada, aumentando a probabilidade de sobrevivência e/ou tratamento mais eficaz.

Abstract

Most of the MRI contrast agents available on the clinic setting are low molecular weight Gd(III) chelates. Their lack of tissue specificity and relatively low T1 relaxivity results in the use of high doses and limits the diagnostic sensitivity. The main goal of this project was to test the hypothesis that the encapsulation of Gd(III) chelates into colloidal polymeric nanoparticles would increase its T1 relaxivity, suggesting the possibility that this type of formulations could be used in the development of targeted contrast agents to specific cellular populations.

To test this hypothesis we used the poly (α -hydroxyacids) PLA (poly-lactic acid) and PLGA (poly(lactic-*co*-glycolic)), two types of biodegradable polymers authorized for intravenous administration. In addition, some studies were also conducted with the polymer poly (ϵ -caprolactone). The Gd(III) chelates used included 5 Gd(DTPA-*bis*alkylamides), in which 3 of them were synthesized in the context of this project and had saturated alkyl lateral chains of increased hydrophobicity. The most promising formulation was further studied by single field relaxometry (9 MHz) at 20°C, and its T1 relaxivity was assessed.

The encapsulation of Gd(III) chelates of increased hydrophobicity did not result neither in a linear increase of encapsulation efficiency nor in the increase of chelate amount associated. However, the interaction between GdDTPA-*bis*stearylamine and PLA 90 resulted in an encapsulation efficiency of 38.9%, indicating its promise for further study.

The main results obtained with GdDTPA-*bis*morpholinoethylamine indicated that the concomitant presence of low (MW=6000) and high (MW=63600) molecular weight polyesters benefits the chelate encapsulation into polymeric nanoparticles. The simultaneous use of these PLGA polymers allowed a 45% chelate incorporation, avoiding the high chelate losses seen with other nanoparticles' formulations. This association resulted in a 7 fold increase of T1 relaxivity, with an *r1* mean value of 37.1 s⁻¹mM⁻¹. All results were statistically described by its mean and standard deviation, where applicable.

The results described herein indicate the potential of polyester's nanoparticles as MRI contrast agents. Their relaxivity characteristics and their targeting potential rise promise into the development of more efficacious, more sensitive and pharmacokinetic flexible contrast agents. Such characteristics would allow for an earlier diagnostic with more detailed imaging information, improving the odds of patient's best treatment and/or survival.

Objectivos propostos e organização da dissertação

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese visou atingir os seguintes objectivos específicos:

i) sintetizar quelatos de gadolínio (Gd[III]) de hidrofobicidade adequada à sua encapsulação em nanopartículas poliméricas de poliésteres;

ii) desenvolver nanopartículas poliméricas coloidais contendo quelatos de Gd(III) com o intuito de estudar o seu potencial como meios de contraste em Imageologia por Ressonância Magnética (IRM);

iii) estudar a potencialidade das formulações desenvolvidas anteriormente como meios de contraste para IRM através da avaliação das suas características relaxométricas.

Neste contexto, esta tese está dividida em 5 capítulos. No primeiro capítulo é feita uma revisão de conjunto que foca os aspectos considerados mais relevantes para a discussão do trabalho efectuado.

O segundo capítulo descreve todo o trabalho de síntese e caracterização dos quelatos de Gd(III) ou seja, o primeiro objectivo proposto nesta tese.

No capítulo III está descrito todo o trabalho de desenvolvimento tecnológico das formulações de nanopartículas poliméricas coloidais com Gd(III) encapsulado.

A caracterização relaxométrica preliminar das formulações encontra-se exposta no capítulo 4.

O capítulo 5 expõe as principais conclusões globais de todo o trabalho desenvolvido no âmbito desta tese de Mestrado.

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1. Imageologia por Ressonância Magnética

A imageologia por ressonância magnética é um fenómeno complexo cuja abordagem aprofundada está para além do âmbito desta tese. Como tal, este capítulo é iniciado com uma exposição muito simplificada desta área e dos mecanismos envolvidos na geração do contraste de imagem. Esta exposição é baseada principalmente em vários trabalhos publicados nesta área (Gil e Geraldês, 1987; Mitchell, 1999; Brown e Semelka, 1999; Stark e Bradley, 1999) não deixando de ser no entanto, apenas um sumário breve e simplista.

1.1.1. Conceitos de Ressonância Magnética

O fenómeno de ressonância magnética baseia-se na interacção entre um campo magnético externo e um núcleo que possua *spin*. O *spin* nuclear ou, mais concretamente, o seu momento angular, é uma das várias características intrínsecas de um átomo e o seu valor depende da composição atómica específica. Cada elemento da tabela periódica com excepção do árgon e do cério tem pelo menos um isótopo natural possuidor de *spin* (Stark e Bradley, 1999). Como tal, praticamente todos os elementos podem ser examinados por ressonância magnética.

A tabela 1 mostra alguns dos elementos geralmente presentes em sistemas biológicos, bem como as respectivas constantes de interesse em ressonância magnética nuclear.

O núcleo de hidrogénio, ^1H , consiste num único protão, possui um *spin* de $\frac{1}{2}$ e é o isótopo de hidrogénio mais abundante. Este núcleo é muito sensível ao campo magnético devido à sua elevada susceptibilidade magnética, γ . O corpo humano é composto por tecidos que contêm basicamente água e lípidos, os quais contêm hidrogénio (Gil e Geraldês, 1987). Como tal, o núcleo de hidrogénio é a escolha natural em imageologia por ressonância magnética.

Tabela 1. Constantes para núcleos específicos com interesse biológico

Elemento	Composição Nuclear		<i>Spin</i>	Razão giromagnética γ (MHz T ⁻¹)	Abundância Natural (%)	ω a 1.5T (MHz)
	Protões	Neutrões				
¹ H, Prótio	1	0	½	42.5774	99.985	63.8646
² H, Deutério	1	1	1	6.53896	0.015	9.8036
³ He	2	1	½	32.436	0.000138	48.6540
¹² C	6	6	0	0	98.90	0
¹³ C	6	7	½	10.7084	1.10	16.0621
¹⁴ N	7	7	1	3.07770	99.634	4.6164
¹⁵ N	7	8	½	4.3173	0.366	6.4759
¹⁶ O	8	8	0	0	99.762	0
¹⁷ O	8	9	5/2	5.7743	0.038	8.6614
¹⁹ F	9	10	½	40.0776	100	60.1164
²³ Na	11	12	3/2	11.2686	100	16.9029
³¹ P	15	16	½	17.2514	100	25.8771
¹²⁹ Xe	54	75	½	11.8604	26.4	17.7906

Adaptado de Ian Mills, ed., *Quantities, Units, and Symbols in Physical Chemistry*, IUPAC, Physical Chemistry Division, Blackwell, Oxford, UK, 1989.

i) produção de magnetização líquida

Os núcleos de carga positiva constituem *per se* um campo magnético local, ou momento magnético. Este momento magnético associado aos protões nucleares é fundamental em ressonância magnética. Um núcleo possuidor de *spin* pode ser visualizado como sendo um vector com um eixo de rotação próprio e com orientação e magnitude, definidas (figura 1).

O campo magnético associado ao *spin* é paralelo ao eixo de rotação do núcleo. Esta orientação do *spin* nuclear bem como as alterações que o núcleo experimenta durante um exame de ressonância magnética constituem a base do sinal que se obtém (Mitchell DG, 1999).

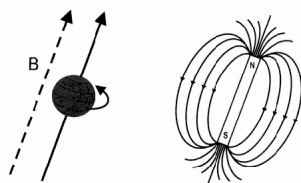


Figura 1. A rotação de um núcleo de carga positiva produz um campo magnético orientado paralelamente ao eixo de rotação. Este arranjo é análogo ao produzido por uma barra magnética na qual o campo magnético se considera orientado do pólo sul para o pólo norte. Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

Considere-se um volume arbitrário de tecido biológico na ausência de um campo magnético externo. Cada protão do tecido tem um vector de *spin* de igual magnitude. No

entanto, os vectores de *spin* estão orientados aleatoriamente em todas as direcções. A adição de todos estes vectores produz uma soma nula, ou seja, não se observa qualquer magnetização líquida no tecido em análise (figura 2).

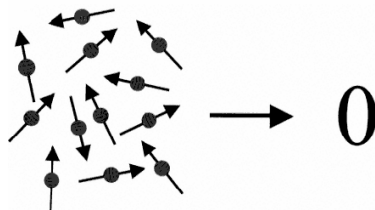


Figura 2. Representação micro- e macroscópica da população de prótons na ausência de um campo magnético externo. Na ausência de campo magnético os prótons têm os seus vectores de *spin* orientados aleatoriamente (análise microscópica). O vector soma destes vectores é nulo (análise macroscópica). Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

No entanto, se o tecido for submetido a um campo magnético externo B_0^1 , os prótons individuais começam a rodar, ou precessar, definindo uma órbita em torno do campo magnético (figura 3) (Smith e Lange, 1998).

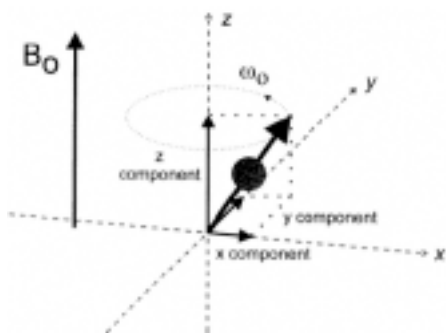


Figura 3. No interior de um campo magnético o próton precessa em volta do campo. O eixo precessional é paralelo ao campo magnético B_0 . O componente Z do vector de *spin* (projecção do spin no eixo Z) é o componente mais importante uma vez que não sofre alteração da sua magnitude ou direcção à medida que o próton precessa. Os componentes X e Y variam com o tempo numa frequência ω_0 proporcional a B_0 , conforme expresso pela equação [1-1]. Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

Os prótons precessam ligeiramente afastados do eixo do campo magnético, sendo o seu eixo de rotação paralelo a B_0 . Esta rotação ocorre devido à interacção do campo magnético com a carga positiva do núcleo. O movimento de cada próton pode ser descrito por um único grupo coordenadas x , y (perpendicular a B_0), e z (paralelo a B_0). As coordenadas perpendicular, ou transversa, variam ao longo do tempo à medida que o próton precessa. A coordenada z mantém-se constante.

A velocidade ou frequência de precessão é proporcional à força do campo magnético e é expressa pela equação [1-1], a equação de Larmor,

¹ Por convenção, B_0 é definido como estando orientado na direcção Z de um sistema de coordenadas cartesianas; o eixo de rotação é também o eixo Z.

$$\omega_0 = \gamma B_0 / 2\pi \quad [1-1]$$

em que ω_0 é a *frequência de Larmor* (MHz). B_0 é a força do campo magnético em Tesla (T) que o protão experimenta e γ é uma constante para cada núcleo em $s^{-1}T^{-1}$, conhecida por *razão giromagnética* (Brown e Semelka, 1999). A tabela 1 inclui valores de γ e ω a 1.5T para vários núcleos.

Se se proceder à adição dos vectores de *spin* na presença de um campo magnético externo, o resultado será agora um pouco diferente. Na direcção perpendicular a B_0 , as orientações do *spin* estão orientadas aleatoriamente tal como estavam na ausência do campo magnético, apesar da dependência temporal de cada componente transversa. Não existe ainda magnetização líquida perpendicular a B_0 . No entanto, na direcção paralela ao campo magnético, o resultado é diferente. Uma vez que a orientação relativamente ao eixo precessional do protão se mantém constante ao longo do tempo, ocorre uma interacção constante e não nula entre o protão e B_0 , designada por *interacção de Zeeman*. Este acoplamento causa uma diferença de energia entre os protões alinhados paralela e antiparalelamente a B_0 . Esta diferença de energia, ΔE , é proporcional a B_0 (figura 4).

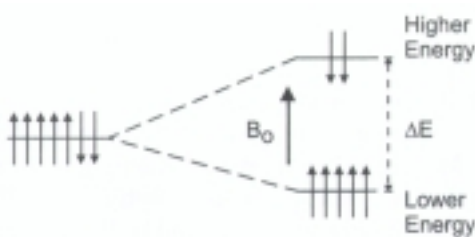


Figura 4. Diagrama de Zeeman. Na ausência de um campo magnético, a população de protões terá a configuração do componente Z de igual energia pelo que não existe nenhum alinhamento preferencial entre as orientações paralela e antiparalela dos *spins*. Na presença de um campo magnético externo, a orientação paralela a B_0 terá menor energia pelo que é a configuração com o maior número de protões. A diferença de energia entre as duas configurações, ΔE , é proporcional a B_0 . Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

O resultado da interacção de Zeeman traduz-se no facto de *spins* com orientações opostas (paralela e antiparalela) terem energias diferentes. A orientação que é paralela ao campo magnético tem menor energia do que a orientação antiparalela. Considerando uma população de protões, a maioria estará orientada paralelamente a B_0 , ou seja, existe uma polarização induzida dos *spins* pelo campo magnético (figura 5a). O número exacto de protões em cada nível de energia obedece à distribuição de Boltzman, traduzida pela equação [1-2],

$$N_{\text{antiparalelo}}/N_{\text{paralelo}} = e^{-\Delta E/kT} \quad [1-2]$$

em que $N_{\text{antiparalelo}}$ e N_{paralelo} são o número de prótons nos níveis de energia superior e inferior, respectivamente, e k é a *constante de Boltzmann*, $1.381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$. Visto que a separação entre os níveis de energia, ΔE , depende da força do campo magnético B_0 , o número exacto de *spins* em cada nível energético também depende de B_0 , aumentando com o aumento da força do campo magnético. À temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$), haverá um excesso de prótons no nível inferior. Este número desigual de prótons em cada nível significa que o vector soma de *spins* será diferente de zero e ir-se-á alinhar paralelamente ao campo magnético. Por outras palavras, o tecido ficará magnetizado na presença do campo magnético, adquirindo a magnetização líquida M_0 . A orientação de M_0 será a de B_0 , mantendo-se constante ao longo do tempo (figura 5b) (Smith e Lange, 1998).

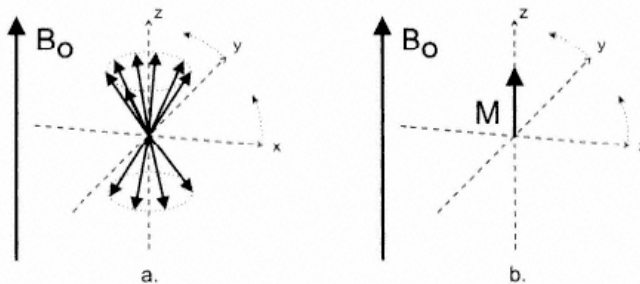


Figura 5. Representações microscópica (a) e macroscópica (b) de uma população de prótons na presença de um campo magnético. Cada próton precessa em torno do campo magnético. Se for utilizado um sistema de rotação de referência com uma velocidade de rotação ω_0 , a população de prótons surge estacionária. Enquanto que os componentes Z são um de dois valores (um positivo e um negativo), os componentes X e Y podem assumir quaisquer valores, positivos ou negativos. A rotação dos prótons forma dois cones rotacionais, um com componente Z positivo e outro com componente Z negativo. Uma vez que existem mais prótons no cone de rotação superior, o vector soma M_0 será não nulo, pelo que a magnetização líquida terá magnitude constante e será paralela a B_0 . *Adaptado de Brown e Semelka, 1999.*

Este arranjo com M_0 alinhado com o campo magnético sem componente transversa é a configuração normal, ou de equilíbrio, dos prótons. Esta configuração tem o nível de energia mais baixo e é o arranjo para o qual os prótons tendem naturalmente a regressar após quaisquer perturbações sofridas, tais como a absorção de energia. Esta magnetização induzida, M_0 , é a fonte do sinal de ressonância magnética. Como consequência, tudo o resto sendo constante, quanto maior o valor de M_0 maior será o sinal obtido (Stark e Bradley, 1999).

ii) Magnetização e obtenção de contraste de imagem

Durante um exame de ressonância magnética, o tecido é exposto a energia na frequência exacta em que será absorvida. Após um curto período de tempo esta energia é reemitida, detectada e processada.

Toda a área de ressonância magnética é baseada na manipulação da magnetização líquida, M_0 . A manipulação mais simples envolve a aplicação de um curto pulso energético de radiofrequência contendo múltiplas frequências. Durante o pulso, os prótons absorvem uma determinada parte desta energia correspondente a uma frequência específica. Após a cessação do pulso, os prótons reemitem a energia na mesma frequência. A frequência específica que é absorvida é proporcional ao campo magnético B_0 , de acordo com a equação de Larmor definida anteriormente. Quando um próton é irradiado com energia na frequência correcta (ω_0), é excitado da orientação de menor energia (paralela) para a de maior energia (antiparalela) (figura 6).

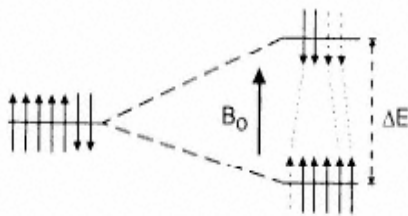


Figura 6. Diagrama de Zeeman. A diferença de energia entre as duas configurações, ΔE , é proporcional à força do campo magnético B_0 e à frequência precessional correspondente ω_0 , conforme expresso pela equação [1-3]. Quando é aplicada energia nesta frequência à amostra, os *spins* no estado energético inferior são excitados para o estado de energia superior. Por outro lado, os *spins* no estado de energia superior são estimulados a libertar a sua energia e relaxar para o estado energético mais baixo. Visto que existem mais *spins* no estado de energia inferior, ocorre absorção líquida de energia pelos *spins* da amostra. Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

Em simultâneo, um próton no nível de energia superior é estimulado a libertar a sua energia, assumindo o estado de menor energia. A diferença de energia (ΔE) entre ambos os níveis é exactamente proporcional à frequência ω_0 e ao campo magnético B_0 , de acordo com a equação [1-3],

$$\Delta E = h^* \omega_0 = h \gamma B_0 / 2\pi \quad [1-3]$$

em que h^* representa $h/2\pi$ e h representa a constante de Plank, 6.626×10^{-34} J s. É de notar que somente a energia nesta frequência pode estimular as transições entre os dois níveis de energia de *spin* (condição de Bohr). Esta absorção de energia é conhecida por *absorção de ressonância*. A frequência desta energia é designada por *frequência ressonante* (Rocklage et al., 1992).

No caso de uma população de prótons presentes num determinado volume de tecido biológico existe uma quantidade significativa de energia absorvida e emitida durante o período de aplicação do pulso. No entanto, visto que existem mais prótons no nível de energia inferior (figura 6), ocorre absorção líquida de energia pelo tecido. A energia é aplicada sob forma de pulso de radiofrequência com uma frequência central ω_0 e orientação perpendicular a B_0 , conforme indicado pelo campo magnético efectivo B_1 (figura 7). Esta diferença de orientação conduz ao acoplamento entre o pulso de radiofrequência e M_0 permitindo a transferência de energia para os prótons (Smith e Lange, 1998).

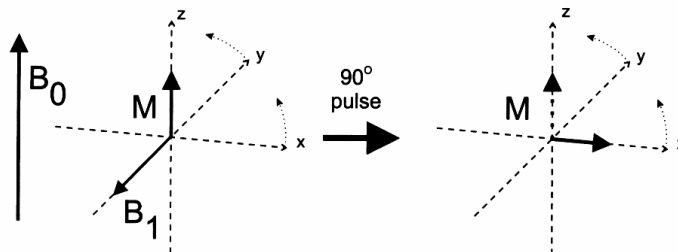


Figura 7. Efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência de 90° no perfil de rotação de referência. O pulso aplicado na frequência de ressonância ω_0 pode ser considerado como um campo magnético adicional B_1 , orientado perpendicularmente a B_0 . Quando a energia é aplicada na frequência adequada, os prótons absorvem essa energia e a magnetização M roda no plano transversal. A direcção de rotação é perpendicular a B_0 e B_1 . Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

A absorção de energia provoca o afastamento da rotação de M_0 da sua orientação de equilíbrio, perpendicular a B_0 e B_1 . Se o transmissor de radiofrequência for deixado durante tempo e com amplitude, suficientes, a energia absorvida provocará a rotação total de M_0 no plano transversal, um resultado conhecido por pulso de 90° . Uma vez desligado o transmissor, os prótons começam imediatamente a realinhar-se e a regressar à sua orientação de equilíbrio, emitindo energia com frequência ω_0 . Se for colocado um detector perpendicularmente ao plano transversal, os prótons induzir-lhe-ão voltagem durante a sua precessão. Esta voltagem diminui com o tempo à medida que mais e mais prótons libertam a energia absorvida, através do processo conhecido por *relaxação*. A voltagem induzida, ou sinal de ressonância magnética, é quantificado no *decaimento induzido livre*, ou FID². A magnitude do sinal FID depende do valor de M_0 imediatamente antes da aplicação do pulso de 90° (Brown e Semelka, 1999; Rocklage *et al.*, 1992).

² Free Induction Decay.

O conseqüente tratamento matemático do sinal FID por transformadas de Fourier bem como a conversão deste sinal analógico para digital conduzem à obtenção final de contraste, o sinal visível em imageologia por ressonância magnética.

iii) Relaxação de spin

A quantificação do sinal de ressonância magnética pode ser analisado em termos de transferência de energia. A relaxação é o processo pelo qual os prótons libertam a energia que absorveram do pulso de radiofrequência. Este processo é fundamental em ressonância magnética, tão essencial quanto a absorção de energia, pelo que constitui o mecanismo primário de obtenção de contraste de imagem.

No processo de absorção em ressonância, a energia de radiofrequência é absorvida pelos prótons quando está presente na frequência correcta. Durante a relaxação, os prótons libertam esta energia e retornam à sua configuração original. Embora um próton individual absorva a energia, os tempos de relaxação são medidos para a totalidade da amostra, pelo que o resultado que se obtém constitui uma quantificação média.

Podem quantificar-se dois tempos de relaxação distintos, designados por T1 e T2. Embora ambos quantifiquem a transferência espontânea de energia de um próton no estado excitado, diferem na disposição final dessa energia. Estes dois parâmetros de relaxividade são específicos para cada tecido.

Resumidamente, T1 ou tempo de relaxação longitudinal ou de *spin-rede*, refere-se ao período de tempo que demora para que a magnetização do tecido volte ao seu estado de equilíbrio na direcção longitudinal do campo magnético externo após excitação com um pulso de energia de radiofrequência. O excesso de energia que é absorvido pelos *spins* regressa ao meio durante o processo de relaxação.

A segunda propriedade da relaxividade de um tecido é a relaxação *spin-spin* ou transversa, conhecida também por relaxação T2. Neste processo de relaxação, o excesso de energia depositada no tecido pelo pulso de radiofrequência é transferido entre os *spins* magnéticos. Esta energia transferida resulta na perda da coerência de fase do *spin* no plano transversal e desfasamento de *spin*.

O aumento de contraste baseado na alteração destes dois parâmetros de relaxividade pode ser classificado de acordo com a alteração provocada em T1 ou T2.

Relaxação T1

O tempo de relaxação T1 é o tempo necessário para que o componente z de M retorne a 63% do seu valor original após um pulso excitatório. É também designado por tempo de relaxação longitudinal ou tempo de relaxação *spin-rede*.

M₀ é paralelo a B₀ no equilíbrio. A absorção de energia provoca a rotação de M₀ no plano transverso. O tempo de relaxação T1 fornece o mecanismo através do qual os prótons libertam a sua energia para voltar à sua orientação original.

Se for aplicado um pulso de 90° à amostra, M₀ rodará conforme ilustrado na figura 7, pelo que não haverá magnetização longitudinal após a cessação do pulso. Com o decorrer do tempo observar-se-á o retorno da magnetização longitudinal à medida que os prótons libertam a sua energia (figura 8).

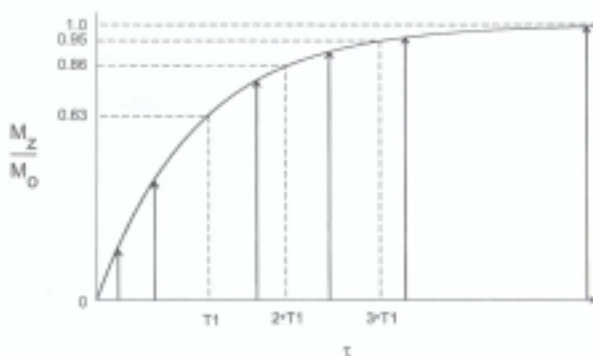


Figura 8. Relaxação T1 após a aplicação de um pulso de radiofrequência de 90°. Após a aplicação do pulso a 90° não existe magnetização longitudinal. Após um curto período de tempo observar-se-á magnetização longitudinal resultante da libertação de energia dos prótons, por relaxação T1. Gradualmente, à medida que mais prótons libertam a sua energia, restabelece-se uma fracção crescente de M_z. Mais tarde, M₀ será eventualmente restaurado na totalidade. A alteração de M_z/M₀ ao longo do tempo τ obedece a um processo de crescimento exponencial descrito pela equação [1-4]. Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

Este retorno da magnetização segue um processo de crescimento exponencial, de acordo com a equação [1-4], sendo T1 a constante temporal que descreve a velocidade de crescimento

$$M(\tau) = M_0(1 - e^{-\tau/T_1}) \quad [1-4]$$

e sendo τ o tempo decorrido após o pulso de radiofrequência. Após 3 períodos de tempo T1, M terá voltado a 95% do valor que tinha antes da aplicação do pulso, *i.e.*, para M₀. O termo *spin-rede* refere-se ao facto do próton excitado (“*spin*”) transferir a sua energia para o meio envolvente (“*rede*”) em vez de para outro *spin*. Como tal, esta energia não contribui para a excitação de outros *spins* (Rocklage *et al.*, 1992).

Esta transferência de energia para o meio circundante tem algumas consequências importantes. Suponhamos que a energia é aplicada continuamente na frequência de ressonância de forma a que não ocorra relaxação. Nesta situação os prótons de nível

energético inferior absorvem energia e os prótons de nível energético superior são estimulados para emitir a energia que possuem. Uma vez que a energia é continuamente transmitida, as populações de prótons de ambos os níveis energéticos ir-se-ão igualizar gradualmente. Nesta situação não é possível ocorrer mais absorção de energia, ou seja, atinge-se a saturação (Mitchell, 1999). De facto, a quantidade de energia que uma população de prótons pode absorver antes de ficar saturada é limitada.

Num exame de ressonância magnética a energia do pulso de *radiofrequência* é utilizada com um atraso temporal entre pulsos repetidos. Este período de tempo entre pulsos sucessivos permite que os prótons excitados cedam a sua energia absorvida (relaxação T1). À medida que os prótons cedem a sua energia ao meio circundante, a diferença populacional (*spins* paralelos vs. *spins* antiparalelos) é restabelecida para que a absorção líquida possa reocorrer.

Por razões práticas, o tempo entre pulsos sucessivos é geralmente insuficiente para que a relaxação T1 seja completa, pelo que M não retorna totalmente a M_0 (figura 9).

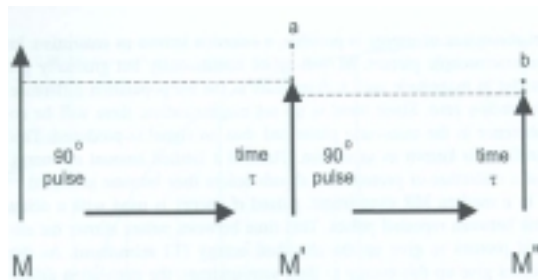


Figura 9. Após a aplicação de um pulso de radiofrequência de 90° a magnetização longitudinal é recuperada através da relaxação T1. Se o tempo τ decorrente entre dois pulsos sucessivos for insuficiente para que M recupere na totalidade, apenas M' existirá aquando da aplicação do segundo pulso (a). Se o tempo τ decorrer novamente, então apenas M'' estará presente (b). M'' será menor que M' mas a diferença será menor que a diferença entre M e M'. Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

A aplicação de um segundo pulso antes que o processo de relaxação esteja completo induz a rotação de M no plano transversal, mas com uma magnitude menor do que após o primeiro pulso. Após algumas repetições, M volta à mesma magnitude antes de cada pulso, ou seja, M atinge o seu estado estacionário (Rocklage *et al.*, 1992).

Em geral, este valor de estado estacionário depende de 5 parâmetros:

- campo magnético externo B_0
- número de prótons que produzem M (por unidade de volume de tecido, conhecido por densidade protónica)
- quantidade de energia absorvida pelos prótons (o ângulo do pulso)
- velocidade de aplicação do pulso de radiofrequência (tempo τ)
- quão eficazmente os prótons cedem a sua energia (tempo de relaxação T1).

Como já foi mencionado, a relaxação *spin-rede* mede a transferência de energia de um próton excitado para o meio circundante. A chave desta transferência de energia é a presença de movimento molecular (vibração, rotação) na imediação do próton excitado com uma frequência intrínseca, ω_L , que coincide com a frequência ressonante, ω_0 . Quanto mais próximo ω_0 estiver de ω_L , mais rapidamente o movimento absorve a energia e mais frequentemente esta transferência de energia ocorre, permitindo que a população de prótons retorne mais cedo à sua configuração de equilíbrio.

Nos tecidos, a natureza da estrutura molecular das proteínas e a presença eventual de quaisquer íons metálicos tem um efeito pronunciado em ω_L . Íons metálicos como o ferro ou manganês podem ter momentos magnéticos significativos que poderão influenciar o ambiente local. Enquanto que as estruturas proteicas são diferentes para muitos tecidos, a rotação molecular da maioria das proteínas tem tipicamente ω_L de *ca.* 1 MHz. Assim, na presença de frequências de ressonância baixas (B_0 reduzido), existe uma identificação maior entre ω_L e ω_0 . Como resultado, a transferência de energia é mais eficaz pelo que T1 é menor. Este processo constitui a base para a dependência que T1 tem da frequência, *i.e.*, T1 diminui com o decréscimo da força do campo magnético (Saini *et al.*, 1991).

Relaxação T2

O tempo de relaxação T2 é o tempo necessário para que o componente transversal da magnetização M decresça irreversivelmente para 37% do seu valor inicial (Brown e Semelka, 1999). Este parâmetro é também conhecido como *tempo de relaxação spin-spin* ou *tempo de relaxação transversa*. Como foi referido anteriormente, no estado de equilíbrio M_0 está totalmente orientado ao longo do eixo z (B_0), não existindo nenhuma fracção de M_0 no plano xy. A coerência ou uniformidade dos prótons é totalmente longitudinal. A absorção de energia a partir de um pulso de radiofrequência aplicado a 90° (figura 7) induz M_0 a rodar inteiramente no plano xy, pelo que a coerência passa a estar no plano transversal no final do período de aplicação do pulso. À medida que o tempo passa esta coerência desaparece. Simultaneamente, os prótons libertam a sua energia e reorientam-se ao longo de B_0 . Esta perda de coerência produz o FID descrito anteriormente, o qual obedece a um processo exponencial descrito pela equação [1-6].

Existem diversas causas para a perda de coerência transversal. O movimento de *spins* adjacentes devido a vibrações ou rotações moleculares constitui uma das causas potenciais. Este movimento é responsável pela relaxação *spin-spin* ou verdadeiro T2. Uma

outra causa advém do facto de um próton nunca experimentar um campo magnético verdadeiramente uniforme ou homogéneo. À medida que o próton precessa, experimenta um campo magnético local flutuante, causando uma alteração em ω_0 e perda de coerência de fase transversa. À medida que esta coerência é dissipada, o valor da magnetização no plano xy decresce para zero. A relaxação $T2$ ou $T2^*$ é o processo pelo qual esta magnetização transversa é dissipada (Brown e Semelka, 1999).

O tempo total de relaxação transversa $T2^*$ é dado pela seguinte equação

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \frac{1}{T2_M} + \frac{1}{T2_{MS}} \quad [1-5]$$

em que $T2_M$ é o tempo de desfaseamento devido a não homogeneidade do campo magnético e $T2_{MS}$ é o tempo de desfaseamento devido a diferenças de susceptibilidade magnética.

O decaimento da magnetização transversa após a aplicação do pulso de 90° (FID) obedece a um processo exponencial com uma constante temporal $T2^*$:

$$M_{XY}(\tau) = M_{XY \max} e^{-\tau/T2^*} \quad [1-6]$$

em que $M_{XY \max}$ é a magnetização transversa M_{XY} imediatamente após a aplicação do pulso de radiofrequência.

Para a maioria dos tecidos ou líquidos, $T2_M$ é o principal factor que determina $T2^*$, enquanto que $T2_{MS}$ é mais importante no caso de tecidos com teores elevados de ferro ou no caso de cavidades com elevado teor de ar, como sejam as vias respiratórias (Brown e Semelka, 1999).

No final do pulso de 90° , os prótons absorveram energia e encontram-se orientados no plano transverso. Cada próton precessa com a mesma frequência ω_0 e está sincronizado no mesmo ponto ou fase do seu ciclo precessional. Uma vez que cada próton circundante do mesmo tipo terá o mesmo ambiente molecular e igual ω_0 pode, rápida e facilmente, absorver a energia que está a ser libertada.

A relaxação *spin-spin* refere-se a esta transferência de energia de um próton excitado para um segundo próton presente na sua vizinhança. A energia absorvida permanece

assim como uma forma de energia excitatória, não sendo transferida para o meio circundante como sucede na relaxação T1. Esta transferência de energia entre dois prótons pode ocorrer múltiplas vezes desde que estes estejam suficientemente próximos e ambos possuam a mesma frequência ω_0 . Esta frequência ω_0 flutua devido a interações intra e inter moleculares tais como vibrações ou rotações. Esta flutuação conduz à perda gradual e irreversível da coerência de fase dos *spins* à medida que estes transferem a sua energia, reduzindo a magnitude da magnetização transversa (figura 10).

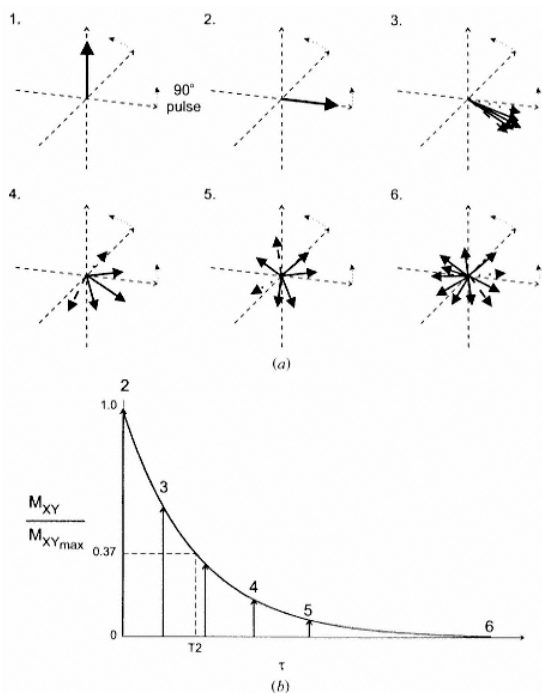


Figura 10. (a) A magnetização líquida \mathbf{M} (setas) está orientada paralelamente a \mathbf{B}_0 antes da aplicação do pulso (1). Após a aplicação do pulso de radiofrequência de 90° , os prótons começam a precessar em fase no plano transversal (2). Devido à presença de interações inter e intramoleculares, os prótons começam a precessar com diferentes frequências (setas tracejadas representam movimento rápido, setas pontilhadas representam movimento lento) tornando-se assíncronos entre si (3). À medida que passa mais tempo (4,5), a coerência transversa vai diminuindo até que passa a existir um estado de completa aleatoriedade nos componentes transversos, deixando de existir coerência (6). **(b)** Gráfico do componente relativo M_{xy} . Os números correspondem ao componente M_{xy} esperado da Figura 10a. A alteração do *ratio* $M_{xy}/M_{xy\max}$ em função do tempo obedece a um decaimento exponencial descrito pela equação [1-6]. A constante temporal para este processo é o tempo de relaxação *spin-spin* ou T2, correspondendo ao tempo em que M_{xy} decresceu para 37% do seu valor original. Adaptado de Brown e Semelka, 1999.

T2 é pois o tempo que decorre para que a magnetização transversa atinja 37% do valor inicial que possuía imediatamente após o pulso de 90° quando este é o único processo que causa perda de coerência. À medida que mais tempo passa, esta coerência transversa desaparece por completo para se restabelecer na direção longitudinal à medida que a relaxação T1 ocorre. O tempo de relaxação T2 é sempre igual ou menor que T1.

1.1.2. Agentes de contraste em Imageologia por Ressonância Magnética

A emergência da imageologia por ressonância magnética (IRM) como uma das principais modalidades de diagnóstico médico criou a necessidade de se obterem agentes de contraste eficazes e seguros. A utilidade dos meios de contraste reside na capacidade

que apresentam para aumentar o contraste entre o tecido alvo e os tecidos circundantes. Para alcançarem este objectivo, os meios de contraste têm de alterar um ou vários dos parâmetros que determinam a intensidade do sinal de ressonância magnética e, consequentemente, o contraste, nomeadamente:

a) densidade de sinal

Refere-se à fracção de prótons que existe no volume de tecido biológico a ser analisado e determina o sinal potencial máximo de ressonância magnética que pode ser obtido naquele volume de tecido. A maioria dos prótons presentes num tecido biológico advém de moléculas de água, o que excede consideravelmente o número de prótons associados aos compostos orgânicos presentes. No entanto, pelo facto do teor de água presente num tecido *in vivo* não poder ser facilmente alterado por um agente de contraste, os compostos que afectam a densidade de *spin* têm recebido pouca atenção.

b) susceptibilidade magnética

Um outro determinante da intensidade de sinal na imagem de ressonância magnética é a susceptibilidade magnética. Este parâmetro descreve a capacidade que uma substância possui para se tornar magnetizada quando submetida a campo magnético externo (Stark e Bradley, 1999).

Existem quatro categorias de susceptibilidade magnética: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo e superparamagnetismo (Hendrick e Haacke, 1993; Saini, 1991).

A maioria dos compostos orgânicos é diamagnética, pelo que possuem uma susceptibilidade magnética reduzida e negativa. Como tal, este tipo de compostos tem pouco interesse como agentes de contraste devido ao seu efeito negligenciável em IRM clínico (Wood e Hardy, 1993).

Os materiais paramagnéticos, ferromagnéticos e superparamagnéticos têm susceptibilidades positivas e muito elevadas (Brasch e Bennet, 1990). No âmbito desta tese apenas serão referidas as substâncias paramagnéticas. Este tipo de substâncias possui a maior flexibilidade na concepção de agentes de contraste, razão pela qual têm recebido a maior atenção.

A presença de um ião paramagnético pode influenciar fortemente as propriedades de relaxação dos prótons circundantes, conduzindo a alterações no contraste tecidual. Os

iões metálicos paramagnéticos contêm electrões desemparelhados e, como tal, possuem um momento magnético permanente. Os iões paramagnéticos típicos são os lantanídeos Dy(III), Gd(III) e os elementos de transição Mn(II), Mn(III), Fe(II) e Fe(III) (Brasch, 1992).

Na presença de um campo magnético externo os iões metálicos paramagnéticos ficam magnetizados. Esta magnetização aumenta de forma linear com a força do campo aplicado, através de uma constante de proporcionalidade (*i.e.*, susceptibilidade magnética) proporcional ao quadrado do momento magnético (Stark e Bradley, 1999). A magnetização contribui para a capacidade que qualquer agente possui para melhorar o contraste em imageologia por ressonância magnética.

A relaxação baseada na susceptibilidade é um efeito da esfera externa³, pelo que não exige uma interacção directa entre as moléculas de água do meio e o agente de contraste. Basicamente, necessita apenas do “aprisionamento” do agente paramagnético num compartimento, tais como o celular ou o vascular. Perante a aplicação de um campo magnético externo, o agente “compartimentalizado” fica magnetizado. Como resultado, a magnetização desse compartimento é aumentada por um factor proporcional à força do campo magnético multiplicado pela susceptibilidade magnética e pela concentração do agente de contraste (Springer e Rooney, 2001).

Relativamente aos compartimentos adjacentes, o compartimento que contém o agente pode ser considerado como uma partícula magnética de largas dimensões e, logo, um agente de contraste “secundário”.

A relaxação ocorre à medida que os prótons da água difundem no ambiente da esfera externa do compartimento magnetizado, experimentando um campo magnético local e variável, referido como gradiente de campo. A escala temporal das modulações é caracterizada por τ_D e depende da dimensão do compartimento. Devido às grandes dimensões dos compartimentos encontrados (típicamente na ordem dos micrómetros para as células, capilares, etc.), τ_D é tão longo que $1/T_1$ dispersa para zero a forças de campo muito inferiores às relevantes para IRM (Koenig e Brown, 1994).

A relaxação baseada na susceptibilidade é de facto uma interacção dipolar entre um próton da água e o momento magnético de um compartimento que encerra um conjunto de iões paramagnéticos. O momento magnético resultante é originado pela soma das magnetizações individuais dos iões. Como consequência, a relaxação só será induzida com forças de campo perante as quais a magnetização dos iões paramagnéticos seja suficientemente elevada para poder causar uma interacção dipolar significativa com os

³ Este mecanismo é discutido mais detalhadamente na secção 1.1.2.2.

prótons da água extracompartimentais. A magnitude do momento magnético do compartimento paramagnético depende assim da susceptibilidade magnética dos íons paramagnéticos individuais e, logo, o termo “efeito de susceptibilidade”. Pelo contrário, a magnitude do campo magnético dos íons paramagnéticos individuais é independente da força do campo magnético (Koenig e Brown, 1994).

c) relaxação dipolar

A relaxação dos prótons da água ocorre por uma interacção dipolar com um campo magnético aleatório oscilante. Em água pura, a interacção dipolar ocorre principalmente entre os dois prótons da mesma molécula de água e as oscilações magnéticas são originadas pela sua rotação Browniana. No entanto, esta interacção é fraca e o movimento é muito rápido. Como consequência, os tempos de relaxação protónicos são longos.

Para aumentar a relaxação o meio de contraste deve aumentar a intensidade da interacção dipolar magnética e diminuir a sua velocidade. Dado que a magnitude da interacção dipolar entre um próton e um electrão é $(658)^2$ vezes superior à de dois prótons, os agentes de contraste são tipicamente paramagnéticos (Donahue *et al.*, 1997). Este mecanismo é discutido mais detalhadamente na secção 1.1.2.2.

1.1.2.1. Agentes de contraste de Gd(III)

De entre os agentes de contraste paramagnéticos, os quelatos hidrossolúveis e estáveis de Gd(III) possuem as características ideais de elevada relaxividade aquosa (Gerald *et al.*, 1995; Aime *et al.*, 1997), estabilidade química (Mann, 1993), baixa toxicidade *in vivo* (Rubin *et al.*, 1999) e excreção rápida e completa após o exame de diagnóstico (Caravan *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 1993).

Actualmente estão disponíveis comercialmente cinco agentes com gadolínio:

Meio de contraste	Nome comercial
(NMG) ₂ GdDTPA	Magnevist®, Schering AG, Alemanha
(NMG)GdDOTA	Dotarem®, Guerbet AS, França
Gd(DTPA-BMA)	Omniscan®, Nycomed Imaging AS, Noruega
Gd(DO3A-butriol)	Gadovist®, Schering AG, Alemanha
GdHPDO3A	ProHance®, Bracco Diagnostics, Itália

Todos estes meios de contraste têm em comum o seu perfil farmacocinético (Øksendal e Hals, 1993). Distribuem-se no fluído extracelular, sendo excretados por

filtração glomerular (Rocklage e Watson, 1993). O perfil de biodistribuição é adequado ao diagnóstico de lesões que comprometem a integridade da barreira hemato-encefálica (Bradley *et al.*, 1993). Os quelatos de Gd(III) têm relaxividades análogas perante as forças de campo utilizadas em IRM ($\geq 0.47T$ ou 20 MHz) sendo utilizados principalmente como agentes positivos⁴ (T_1) (Kroft e Roos, 1999). Clinicamente parece não existir nenhuma diferença significativa em termos de eficácia ou segurança dos quelatos metálicos (Rubin *et al.*, 1999). Clinicamente estes agentes de contraste são considerados seguros tendo demonstrado baixa incidência de efeitos adversos (Runge, 2000).

O único quelato de Disprósio (Dy) disponível comercialmente é o Dy(DTPA-BMA) (Esprodiamida, Nycomed Imaging AS, Noruega), embora outros estejam em desenvolvimento (Elst *et al.*, 2003).

O potencial dos agentes de contraste disponíveis actualmente pode ser aumentado de várias formas, de entre as quais

(a) direccionar os quelatos paramagnéticos para tecidos-alvo, atingindo aí concentrações mais elevadas e reduzindo as doses efectivas do agente de contraste cito-específico (Weissleder *et al.*, 1992);

(b) desenvolver quelatos de gadolínio neutros ou de osmolaridade reduzida com tolerância aumentada, traduzida pela redução dos índices de toxicidade aguda (DL_{50}) (Verrecchia *et al.*, 1995), ou

(c) desenvolver quelatos paramagnéticos com relaxividades moduláveis por estímulos biológicos, como por exemplo o pH do meio (Zhang *et al.*, 2001).

Outras estratégias envolvem a ligação de $Gd(DTPA)^{2-}$ a macromoléculas como a albumina e anticorpos, o desenvolvimento de lipossomas de GdDTPA e seus derivados lipofílicos como o benzilpropioniotetracetato de Gd(III) (GdBOPTA) e o Gd(etoxibenzil-DTPA) [Gd(EOB-DTPA)]. Estes são agentes hepato-específicos com excreção hepatobiliar aumentada (Stark e Bradley, 1999).

Os agentes de contraste hepático podem ser classificados naqueles que vectorizam o espaço extracelular, o sistema hepatobiliar e o sistema mononuclear fagocítico (MPS) (Verrecchia *et al.*, 1995). Embora exista uma janela imageológica estreita após a administração dos agentes extracelulares de Gd(III), determinadas técnicas imageológicas

⁴ Um meio de contraste que afecte principalmente a relaxação T_1 é referido como um meio de contraste positivo uma vez que o encurtamento da relaxividade T_1 resulta no aumento de intensidade de sinal numa imagem ponderada em T_1 . Por outro lado, um agente de contraste que afecte predominantemente T_2 é referido como um agente de relaxação negativo pois ao diminuir T_2 produz um decréscimo na intensidade do sinal numa imagem ponderada em T_2 .

aplicadas durante a fase de perfusão permitem a sua utilização para IRM hepático (Low, 1997; Laing e Gibson, 1998). O Gd(EOB-DTPA), mais lipofílico (Eovist™, Schering AG, Alemanha) está actualmente sob avaliação clínica como agente de contraste hepatobiliar (Shuter *et al.*, 1998; Hirohashi *et al.*, 1998; Runge *et al.*, 1996; Schmitt-Willich *et al.*, 1999). O (NMG)₂GdBOPTA (MultiHance™, Bracco Diagnostics, Itália), também hepatobiliar, foi recentemente autorizado para utilização clínica.

O MnDPDP⁵ (TeslaScan®, Nycomed Imaging AS, Noruega) foi aprovado recentemente como meio de contraste hepático (Mitchell *et al.*, 1995). A acumulação hepática deste agente deve-se ao seu metabolismo no sangue com libertação do Mn(II) e captação subsequente pelos hepatócitos (Haën e Gozzini, 1993).

Para vectorização do MPS têm sido investigadas diversas formulações paramagnéticas como as microsferas de amido com partículas de óxido de ferro (Fahlvik *et al.*, 1990). Contudo, o vector mais investigado para veicular compostos paramagnéticos tem sido o lipossoma (Unger *et al.*, 1993; Tilcock, 1993; Torchilin, 1996). A vectorização de agentes de contraste para outros locais que não o fígado também tem sido investigada (Anderson *et al.*, 2000).

A imageologia vascular é uma vasta área de diagnóstico que abrange directa ou indirectamente grandes patologias incluindo doenças vasculares e cancerosas. Devido a uma rápida distribuição do compartimento vascular para o espaço intersticial, os agentes de Gd(III) de baixo peso molecular disponíveis são mais eficazes em imageologia de primeira passagem do *bólus* (Kroft e de Roos, 1999). Consequentemente, um aspecto chave dos agentes de contraste melhorados seria a sua capacidade para serem retidos na circulação sanguínea durante o tempo de aquisição de dados, eliminando a necessidade de injeções repetidas. Enquanto que pode ser argumentado que com técnicas imageológicas rápidas não se exige um elevado tempo de residência vascular, a detecção de processos lentos como a distribuição do agente de contraste para tecidos tumorais exige tempos de circulação longos (Bogdanov *et al.*, 1999).

Têm sido consideradas duas estratégias diferentes para aumentar o tempo de residência vascular dos agentes de contraste. A primeira baseia-se na síntese de agentes vasculares exógenos que, devido às suas propriedades físico-químicas, têm um tempo de circulação inerente na vasculatura. Complexos macromoleculares de GdDTPA ou GdDOTA ligados covalentemente a dextrano (Kroft *et al.*, 1999), albumina (Ostrowitzki *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1997), amido (Fossheim *et al.*, 1999; Helbich *et al.*, 2000) ou poli-L-

⁵ MnDPDP: Mn-dipiridofosfato trissódico.

lisina (Judd *et al.*, 1999; Grandin *et al.*, 1995) constituem alguns exemplos. Polímeros de DTPA com Gd(III) (Tacke *et al.*, 1997) ou Dy (Eubank *et al.*, 1998) também têm sido desenvolvidos. Partículas como os lipossomas polimerizados ou com PEG à sua superfície, marcados com Gd(III) (Storrs *et al.*, 1995; Tilcock, 1999), os complexos de amido com Fe(II)-desferroxamina (Tian *et al.*, 1997) e a hidroxilapatite com Mn(II), com PEG à superfície (Fallis *et al.*, 1998) também têm sido objecto de estudo.

Um novo conceito de agentes vasculares emergiu há uma década com o objectivo de administrar um quelato lipofílico de baixo peso molecular na corrente sanguínea. Devido à sua elevada afinidade para as proteínas plasmáticas, particularmente a albumina, o quelato metálico ir-se-ia associar reversivelmente às proteínas resultando, *in vivo*, num agente angiográfico compartimentalizado e, como tal, com relaxividade mais elevada (Knopp *et al.*, 1999). No entanto, a utilização deste tipo de meio de contraste exige a administração de doses muito reduzidas para evitar a saturação dos locais de ligação da albumina, o que diminui a relaxividade obtida (Kroft e de Roos, 1999). Estão actualmente sob avaliação clínica dois agentes de Gd(III) baseados nesta estratégia, o MS-325 (AngioMARK™, Epix Medical Inc., Cambridge, MA, EUA) e MP-2269 (Mallinckrodt Inc., MO, EUA), ambos derivados lipofílicos do GdDTPA.

Os agentes vasculares podem ser concebidos para vectorização passiva pois o seu elevado tempo de circulação aumenta a probabilidade de extravasão tecidual. No entanto, o seu potencial como agentes de contraste vectorizados pode ser consideravelmente aumentado se forem veiculados por vectores coloidais, como sejam lipossomas e nanopartículas poliméricas.

1.1.2.2. Mecanismo de acção dos quelatos paramagnéticos de Gd(III)

A intensidade do sinal da água depende de vários factores particularmente dos valores dos tempos de relaxação protónica, T1 e T2. O tempo de relaxação dos prótons da água decresce substancialmente quando o oxigénio da molécula de água se encontra próximo de um agente paramagnético como no caso dos quelatos de Gd(III) utilizados nesta tese.

A capacidade que o agente paramagnético tem em reduzir a velocidade de relaxação protónica das moléculas de água é definida pela relaxividade, ou seja, pelo

aumento da velocidade de relaxação protónica por unidade de concentração do núcleo paramagnético (Koenig e Brown, 1994).

De entre vários, muita atenção tem sido devotada ao ião Gd^{3+} uma vez que este possui não só um momento magnético forte ($S=7/2$) mas também um tempo de relaxação electrão-*spin* longo (ca. $10^{-9.5}$ s, contra 10^{-13} s para o Dy^{3+} , Eu^{3+} e Yb^{3+}), duas propriedades que permitem uma relaxação de *spin* eficaz (Parker e Williams, 1996).

Conforme anteriormente mencionado, na presença de um meio de contraste a relaxação protónica da água passa a depender principalmente das alterações provocadas ao nível da orientação dos protões, da relação dos seus momentos magnéticos e das alterações na orientação destes dois momentos relativamente ao campo magnético aplicado. As alterações na sua orientação relativa ocorrem devido à relaxação do momento magnético electrónico. Tal como o protão, também o electrão relaxa, sendo a escala temporal dessas flutuações caracterizada pelo tempo de relaxação do *spin* electrónico, τ_s (Rocklage *et al.*, 1992).

As alterações na orientação dos dois momentos magnéticos relativamente ao campo magnético aplicado advêm da difusão Browniana de uma molécula de água (protão) na proximidade do ião paramagnético e da rotação Browniana do agente se este tiver uma molécula de água na sua esfera de coordenação. A escala temporal de difusão dessa molécula de água para o meio traduz-se no tempo que demora para que uma molécula de água evada do campo dipolar gerado pelo agente, designado por τ_D . A escala temporal do movimento rotacional é caracterizada por τ_R (Rocklage *et al.*, 1992, Donahue *et al.*, 1997).

Existem dois mecanismos distintos pelos quais os agentes de contraste paramagnéticos podem relaxar os protões da água, designados por relaxação da esfera interna e relaxação da esfera externa.

i) relaxação da esfera interna

Este mecanismo só se verifica se existir uma molécula de água ligada directamente ou na proximidade da esfera de coordenação interna do ião paramagnético, como no caso dos quelatos de Gd (III) utilizados no âmbito desta tese (Geraldés *et al.*, 1995). É caracterizada por τ_s e τ_R .

A contribuição da esfera interna (EI) para a relaxividade (R_p^{EI}) resulta de uma troca química da molécula de água (q é o número de moléculas de água coordenadas com o ião

metálico) entre a primeira esfera de coordenação do ião metálico paramagnético (ou qualquer local de hidratação próximo) e a água tecidual (Caravan *et al.*, 1999).

Estas interacções dipolares são moduladas pela reorientação molecular (τ_R), pela relaxação electrão-*spin* (τ_S), e pelos tempos de troca química (τ_M). Este último processo parece ser geralmente suficiente rápido para que os quelatos de gadolínio consigam transferir a interacção para a água circundante (Parker e Williams, 1996).

ii) relaxação da esfera externa

O mecanismo da esfera externa (EE) é o único mecanismo que contribui para a relaxividade (R_{1p}^{EE}) de quelatos nos quais não existe nenhuma molécula de água ($q=0$) coordenada directamente com o núcleo paramagnético. Este mecanismo é o resultado da difusão de moléculas de água na proximidade do quelato paramagnético. Nesta situação, a interacção é modulada pela difusão translacional relativa do quelato paramagnético e das moléculas de água, D , e pelo tempo de relaxação electrónica, τ_S (Aime *et al.*, 2002). Todos os meios de contraste afectam a relaxação por este mecanismo (Stark e Bradley, 1999).

A contribuição paramagnética líquida de uma solução de complexo metálico para a velocidade de relaxação protónica medida (R_{1p}^{med}) é dada pela soma destes dois termos (equação [1-7]).

$$R_{1p}^{med} = R_p^{EI} + R_{1p}^{EE} \quad [1-7]$$

A contribuição da esfera interna, descrita pela teoria de Solomon-Bloemberg-Morgan (Solomon, 1955; Bloemberg, 1957) é dada pelas equações [1-8] a [1-10] em que c representa a concentração molar de quelato paramagnético, q é o número de moléculas de água coordenadas, T_{1M} o seu tempo de relaxação protónica longitudinal e τ_M a respectiva semi-vida de residência nos pontos de coordenação.

$$R_{1p}^{EI} = \frac{q \times C}{55.6} \times \frac{1}{T_{1M} + \tau_M} \quad [1-8]$$

$$T_{1M} = (K/r^6)f(\tau_C, \omega_l, \omega_S) \quad [1-9]$$

$$\frac{1}{\tau_C} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_S} \quad [1-10]$$

O tempo de relaxação das moléculas de água ligadas (equação [1-9]) depende do inverso da sexta potência da distância r entre o íon metálico e os prótons da água, das frequências de Larmor do próton (ω_I) e do electrão (ω_S) e do tempo de correlação τ_C para a modulação da interacção dipolar, a qual depende inversamente de τ_R , τ_M e τ_S (equação [1-10]).

O termo da esfera externa R_{1p}^{EE} pode ter uma contribuição significativa na velocidade de relaxação observada no caso de quelatos de Gd(III) de baixo peso molecular (Parker e Williams, 1996; Aime *et al.*, 2002) sendo geralmente descrito pela equação de Freed (Freed, 1978).

A informação estrutural e dinâmica que pode ser obtida através do estudo das velocidades de relaxação de quelatos de Gd(III) em solução só podem ser exploradas através do estudo da dependência do campo magnético. Experimentalmente, isto pode ser efectuado por relaxometria, o que permite a quantificação das velocidades de relaxação longitudinal dos prótons da água num intervalo de campos magnéticos correspondentes a frequências de Larmor de 0.01-50MHz. Neste tipo de estudo obtêm-se perfis de NMRD⁶. No âmbito desta tese não foram realizados estudos deste tipo mas tão somente ensaios preliminares de campo magnético fixo (Capítulo 4).

Encontram-se publicados diversos estudos de relaxividade dos quelatos de Gd(III) baseados no DTPA (Gerald *et al.*, 1995; Adzamlı *et al.*, 1999; Bligh *et al.*, 1995), através dos quais se têm definido certas tendências. A relaxividade deste tipo de quelatos na presença de campos magnéticos elevados (10-50 MHz) é principalmente controlada pelo valor de τ_R , o qual é directamente proporcional ao volume molecular, tendo uma contribuição de cerca de 50% do mecanismo da esfera externa. Na maioria dos casos $T_{1M} \gg \tau_M$, sendo a relaxividade deste tipo de quelatos em campo alto função de q e τ_R (Parker e Williams, 1996). Quando um complexo de Gd(III) de baixo peso molecular está ligado a uma macromolécula, o aumento de τ_R conduz a um aumento de τ_C (equação [1-10]). O tempo de correlação rotacional τ_R aumenta com o aumento do volume molecular conduzindo ao aumento da relaxividade, desde que o movimento do centro paramagnético esteja acoplado ao movimento da macromolécula ao qual está ligado (Parker e Williams, 1996). Este efeito de aumento da relaxação protónica pode aumentar com o aumento do volume molecular até ao ponto em que um dos outros tempos de correlação passa a

⁶ NMRD: Nuclear Magnetic Resonance Dispersion

dominar (ou seja, τ_R ou τ_M). Esta é pois a base mecânica para a utilização de nanopartículas poliméricas coloidais como veículos de quelatos de Gd(III) para o desenvolvimento de meios de contraste com relaxividade melhorada. No Capítulo 4 este aspecto é discutido em maior detalhe.

1.2. Aplicação de sistemas coloidais em terapêutica e diagnóstico

Os sistemas coloidais apresentam numerosas vantagens relativamente às formulações convencionais. As suas reduzidas dimensões, adequadas à administração parentérica, oferecem grandes potencialidades em termos de utilização enquanto sistemas direccionados para populações celulares específicas, bem como para a cedência controlada de substâncias bio-activas (Langer, 1998; Kreuter, 1994).

A vectorização de um fármaco ou de um agente de contraste para um local de acção específico poderá não só melhorar a eficácia terapêutica ou de diagnóstico, como também permitir a redução da dose necessária à obtenção do efeito desejado, minimizando igualmente os possíveis efeitos tóxicos resultantes de uma biodistribuição sistémica inespecífica (Cannon, 1993; Langer, 2001).

Os principais sistemas coloidais que têm sido desenvolvidos incluem sistemas vesiculares e partículas poliméricas, de entre os quais se destacam respectivamente, lipossomas (Zelpathi e Szoka, 1996; Langer, 1999; Zalipsky *et al.*, 1996) e nanopartículas (Radomska *et al.*, 1999; Kawashima *et al.*, 1998).

A possibilidade de modular os seus parâmetros farmacocinéticos e a sua estabilidade física dependem das propriedades do sistema molécula-vector, exigindo uma análise aprofundada das suas propriedades granulométricas e características de superfície (Lourenço *et al.*, 1996; Fernández-Urrusuno *et al.*, 1995).

Após administração endovenosa, os sistemas coloidais são em geral, rapidamente depurados pelo sistema fagocítico mononuclear (MPS), principalmente pelo fígado (60-90%), baço (2-10%) e, em menor extensão, pelos pulmões (Gregoriadis e Florence, 1993; Allémann *et al.*, 1998). Esta situação pode ser vantajosa ao permitir a cedência de fármacos ou agentes de contraste para o tratamento ou diagnóstico de patologias que afectam o sistema fagocítico mononuclear (Fidler, 1993; Gregoriadis, 1991; Banerjee *et al.*, 1996).

1.2.1. Tipos de sistemas coloidais

1.2.1.1. Lipossomas

Descritos na década de 60 como instrumentos para o estudo da biofísica membranar (Barenholz e Crommelin, 1994), os lipossomas são hoje o sistema terapêutico de natureza coloidal acerca do qual mais se investigou (Crommelin e Schreier, 1994; Barenholz e Crommelin, 1994; Gregoriadis e Florence, 1993; Storm *et al.*, 1995; Zelphati e Szoka, 1996).

Definidos e caracterizados por Bangham *et al.* na década de 60, são constituídos por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas concêntricas separadas por compartimentos aquosos (Bangham, 1968; Bangham e Haydon, 1968). Esta estrutura em bicamadas confere aos lipossomas a possibilidade de encapsular moléculas hidrossolúveis (Rajendran *et al.*, 1997; Corvo *et al.*, 1997; Kim e Jeong, 1997), lipossolúveis (Fielding, 1991; Isele *et al.*, 1995; Gay *et al.*, 1993) ou anfipáticas (Kabalka *et al.*, 1991; Kunimasa *et al.*, 1992).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com a sua dimensão (pequenos, *small* ou grandes, *large*), número de compartimentos aquosos (unilamelares ou multilamelares), ou método de preparação (ex: evaporação de fase reversa, REV) (Barenholz e Crommelin, 1994), de entre outros.

Estes sistemas podem ser preparados a partir de uma grande variedade de fosfolípidos naturais (ex: fosfatidilcolina de ovo), semi-sintéticos ou sintéticos combinados ou não com esteróis (principalmente o colesterol) e esfingolípidos (esfingomiéline) (Barenholz e Crommelin, 1994).

A escolha criteriosa da composição lipídica, do método e das condições de preparação, permite obter lipossomas que poderão variar consideravelmente em termos de distribuição granulométrica e dimensões médias, número e organização das bicamadas lipídicas, teor de princípio activo, estabilidade, carga e rigidez (Umbrain *et al.*, 1995; Hunter e Frisken, 1998), determinando o efeito terapêutico obtido (Dass *et al.*, 1997).

Dependendo da temperatura de transição de fase (T_c) do(s) fosfolípido(s) utilizado(s), as membranas lipossómicas podem adquirir vários graus de fluidez, o que pode ser controlado pela utilização de uma proporção molar adequada de dois ou mais lípidos (Panico *et al.*, 1992).

A superfície dos lipossomas pode ser carregada negativa ou positivamente pela incorporação de lípidos com carga (Herrmann e Stricker, 1995; Omri *et al.*, 1995), ou enriquecida com grupos reactivos aos quais se podem ligar outras moléculas, entre as

quais anticorpos (Allen, 1994; Cannon *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2001) e polissacáridos (Iwanaga *et al.*, 1997).

A vectorização com lipossomas implica um conhecimento e definição, rigorosos, de todos estes parâmetros, uma vez que o seu comportamento farmacocinético, *in vivo*, é principalmente determinado pela dimensão, composição lipídica (a qual determina a hidrofiliicidade/hidrofobicidade de superfície e a carga), e a fluidez da bicamada lipídica (Crommelin e Schreier, 1994; Takeuchi *et al.*, 2001).

Devido à sua versatilidade estrutural em termos de diâmetro, composição, carga de superfície, fluidez membranar e capacidade teórica de incorporar quase qualquer molécula, independentemente da sua solubilidade, ou de colocar à sua superfície ligandos cito-específicos, os lipossomas têm o potencial para serem modificados de modo a assegurar a produção de formulações optimizadas para uso clínico (Adler-Moore e Proffitt, 1993; Ringdén *et al.*, 1992).

Estas características únicas dos lipossomas, aliadas à sua biodegradabilidade, à sua potencial inocuidade e às suas semelhanças com as membranas biológicas conduziram à sua aplicação desde o início dos anos 70, na cedência de fármacos (Ammar *et al.*, 1994, Banerjee *et al.*, 1996) e agentes de contraste (Løkling *et al.*, 2001).

Desde então, surgiram inúmeras evidências *in vivo* nomeadamente em áreas como a quimioterapia antitumoral (Sharma *et al.*, 1997; Isele *et al.*, 1995; Storm *et al.*, 1995), terapêutica antimicrobiana (Couvreux *et al.*, 1991; Gregoriadis e Florence, 1993) anti-hipertensiva (Séjourné *et al.*, 1997), enzimática (Corvo *et al.*, 2000), imunológica (Khanna *et al.*, 1997) e genética (Tomlinson e Rolland, 1996; Pastorino *et al.*, 2001; Mastrobattista *et al.*, 2001), imageologia (Kumar *et al.*, 1993; Ogihara-Umeda *et al.*, 1994) e tratamento de desordens oftálmicas (Gregoriadis e Florence, 1993), que indicam claramente que algumas formulações lipossómicas exibem propriedades farmacológicas superiores às formulações convencionais. Na tabela 2 estão representados alguns exemplos.

Estes trabalhos encorajaram a aplicação dos lipossomas em terapêutica e diagnóstico, humanos. A comprovação dessa potencial utilização clínica surgiu com o início da comercialização da primeira formulação lipossómica, de anfotericina B (AmBisome®) em 1990 (Adler-Moore e Proffitt, 1993). Várias outras formulações lipossómicas estão actualmente no mercado. As formulações contendo doxorrubicina (Caelyx®, Sequus Pharmaceuticals), daunorrubicina (DaunoXome®, NeXstar Pharmaceuticals Inc., CA, EUA),

^{111}In (VesCan[®], NeXstar Pharmaceuticals Inc., CA, EUA) ou azoto (Aerosomes[™], ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, EUA) constituem apenas alguns exemplos.

Abreviaturas da tabela 2: * Agente não terapêutico; ** Composição molar em transferrina não especificada; α -T, alfa-tocoferol; B-DSPE, diestearoilfosfatidiletanolamina biotinilada; Chol, colesterol; Cu, Zn-SOD, superóxido-dismutase; DCP, dicetilfosfato; DC_{15:0}PG, dipentadecanoilfosfatidilglicerol; DMPE-PEG₂₀₀₀, dimiristoilfosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 2000; DPPC, dipalmitoilfosfatidilcolina; DSPC, diestearoilfosfatidilcolina; DSPE-PEG₅₀₀₀, diestearoilfosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 5000; DSPG, diestearoilfosfatidilglicerol; HBsAg, antígeno de superfície do vírus da Hepatite B; HMPAO, oxima da hexametilpropilamina; HSPC, fosfatidilcolina hidrogenada de soja; MTP-PE, muramiltrifosfatofosfatidiletanolamina; N-SLBA, N-estearilactobionamida; OOPS, dioleoilfosfatidilserina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; POPC, palmitoiloleoilfosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; SA, ácido esteárico; SPC, fosfatidilcolina de soja; SPG, fosfatidilglicerol de soja. Tf, transferrina humana; NR, não referido.

Tabela 2. Estudos *in vivo* de diversas formulações lipossômicas com diferentes fármacos e agentes de contraste

<i>Fármaco/ agente de contra</i>	<i>Composição (razão molar)</i>	<i>Aplicação Terapêutica</i>	<i>Referência</i>
Bupivacaina	PC:Chol (4:3)	Anestesiologia	Umbrain <i>et al.</i> , 1995
Cloroquina	PC:PS:Chol (9.5:1:10)	Antimalárico	Crommelin <i>et al.</i> , 1990
MTP-PE	POPC:OOPS (7:3)	Antitumoral	Gay <i>et al.</i> , 1993
5-Fluoruracilo	DSPC:Chol:SA (7:1:2)	Antitumoral	Rajendran <i>et al.</i> , 1997
Doxorrubicina	HSPC:Chol:PEG-DSPE (2:1:0.08:0.02)	Antitumoral	Moreira <i>et al.</i> , 2001
Daunorrubicina	DSPC:Chol (2:1)	Antitumoral	Forssen <i>et al.</i> , 1996
Cu, Zn-SOD	PC:Chol:SA (7:2:1)	Artrite reumatóide	Corvo <i>et al.</i> , 1997 e 2000
^{99m} Tc-HMPAO	DSPC:Chol:DSPE-PEG ₅₀₀₀ : α -T (50:38:10:2)	Cintigrafia angiográfica	Goins <i>et al.</i> , 1996
^{99m} Tc-HMPAO	DSPC:Chol: α -toc (66:32:2)	Cintigrafia tumoral	Goins <i>et al.</i> , 1994
¹¹¹ In	DSPC:Chol (2:1)	Cintigrafia tumoral	Kubo <i>et al.</i> , 1993
Fe ₂ O ₃	DC _{15:0} PG:DMPE-PEG ₂₀₀₀ (20:1)	Imageologia medular por RM	Bulte <i>et al.</i> , 1999
Mn(II)-EDTA-DDP	EPC:Chol (8:2)	Imageologia tumoral hepática po RM	Unger <i>et al.</i> , 1994
Amicacina	HSPC:Chol:DSPG (2:1:0.1)	Infecção por <i>Mycobacterium avii</i>	Petersen <i>et al.</i> , 1996
Anfotericina B	HSPC:Chol:DSPG (2:1:0.8:0.4)	Infecções fúngicas sistêmicas	Adler-Moore e Proffitt, 1993 Ringdén <i>et al.</i> , 1992
Isotonato de pentamidina	PE:Chol:DCP (7:2:1)	Leishmaniose visceral	Banerjee <i>et al.</i> , 1996
HbsAg	PC:AS:N-SLBA (8:1:1)	Profilaxia da Hepatite B	Kim e Jeong, 1997
Praziquantel	DPPC:Chol (7:6)	Schistosomíase	Ammar <i>et al.</i> , 1994
Plasmideo para Luciferase*	Tf-DOTAP/DOPE (**:1:1)	Terapia génica	Slepuskin <i>et al.</i> , 1997
Iopromida	PC:Chol:SA (4:5:1)	Tomografia hepática	Krause <i>et al.</i> , 1993
N ₂	DPPC	Ultrassonografia cardiovascular	Unger <i>et al.</i> , 1994

1.2.1.2. Nanopartículas

As nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) são partículas sólidas coloidais cujas dimensões variam entre 1 a 1000 nm (Kreuter, 1994). São constituídas por lípidos sólidos (Müller *et al.*, 1996a; Müller *et al.*, 1996; Mehnert e Mäder, 2001), macromoléculas de origem natural ou sintética (Sinha e Kumria, 2001; Kuwatsuru *et al.*, 1997; Langer *et al.*, 2000), polímeros (Uhrich *et al.*, 1999) biodegradáveis⁷ ou não⁸, e com potencial utilização terapêutica como adjuvantes em vacinas (Prokop *et al.*, 2002), como veículos de meios de contraste (Morel *et al.*, 1998; Marchal-Heussler *et al.*, 1999), de fármacos (Damgé *et al.*, 1997; Kreuter, 2001; Langer K, 2000; Soma *et al.*, 1999) ou de ambos (Unger *et al.*, 1998). As nanocápsulas são compostas por um núcleo oleoso interno encerrado por uma parede polimérica com surfactantes lipófilos e/ou hidrófilos na interface (Legrand *et al.*, 1999), enquanto que as nanosferas têm uma estrutura polimérica matricial (Bodmeier e Maincent, 1998).

A sua aplicação na administração de fármacos foi inicialmente desenvolvida por Speiser *et al.* (Marty *et al.*, 1978) ao descreverem um processo de obtenção de nanocápsulas constituídas por um material polimérico sintético capaz de reter fármacos e antigénios .

Desde então, foram desenvolvidos inúmeros processos de produção (Kreuter, 1994; Fessi *et al.*, 1989; Li JK *et al.*, 1998), aplicados a diversos fármacos e em diversas áreas terapêuticas, quer para administração oral (Leroux *et al.*, 1996; Carino *et al.*, 2000; Florence, 1997), parentérica (Kreuter, 2001; Alléman *et al.*, 1998) ou ocular (Calvo *et al.*, 1996 e 1996a; De Campos *et al.*, 2001).

Skiba *et al.* (1996 e 1996a) demonstraram a formação de nanoesferas recorrendo a β -ciclodextrinas. A combinação de nanopartículas poliméricas e microemulsões conduziu ao desenvolvimento de nanopartículas de lípidos sólidos (SLNs) para administração endovenosa (Jenning *et al.*, 1998). A sua reduzida toxicidade *in vitro* (Müller *et al.*, 1997 e 1997a; Bocca *et al.*, 1998) e *in vivo* (Müller *et al.*, 1996a), a libertação controlada de fármacos, a estabilidade de longo termo e a possibilidade de autoclavagem sugerem a hipótese da sua produção em larga escala (Gasco, 1997; Mehnert e Mäder, 2001).

⁷ Os mais utilizados e estudados são os poliésteres, incluindo os poli-(ácido láctico) (PLA), poli-(ácido glicólico) (PGA) e respectivos copolímeros. Também os poli-(alquilcianoacrilatos) (Cavalli *et al.*, 1997), poli-(carbonatos), albumina, dextrano (Sinha e Kumria, 2001), gelatina (Kumar, 2000), poli-(hidroxibutirato) e poli-(hidroxivalerato), poli-(álcool vinílico) (Li *et al.*, 1998), polissorbato 80 (Gulyaev, 1999), quitosano (Kumar, 2000), de entre outros (Müller *et al.*, 1996).

⁸ Ex: metilmetacrilato, copolímeros do 2-hidroxi-etil-metacrilato, ácido metacrílico e acrilamida.

As moléculas podem ser incorporadas nas nanopartículas durante a polimerização na presença do fármaco (Soma *et al.*, 1999; Alyautdin *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1996), durante a produção a partir de polímeros pré-sintetizados (Berton *et al.*, 1999) ou por adsorção do fármaco a nanopartículas previamente formadas (Nakada *et al.*, 1996; Zambaux *et al.*, 1999; Fattal *et al.*, 1998). Dependendo da afinidade do fármaco para o polímero, a molécula será adsorvida à superfície, dispersa na matriz polimérica da nanopartícula em forma de solução ou dispersão sólida ou, em certos casos, o fármaco pode ser ligado covalentemente ao polímero (Soma *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 1999). No entanto, o tipo de surfactante utilizado parece ter efeitos adversos ao nível do sistema imunitário pelo que este tipo de nanopartículas ainda carece de algumas melhorias tecnológicas.

O comportamento *in vivo* das nanopartículas depende essencialmente das propriedades físico-químicas do sistema coloidal (Soppimath *et al.*, 2001). O diâmetro constitui o aspecto principal, embora outros parâmetros, tais como a densidade, peso molecular e cristalinidade do polímero, influenciem a libertação do fármaco (ou agente de contraste) e a velocidade de biodegradação das nanopartículas (Cruz *et al.*, 1997; Feng e Huang, 2001). A carga de superfície, a hidrofiliicidade e a hidrofobicidade influenciam significativamente a interação com o meio biológico e a biodistribuição (Duro *et al.*, 1999; Hawley *et al.*, 1997). Diâmetros superiores a 100 nm tendem a restringir a sua biodistribuição, contribuindo para um aumento da retenção pelas células de Kuppfer ou outras populações celulares fagocíticas do MPS (Lourenço *et al.*, 1996; Couvreur *et al.*, 1992). Têm sido adoptadas várias estratégias para modificar as suas propriedades de superfície (Labhasetwar *et al.*, 1998; Greenwald, 2001), o que poderá permitir alterar o perfil farmacocinético, bem como diminuir a captação hepática ou aumentá-la a nível do baço ou de outros órgãos, não pertencentes ao MPS (Panagi *et al.*, 2001).

A vectorização de nanopartículas para tecidos não pertencentes ao MPS pode ser modulada com sistemas coloidais de diâmetro inferior a 50-60 nm. A diminuição da toxicidade da primaquina adsorvida em nanopartículas de PIHCA no tratamento da leishmaniose visceral é um exemplo (Gaspar *et al.*, 1991). A preparação de nanopartículas de poli-(cianoacrilato de isobutilo) (PIBCA) e poli-(cianoacrilato de iso-hexilo) (PIHCA) inferiores a 50 nm poderá abrir novas perspectivas para a cedência trans-endotelial de fármacos (Seijo *et al.*, 1990).

Outra estratégia consiste na utilização de revestimento hidrofílico, recorrendo, por exemplo, ao polietilenoglicol (PEG) (Gref *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2001) ou a poloxameros

(Stolnik *et al.*, 1995), colocados à superfície de nanopartículas ou sob forma de redes poliméricas (Kim e Kim, 2001).

As nanopartículas têm sido aplicadas em diversas áreas terapêuticas e de diagnóstico (tabela 3), incluindo Imageologia por Ressonância Magnética (IRM) (Torchilin, 2000; Yu *et al.*, 1995; Hamm *et al.*, 1990), ultrassonografia (Blomley *et al.*, 2001; Unger *et al.*, 1998), anti-tumoral (Fonseca *et al.*, 2002; Soma *et al.*, 1999; Brigger *et al.*, 2001) e terapia genética (Lambert *et al.*, 2001; Hirosue *et al.*, 2001).

Tabela 3. Estudos, *in vivo*, de nanopartículas em diferentes áreas terapêuticas e de diagnóstico.

<i>Fármaco</i>	<i>Polímero</i>	<i>Indicação Terapêutica</i>	<i>Ref^{aa}</i>
Primaquina	PIHCA	Leishmaniose visceral	Gaspar <i>et al.</i> , 1991
Paclitaxel	PLGA	Antitumoral	Feng e Huang <i>et al.</i> , 2001 Fonseca <i>et al.</i> , 2002
ZnPCl ₄	PIHCA	Antitumoral	Lenaerts <i>et al.</i> , 1995
Doxorrubicina	PIHCA PIBCA PLGA Quitosano	Antitumoral	Verdun, 1990 Soma <i>et al.</i> , 1999 Yoo <i>et al.</i> , 1999 Janes <i>et al.</i> , 2001
5'-Fosforiloligotimidilato	PIBCA	Hepatite viral	Nakada <i>et al.</i> , 1996
Ampicilina	PHCA	Salmonelose	Meijer <i>et al.</i> , 1995
Indometacina	PCL	Edema macular cistóide	Calvo <i>et al.</i> , 1996 e 1996a
Ciclosporina A	Quitosano	Patologia extra-oculares	De Campos <i>et al.</i> , 2001
Pilocarpina	PBCA, PHCA	Glaucoma	Sintzel <i>et al.</i> , 1996 Merkli <i>et al.</i> , 1995
Oligonucleótidos	PLA PIBCA PIHCA	Terapia gênica antitumoral Terapia gênica de patologias hepáticas	Berton <i>et al.</i> , 1999 Fattal <i>et al.</i> , 1998
DNA (plasmídeo)	PLGA PLA-PEG	Terapia gênica	Cohen <i>et al.</i> , 1998 Perez <i>et al.</i> , 2001
¹¹¹ In-oxima	PLGA; PCL	Cintigrafia hepática	Marchal-Heussler <i>et al.</i> , 1999
Fe ₂ O ₃ e Fe ₃ O ₄	Dextrano	IRM de tumores hepáticos	Kuwatsuru <i>et al.</i> , 1997
GdDTPA	Quitosano	Terapêutica antitumoral de captura neutrônica	Tokumitsu <i>et al.</i> , 1998, 1999a e 1999
Anfotericina B	PLGA	Infecções fúngicas sistêmicas	Venier-Julienne e Benoit, 1996
Doxorrubicina	Polissorbato 80 Quitosano	Antitumoral	Gulyaev <i>et al.</i> , 1999 Janes <i>et al.</i> , 2001
Inibidor protease HIV-1	Eudragit®	S.I.D.A.	Leroux <i>et al.</i> , 1996

Abreviaturas: PBCA, poli (cianoacrilato de butilo); PCL, poli-ε-caprolactona; PHCA, poli (cianoacrilato de hexilo); PIBCA, poli (cianoacrilato de isobutilo); PIHCA, poli (cianoacrilato de isohexilo); PLA, poli (ácido láctico); PLGA, poli (ácido láctico-co-glicólico); S.I.D.A., Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Em 1995, foi comercializada a 1ª formulação de nanopartículas para IRM (Endorem®, Lab. Berlex, Wayne NJ/Advanced Magnetics, Cambridge, MA), um agente de contraste hepático constituído por Fe₂O₃ e Fe₃O₄, revestidos por dextrano (Clément *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1995).

1.2.2. Sistemas Coloidais em Imageologia

A imageologia envolve o relacionamento entre a tridimensionalidade da região de interesse e uma quarta dimensão, o tempo, o qual se relaciona com o perfil farmacocinético do meio de contraste e o período de tempo necessário à aquisição da imagem. As propriedades físicas que podem ser utilizadas para criar uma imagem incluem a emissão ou absorção de radiação, momentos magnéticos nucleares e relaxação, e a transmissão ou reflexão de ultra-sons. As modalidades de imageologia podem ser subdivididas de acordo com o tipo de sonda utilizada, o equipamento e o método de detecção.

A medicina nuclear (cintigrafia gama), a tomografia computadorizada (CT), a ultrasonografia (US) e a imageologia por ressonância magnética são extensamente utilizadas na prática clínica para obter imagens de áreas patológicas. Todas estas modalidades diferem nos seus princípios físicos, sensibilidade, resolução (espacial e temporal), capacidade de obter imagens sem recorrer à maior resolução induzida por meios de contraste, bem como outros parâmetros (tabela 4), tais como segurança e custo.

Nas últimas duas décadas, a imageologia tem sido alvo de um importante desenvolvimento a nível tecnológico e de equipamento, o que melhorou consideravelmente a capacidade técnica na obtenção de imagens com elevada resolução espacial e de contraste. Este acréscimo de qualidade, bem como o aparecimento paralelo de novas técnicas, determinou a necessidade de desenvolver meios de contraste capazes de realçar pequenas diferenças de densidade entre tecidos normais e patológicos, nem sempre detectáveis na ausência de um meio de contraste adequado.

Na prática clínica, a visualização de órgãos e tecidos para uma detecção precoce e localização de várias patologias não pode, geralmente, ser realizada com êxito, na ausência de meios de contraste apropriados, embora se utilizem ocasionalmente IRM e CT local, não contrastados (Gil e Geraldês, 1987). As propriedades únicas dos sistemas coloidais permitem antever a sua utilização como potenciais vectores para meios de contraste.

Actualmente, as técnicas imageológicas mais utilizadas incluem a tomografia computadorizada, a cintigrafia, a ultrasonografia e a imageologia por ressonância magnética. Em todas estas técnicas, a utilização de lipossomas como vectores de meios de contraste opacos aos raios X (Krause *et al.*, 1993; Sachse *et al.*, 1993), radioactivos (Boerman *et al.*, 2000; Goins *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 1993), gasosos (Unger *et al.*, 1994; Alkan-Onyuksel *et al.*, 1996; Khanna *et al.*, 1997) paramagnéticos (Afione *et al.*, 1995;

Kabalka *et al.*, 1991) respectivamente, poderá aumentar o contraste ao vectorizarem o agente, aumentando assim a sua concentração tecidual (Torchilin, 1996).

Tabela 4. Meios de contraste e concentrações tecidulares mínimas para obter atenuação tecidual adequada^{a, b}

<i>Modalidade de Imageologia</i>	<i>Meio de contraste</i>	<i>Concentração tecidual mínima</i>
Cintigrafia gama	Radionuclídeos (¹¹¹ In, ^{99m} Tc, ⁶⁷ Ga)	≈ 10 ⁻¹⁰ M
Imageologia por ressonância magnética	Paramagnetes (Gd, Mn, Fe _n O _m)	≈ 10 ⁻⁴ M
Tomografia computadorizada	I, Br, Ba	≈ 10 ⁻² M
Ultra-sonografia	Gases (ar, árgon, azoto)	≈ 10 mg Kg ⁻¹

^aAbreviaturas: Ba, bário; Br, bromo; Fe, ferro; Ga, gálio; Gd, gadolínio; In, índio; I, iodo; Mn, manganésio; O, oxigénio; Tc, tecnécio. ^bAdaptado de Torchilin, 1996.

1.2.2.1. Sistemas coloidais em Imageologia por Ressonância Magnética

A utilização de sistemas coloidais em IRM é potencialmente vantajosa ao poder conduzir a um aumento de relaxividade com a vantagem de permitir vectorizar o meio de contraste para tecidos alvo. Basicamente, existem três estratégias para alcançar este último objectivo:

- i)* introduzir grupos funcionais no agente de contraste para permitir um reconhecimento molecular adequado,
- ii)* formar conjugados, covalentes ou não, entre o agente de contraste e biomoléculas com tropismo característico, ou
- iii)* incluir o agente de contraste num sistema de cedência adequado.

Nos últimos anos, muitos foram os trabalhos publicados nesta área, quer ao nível de sistemas não coloidais (tabela 5), quer coloidais. De entre estes, muita atenção tem sido dada a lipossomas, dada a sua versatilidade e capacidade de cedência cito-específica.

Tabela 5. Agentes de contraste não coloidais cito-específicos em desenvolvimento: alguns exemplos

<i>Tipo de agente de contraste</i>	<i>Estratégia utilizada</i>	<i>Tecido/órgão alvo</i>	<i>Referência</i>
Anti-CEA-F(ab') ₂ -polilisina-GdDTPA _n e -GdDOTA _n	Utilização de anticorpos monoclonais	Adenocarcinoma do cólon	Curtet <i>et al.</i> , 1998
Gd-[ABE-DTTA]	Introdução de grupos funcionais	Tecido cardíaco	Saab-Ismail <i>et al.</i> , 1999
Gadofrina-2	Conjugação com albumina sérica	Tecido tumoral necrótico	Hofmann <i>et al.</i> , 1999

Abreviaturas: Gadofrina-2, Gd₂-[mesoporfirina-IX-13,17-bis(2-oxo-4,7,10,10-tetra-(carboxilatometil)-1,4,7,10-tetraazadecil)-diamida]; Gd-ABE-DTTA, Gd-[N-(2-butiloxietil)-N'-(2-etiloxietil)-N,N'-bis[N'',N''-bis(carboximetil)acetamido]-1,2-etanodiamina];

A. Lipossomas

A utilização de lipossomas como potenciais agentes de contraste em IRM foi alvo de algum desenvolvimento na última década (Tilcock, 1993; Torchilin, 1996; Lasic, 1993; Unger *et al.*, 1993b), nomeadamente vectorizando óxidos de ferro superparamagnético (Bulte *et al.*, 1999; Päuser *et al.*, 1997) e quelatos paramagnéticos (Kunimasa *et al.*, 1992; Gründer *et al.*, 1998) principalmente para imageologia hepato-esplénica. De facto, o baço e o fígado foram os primeiros órgãos a serem visualizados com recurso a meios de contraste lipossómicos, uma vez que constituem alvos naturais deste tipo de vector coloidal (Torchilin, 1996; Crommelin *et al.*, 1994). A preparação de lipossomas com baixa retenção hepatoesplénica e forte acumulação em tumores também tem sido desenvolvida (Woodle, 1993), abrindo novas perspectivas a nível de imageologia não direccionada para os órgãos do sistema mononuclear fagocítico.

Nos últimos anos surgiram novas aplicações, tais como a angiografia (Bogdanov *et al.*, 1999), recorrendo a lipossomas com compostos paramagnéticos com elevado tempo de residência intravascular (Storrs, 1995).

As estratégias utilizadas na preparação destes vectores coloidais variam uma vez que os meios de contraste podem ser encapsulados na fase aquosa interna do lipossoma (Unger *et al.*, 1993b, Unger *et al.*, 1994a) ou incorporados na sua bicamada fosfolipídica (Barenholz e Crommelin, 1994; Kabalka, *et al.*, 1991; Kunimasa *et al.*, 1992), de acordo com o seu carácter predominantemente hidrófilo ou lipófilo, respectivamente. O quelato pode ainda ser ligado a um grupo funcional acoplado a um dos lípidos membranares (Torchilin, 1994; Storrs, 1995) ou modificado quimicamente pela incorporação de um grupo lipofílico que o possa ancorar no interior da bicamada fosfolipídica (Unger, *et al.*, 1994a). Os quelatos

Mn(DTPA-SA)⁹ (Unger *et al.*, 1994b; Fritz *et al.*, 1993), Mn(EDTA-DDP)¹⁰ (Unger *et al.*, 1996) e Gd(DTPA-SA)¹¹ (Kabalka *et al.*, 1991) constituem alguns exemplos.

Em imageologia por ressonância magnética hepática, os lipossomas paramagnéticos convencionais vectorizam o agente de contraste para as células de Kúpffer, sendo necessário que este suporte o ambiente acídico a que é exposto nas vesículas endocíticas (Fossheim *et al.*, 1997). Para este tipo de aplicações, os quelatos macrocíclicos de Gd(III) são geralmente considerados mais adequados (Kobayashi, 2001) relativamente aos quelatos lineares de Gd(III), devido à sua maior estabilidade (Chang, 1993).

Para administração *in vivo* é também importante assegurar que o interior aquoso do lipossoma seja isotónico com os fluídos biológicos. Os quelatos não-iónicos de Gd(III) são por isso preferidos relativamente aos iónicos, permitindo a encapsulação de soluções isotónicas com concentrações superiores de lantanídeo (Tilcock, 1999). Como tal, considerando uma determinada dosagem de Gd(III), poucas serão as formulações de lipossomas consideradas vantajosas em termos de segurança (Fossheim *et al.*, 1999).

Se o quelato paramagnético estiver encapsulado no interior aquoso do lipossoma, as moléculas de água localizadas no seu meio envolvente têm que atravessar a membrana lipossomal para interagirem com os iões paramagnéticos, e trocarem com outras do meio, de forma a propagarem eficazmente o efeito de relaxação. Quando a formulação lipossómica permite uma troca rápida de moléculas de água entre o interior e o exterior do lipossoma, a relaxividade do agente encapsulado iguala a do agente em solução (Tilcock *et al.*, 1992). Contudo, estas condições de troca rápida requerem que a membrana lipossómica esteja no estado líquido a 37°C, assumindo um risco potencial de libertação do agente de contraste para o meio exterior (Fossheim *et al.*, 1999).

A permeabilidade dos lipossomas às moléculas de água constitui um factor importante na determinação dos efeitos destes sistemas na relaxação dos prótons da água. Os factores chave incluem

- i*) a composição do lipossoma, o que determina o comportamento de fase da membrana fosfolipídica em função da temperatura,
- ii*) a estrutura do lipossoma (unilamelar ou multilamelar),
- iii*) a localização do agente de contraste na estrutura lipossómica (interior aquoso ou ligado à membrana), e

⁹ Mn(DTPA-SA), Mn-(dietilenotriaminapentacetato-monoestearilamida);

¹⁰ Mn(EDTA-DDP), Mn-[etilenodiaminatetracetato-mono(dihidroxipropildecil)amida];

¹¹ Gd(DTPA-SA), Gd-(dietilenotriaminapentacetato-monoestearilamida);

iv) a estabilidade do meio de contraste lipossómico (Tilcock *et al.*, 1992; Bačić *et al.*, 1988).

De facto, a permeabilidade da membrana lipossómica e a dimensão do vector coloidal parecem ser os factores mais influentes na relaxividade deste tipo de vectores, uma vez que ambos afectam a troca de moléculas de água entre o interior e o exterior do lipossoma (Fossheim *et al.*, 1997; Fossheim *et al.*, 1999). O aumento da relaxividade é máximo para lipossomas unilamelares pequenos. Quanto maior for a sua dimensão e quanto maior for o número de bicamadas que o constituem, maior será a probabilidade da relaxividade se tornar limitada devido à troca lenta de moléculas de água (Barsky *et al.*, 1992; Putz *et al.*, 1994). Este facto conduz à obtenção de lipossomas com volumes aquosos reduzidos e, conseqüentemente, baixas concentrações de agente de contraste, exigindo a administração de elevadas doses lipídicas para a realização de um exame de imageologia por ressonância magnética (Torchilin, 1997).

Normalmente estes meios de contraste encurtam os tempos de relaxação longitudinal (T1) e transversal (T2) dos prótons da água circundantes resultando num aumento (agentes T1) ou diminuição (agentes T2) da intensidade do sinal tecidual (Stark e Bradley, 1999). Para que se obtenha um sinal óptimo, todos os átomos metálicos devem estar livremente expostos à interacção com os prótons da água (Gerald, 1999). Esta exigência torna a encapsulação do ião metálico, no lipossoma, menos atraente do que a ligação a quelantes expostos ao espaço aquoso externo.

Os meios de contraste actualmente utilizados na prática clínica em imageologia por ressonância magnética são quelatos hidrossolúveis paramagnéticos de baixo peso molecular. Estes meios de contraste, como o GdDTPA (Brasch *et al.*, 1990, Oudkerk *et al.*, 1995), são agentes extracelulares que são rapidamente eliminados por via renal (Tilcock, 1993) e, embora actuem eficazmente como marcadores da integridade da barreira hematoencefálica (Torchilin, 1996), a ausência de especificidade tecidual que os caracteriza limita a sua utilização em imageologia hepática, esplénica, miocárdica e linfática (Unger *et al.*, 1993b; Kunimasa *et al.*, 1992). A sua encapsulação na fase aquosa de lipossomas altera a sua biodistribuição, limitando estes meios de contraste ao espaço intravascular até que o lipossoma sofra ruptura ou seja acumulado em células específicas (Mathur-De Vré, 1995).

i) Lipossomas de Mn(II)

Embora alguns grupos tenham estudado lipossomas à base de Mn(II) (Niesman *et al.*, 1990; Unger *et al.*, 1996), a maior parte dos trabalhos publicados incidem sobre lipossomas à base de Gd(III) (Torchilin, 1996; Kabalka, 1987).

A razão da utilização de lipossomas com Mn(II) incide no facto de se conseguir administrar doses de ião paramagnético pelo menos 10 vezes inferiores e, logo, o que resulta na administração de uma dose lipídica muito inferior. Este aspecto é vantajoso sobretudo do ponto de vista toxicológico e advém do facto da incorporação de Mn(II) em lipossomas aumentar a relaxividade do ião paramagnético, o que nem sempre se verifica com a encapsulação de GdDTPA neste tipo de vector coloidal (Unger *et al.*, 1993; Unger *et al.*, 1994).

Os lipossomas com complexos alquilados de Mn(II), como o Mn(EDTA-DDP), surgiram no início da década de 90 como agentes de contraste hepato-específicos com depuração hepatobiliar rápida (Fritz, 1993).

A relaxividade obtida com lipossomas de Mn(II) depende principalmente da sua granulometria, sendo superior para vectores de dimensão reduzida (Unger *et al.*, 1994), mas também da forma como o agente de contraste está associado ao vector (Unger *et al.*, 1996). Verifica-se uma dependência inversa entre a relaxividade longitudinal (T1) e a concentração interna de Mn(II) quando este é encapsulado na fase aquosa interna. O contraste obtido com complexos alquílicos saturados de MnEDTA intercalados na bicamada fosfolipídica, como o Mn(EDTA-DDP), parece ser superior ao obtido com lipossomas em que o ião paramagnético se encontra encapsulado no interior aquoso do vector, como é o caso do MnCl₂ (Unger *et al.*, 1996). Para além disso, a associação do Mn(II) ao lipossoma por intercalação na bicamada fosfolipídica permite obter um aumento de contraste hepato-específico, com um aumento concomitante da estabilidade do vector e do índice terapêutico, e ausência de contraste cardíaco (Unger *et al.*, 1994). Verifica-se uma acumulação hepática rápida e elevada, contrastante com uma reduzida captação esplénica (Fritz *et al.*, 1993). O perfil de captação sugere especificidade hepatocítica, o que também se verifica com certos quelatos de Gd(III) (Schuhmann-Giampieri *et al.*, 1993).

Estes resultados constituem um desenvolvimento positivo deste tipo de formulações face às iniciais, baseadas na encapsulação de MnCl₂, nas quais era preponderante o elevado contraste cardíaco (Unger *et al.*, 1993).

A composição lipídica do vector é outro factor a considerar (Tilcock *et al.*, 1990), bem como o tipo de complexo de Mn(II) veiculado pelo lipossoma (Niesman *et al.*, 1990). Verifica-se que a intercalação de derivados alifáticos insaturados de MnEDTA na bicamada fosfolipídica do vector permite obter formulações menos tóxicas, obtendo-se uma formulação captada pelos hepatócitos capaz de provocar um contraste hepático selectivo entre os tecidos fisiológico e tumoral, duplicando o índice terapêutico (Unger *et al.*, 1994b).

Ao contrário do Gd(III), que é retido longamente na medula óssea, o Mn(II) é eliminado continuamente do organismo por excreção hepatobiliar (Unger *et al.*, 1994). Apesar destes resultados e embora as formulações de Mn(II) continuem a ter interesse, estando actualmente uma em ensaios clínicos de fase III (Federle *et al.*, 2000), a sua segurança é um importante factor a considerar. Muitos órgãos são ávidos por manganésio, podendo extraí-lo dos seus quelatos (Wolf *et al.*, 1990; Runge, 2000). O MnCl₂, administrado por via endovenosa, é cardiotoxíco e compete com os canais de cálcio cardíacos (Unger *et al.*, 1994b). Existe também alguma preocupação acerca da neurotoxicidade a longo prazo associada à utilização de agentes de contraste de Mn(II), já que a acumulação deste elemento em várias regiões cerebrais tem sido demonstrada com vários quelatos, fruto da sua fraca estabilidade *in vivo*, nomeadamente em relação aos quelatos de Gd(III), já utilizados na prática clínica (Gallez *et al.*, 1998; Gallez *et al.*, 1996).

ii) Lipossomas sensíveis à pressão sanguínea

Uma formulação de lipossomas sensíveis à pressão sanguínea poderá constituir um potencial meio de contraste para avaliar a função cardíaca. Neste sentido, Alexander *et al.* (1996; 1996a) efectuaram uma série de estudos preliminares para avaliar as potencialidades de lipossomas com bolhas gasosas encapsuladas. Foram estudados os efeitos de susceptibilidade magnética de vários gases (ex: ar, O₂, N₂, Ar, Xe) no tempo de relaxação transversal, T₂. O efeito mais elevado foi observado com lipossomas (4-9 µm) de O₂, o que poderá estar associado ao facto do oxigénio ser paramagnético, enquanto os outros gases avaliados têm um comportamento diamagnético.

iii) Lipossomas com Gd(III)

Storrs *et al.* (1995) desenvolveram um novo tipo de lipossomas, com uma estabilidade física superior à dos lipossomas convencionais. Os lipossomas paramagnéticos polimerizados (PPLs) são sintetizados por *cross-linking* de uma molécula lipídica que contém um derivado do GdDTPA, por aplicação de radiação UV.

A administração deste tipo de formulações permitiu realçar facilmente os órgãos muito vascularizados, tais como o fígado e os rins, nas imagens ponderadas em T1 mesmo com uma dose seis vezes inferior à utilizada clinicamente com o GdDTPA. Este aumento de sensibilidade é semelhante ao observado com outros meios de contraste lipossómicos de Gd(III) (Unger *et al.*, 1996) e poderá dever-se, neste caso, a um aumento da relaxividade em relação ao composto não encapsulado. Para além disso, verificou-se que os PPLs se restringem ao espaço intravascular, ao contrário do composto livre, que atinge o compartimento intersticial.

O contraste prolongado (90 min) e elevado que se observou a nível renal e hepático indica que este tipo de lipossomas recircula sem sofrer uma eliminação significativa por estes órgãos. Duas horas após a administração, 80% da dose foi detectada no compartimento intravascular. De facto, a semi-vida de eliminação atingiu as 19h, o que é consideravelmente superior ao obtido com lipossomas não polimerizados (Kunimasa *et al.*, 1992), embora o contraste obtido seja semelhante, o que indicia o seu potencial como meio de contraste angiográfico.

A incorporação de GdDTPA em lipossomas permite transportar este quelato e obter uma localização preferencial nos órgãos do MPS, em particular baço e fígado (Kunimasa *et al.*, 1992). O perfil de biodistribuição sugere uma elevada captação pelas células de Kúpffer. Comparando com o quelato não encapsulado, a forma lipossómica permite obter uma razão superior do contraste hepático/tumor *vs.* ruído, em neoplasias intra-hepáticas (Unger *et al.*, 1993). A localização destes lipossomas confere-lhes algumas vantagens, nomeadamente na visualização de metástases hepáticas (Kabalka *et al.*, 1991).

Embora a encapsulação de quelatos de Gd(III) em lipossomas aumente o contraste fígado/tumor, estes agentes têm uma eficácia sub-ótima. A vectorização para as células de Kúpffer é provavelmente menos desejável para um meio de contraste do que o seu direccionamento para os hepatócitos. Como as células de Kúpffer estão distribuídas desigualmente e ocupam um volume inferior ao dos hepatócitos, o aumento de contraste será em princípio, inferior ao obtido se o meio de contraste for vectorizado para os

hepatócitos. Para além disso, a membrana lipossómica protege o centro paramagnético das moléculas de água do meio, diminuindo a relaxividade (Tilcock *et al.*, 1990). Esta desvantagem pode ser parcialmente compensada pela preparação de pequenos lipossomas com uma área de superfície proporcionalmente superior em relação ao volume interno, para facilitar o fluxo de água (Tilcock *et al.*, 1990). Contudo, isto conduz a uma redução do volume encapsulado, implicando a utilização de uma maior quantidade de lípido para ceder a mesma dose de Gd(III).

A visualização dos nódulos linfáticos é de extrema importância quer na detecção precoce de situações neoplásicas quer no controlo da sua evolução clínica, uma vez que constituem um alvo muito frequente de metastização (Mendelsohn, 1995). A incorporação de GdDTPA em lipossomas furtivos permitiu a visualização de nódulos linfáticos axiais/subcapsulares, alguns minutos após a sua administração subcutânea. O contraste obtido com estes lipossomas, 1,5 a 2 vezes superior ao obtido com lipossomas convencionais, poderá estar relacionado com o facto de apresentarem uma relaxividade molar dupla em relação aos lipossomas não furtivos devido à presença de um número aumentado de protões aquosos associados às cadeias de PEG (Torchilin, 1994). Como tal, a formulação de lipossomas pequenos e unilamelares com PEG à sua superfície poderá ser vantajosa não só como meio de contraste angiográfico ou vectorizado para um determinado tecido alvo com relaxividade potencialmente superior face aos lipossomas convencionais.

B. Nanopartículas

O desenvolvimento de nanopartículas para imageologia por ressonância magnética baseia-se essencialmente em partículas de óxido de ferro revestidas por dextranos, diferindo basicamente nas suas dimensões. Algumas destas formulações já estão disponíveis para utilização clínica (tabela 6).

Tabela 6. Nanopartículas superparamagnéticas disponíveis comercialmente.

<i>Meio de contraste</i>	<i>Nome comercial</i>
Fe ₂ O ₃ e Fe ₃ O ₄	Feridex IV®, Advanced Magnetics Inc., MA, EUA Endorem®, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, França Ferrosome®, NeXstar Pharmaceuticals Inc., CA, EUA

Em fase de desenvolvimento encontram-se algumas formulações de nanopartículas de lípidos sólidos com quelatos de Gd(III), nomeadamente GdDTPA e GdDOTA.

i) Nanopartículas de óxidos de ferro

O potencial dos óxidos de ferro superparamagnéticos organizados em nanopartículas de dimensão reduzida (SPIO¹², 30 a 1000 nm) e ultra-reduzida (USPIO¹³, <30 nm) tem sido foco de muitos estudos ao longo da última década. Independentemente das suas dimensões, estas nanopartículas são compostas por um núcleo de óxidos de ferro (Fe₂O₃ e/ou Fe₃O₄) revestido geralmente por dextrano (Zimmer *et al.*, 1995; Poeckler-Schoeniger *et al.*, 1999; Fahlvik *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1998), embora o carboxidextrano (Kresse *et al.*, 1998), amido (Fahlvik *et al.*, 1990), sulfato de condroitina (Kresse *et al.*, 1998a), lípidos¹⁴ (Chan *et al.*, 1992), surfactantes não-iónicos (Pochon *et al.*, 1997) e polietilenoglicol (Gellissen *et al.*, 1999) também sejam utilizados. A reduzida toxicidade *in vitro* de nanopartículas de PLA e PLGA, mas principalmente de lípidos sólidos, com magnetite, poderá constituir a base de desenvolvimento de novas formulações (Müller *et al.*, 1996).

Recentemente foi aprovada uma formulação de nanopartículas SPIO (Feridex IV®) para utilização clínica em IRM hepática (Clément *et al.*, 1998), enquanto que as USPIO se encontram em ensaios clínicos de fase II/III (Saini *et al.*, 1995; Weissleder *et al.*, 1990; Mergo *et al.*, 1998).

A primeira aplicação de nanopartículas de óxido de ferro em imageologia por ressonância magnética foi para órgãos do sistema mononuclear fagocítico¹⁵ (Weissleder, 1994).

As SPIO maiores, incluindo o Endorem® e o Resovist™, são imediatamente depuradas pelas células do sistema fagocítico mononuclear do fígado e baço (Clément *et al.*, 1995, Hamm, 1994). A nível hepático, as nanopartículas são eficazmente sequestradas pelas células de Kúpffer (Bellin *et al.*, 1994) onde são progressivamente degradadas nos lisossomas. O ferro libertado é integrado no armazém de ferro do organismo (Clément *et al.*, 1995). A quantidade de SPIO disponível para captação pela medula óssea ou pelos nódulos

¹² *Small Paramagnetic Iron Oxide*

¹³ *Ultra Small Paramagnetic Iron Oxide*

¹⁴ Ferrosome®, NeXstar Pharmaceuticals Inc., CA, EUA.

¹⁵ Os meios de contraste utilizados em imageologia por ressonância magnética hepática podem ser classificados naqueles que marcam o espaço extracelular, o sistema hepatobiliar ou o sistema reticuloendotelial (Low, 1997). Nas duas primeiras categorias incluem-se vários quelatos de gadolínio, não estando aprovado qualquer agente de contraste coloidal (Mitchell, 1997).

linfáticos é, pois, muito reduzida (Weissleder *et al.*, 1990). A eliminação destas partículas pelo fígado e baço é caracterizada por semi-vidas de 3 a 4 dias (Low, 1997).

A eliminação da corrente sanguínea depende das suas características físico-químicas, particularmente da dimensão, carga e natureza da superfície (Chouly *et al.*, 1996). Quanto maior a sua dimensão, maior será a sua captação hepática, potenciada se a carga de superfície for negativa. Essa captação é consideravelmente reduzida no caso de nanopartículas neutras. O revestimento com copolímeros hidrofílicos aumenta a permanência vascular, o que poderá ser útil em termos de imageologia de perfusão cardíaca, renal e cerebral (Torchilin, 2000).

Devido às diferenças em termos de dimensões médias, as SPIO e as USPIO apresentam diferenças distintas em termos de biodistribuição, tempo de permanência intravascular e características das imagens clínicas obtidas (Bach-Gansmo *et al.*, 1994).

As SPIO, com dimensões médias entre 30 a 1000 nm, têm uma actividade predominantemente reticuloendotelial (Chouly *et al.*, 1996; Weissleder *et al.*, 1990), enquanto que as USPIO, inferiores a 30 nm, não são imediatamente reconhecidas pelo sistema reticuloendotelial. Após administração endovenosa, estes agentes permanecem no compartimento intravascular, com uma semi-vida intravascular prolongada (Saini *et al.*, 1995; Mergo *et al.*, 1998), o que indicia o potencial destas nanopartículas como agentes de contraste angiográfico (Mayo-Smith *et al.*, 1996). Os meios de contraste USPIO atravessam o endotélio capilar para o espaço intersticial, tendo assim uma biodistribuição tecidual mais abrangente, sendo captados pelo sistema reticuloendotelial hepático, esplénico, medular e nódulos linfáticos (Réty *et al.*, 2000).

Os ensaios clínicos com formulações USPIO têm indiciado o seu potencial em termos de diferenciação entre lesões hepáticas benignas e malignas (Mergo *et al.*, 1996), bem como na caracterização de tumores hepáticos e hemangiomas (Harisinghani *et al.*, 1997a). A realização de ensaios em animais permitiu a detecção de nódulos linfáticos reactivos (Guimarães *et al.*, 1994; Clément *et al.*, 1994; Weissleder, 1994a), lesões renais (Laissy *et al.*, 1996) e estruturas vasculares (Stillman *et al.*, 1996; Anzai *et al.*, 1997; Tanimoto *et al.*, 1998), embora a detecção de enfarte do miocárdio em fase aguda não seja melhorada com a utilização deste tipo de formulações (Kroft *et al.*, 1998).

A experiência clínica inicial com este tipo de meio de contraste¹⁶ permitiu a distinção de metástases ganglionares de tumores urológicos e pélvicos (Roy *et al.*, 1995), bem como

¹⁶ Sinerem™, Advanced Magnetics Inc., MA, EUA.

nódulos linfáticos metastásicos e benignos, sendo bem tolerada (Roy *et al.*, 1995a; Roy *et al.*, 1997).

A vectorização de meios de contraste para os nódulos linfáticos apresenta um benefício potencial no diagnóstico de neoplasias e infecções (Brasch, 1992). Num exame de ressonância magnética, efectuado na ausência de meio de contraste, a intensidade de sinal dos nódulos normais e metastásicos sobrepõe-se, dificultando a sua diferenciação (Anzai *et al.*, 1997). No entanto, a presença de falsos positivos e as variações registadas ao nível da biodistribuição destes meios de contraste entre diferentes grupos de nódulos linfáticos, constituem limitações clínicas da sua utilização (Vogl *et al.*, 1997). Esta formulação foi o primeiro meio de contraste de óxido de ferro avaliado em voluntários saudáveis bem como em doentes oncológicos para a detecção de metástases nos nódulos linfáticos sendo actualmente o único meio de contraste disponível para este efeito.

O aumento de contraste em IRM com agentes de óxido de ferro permite obter informações relativas à anatomia, função e fisiologia dos nódulos linfáticos, com potencial para aumentar a especificidade e sensibilidade na detecção de metástases nodulares (Harisinghani *et al.*, 1997a; Haynes, 1995). No entanto, são necessários ensaios clínicos em escala mais alargada, no sentido de estabelecer a segurança, as indicações clínicas e proceder à avaliação final da eficácia destes meios de contraste (Anzai *et al.*, 1997).

A eficácia dos meios de contraste SPIO para imageologia hepática foi avaliada em diversos estudos (Denys *et al.*, 1994; Hagspiel *et al.*, 1995; Grandin *et al.*, 1997). Os ensaios clínicos de fase III com SPIO (Endorem®) indicam o potencial deste meio de contraste na detecção e diferenciação de lesões hepáticas focais, embora o número de lesões detectadas nem sempre aumente.

Até hoje, a limitação das nanopartículas de óxido de ferro como meio de contraste intravascular residia no facto destas não poderem ser administradas rapidamente, sob forma de *bólus*, tendo que ser injectadas em perfusão lenta, devido ao risco associado de hipotensão (Unger *et al.*, 1994d). A introdução no mercado de nanopartículas revestidas por um derivado de dextrano modificado (Resovist™) poderá ultrapassar esta questão (Reimer *et al.*, 1995). Os ensaios de fase II permitiram demonstrar o seu potencial na detecção, a nível hepático, de lesões malignas e patologias venosas (Knollmann *et al.*, 1997).

Embora este tipo de formulações tenha sido descrita ao longo dos anos como muito eficaz na alteração da intensidade de sinal tecidual, são-lhe inerentes duas desvantagens fundamentais:

i) não é raro observarem-se artefactos por distorção da imagem dependendo do meio de contraste específico e sequência de pulso utilizada e

ii) o exame de ressonância magnética é geralmente efectuado com sequências ponderadas em T2, as quais têm, tipicamente, um *ratio* sinal/ruído inferior às sequências ponderadas em T1 (Moghimi *et al.*, 1999; Harika *et al.*, 1995; Kouwenhoven, 1997).

Por outro lado, os estudos até agora publicados são deficitários no fornecimento de dados sobre as características físico-químicas deste tipo de nanopartículas, bem como da sua formulação, dificultando a interpretação global dos resultados.

ii) Nanopartículas com Gd(III)

Morel *et al.* (1998) iniciaram o desenvolvimento de nanopartículas paramagnéticas de lípidos sólidos (SLN) para administração oral, por incorporação de dois quelatos de Gd(III) utilizados clinicamente: GdDTPA e GdDOTA. O elevado aumento da relaxividade longitudinal em meio fortemente ácido é um facto importante na aplicação deste meio de contraste para imageologia gastrointestinal.

iii) Outras formulações

Recentemente foi publicado o desenvolvimento de nanopartículas de Mn(II)-hidroxilapatite revestidas com PEG (Fallis *et al.*, 1998), estáveis e atingindo uma semi-vida plasmática de 3h (Adzamli *et al.*, 1997).

Este capítulo teve como objectivo resumir alguns aspectos da vasta área de imageologia por ressonância magnética relevantes para o desenvolvimento de meios de contraste. Tentou focar-se não só as bases teóricas mecanísticas inerentes à obtenção de contraste de imagem mas também mostrar as inúmeras frentes de desenvolvimento de meios de contraste. Através de inúmeros exemplos tentou discutir-se e demonstrar-se o enorme potencial dos sistemas coloidais como vectores de meios de contraste para IRM, cuja possibilidade de simultaneamente vectorizarem o agente de contraste para um tecido alvo e aumentarem a sua relaxividade são duas características de enorme potencial científico para esta área.

Capítulo 2

Síntese e caracterização dos quelatos bisalquilamídicos de DTPA com Gadolínio

2.1. Introdução

Neste capítulo descreve-se a síntese e caracterização dos ligandos e quelatos de Gd(III) utilizados nos estudos referidos nesta tese.

Para avaliar a potencialidade de encapsulação de quelatos de Gd(III) em nanopartículas coloidais de poliésteres, visando obter formulações tecnologicamente válidas como meios de contraste, procedeu-se à síntese e caracterização de três Gd-DTPA-*bis*alquilamidas não iónicas com cadeias laterais alquilamídicas, as quais possuem hidrofobicidade crescente devido ao aumento das suas cadeias hidrocarbonadas saturadas. As suas estruturas estão representadas na figura 11.

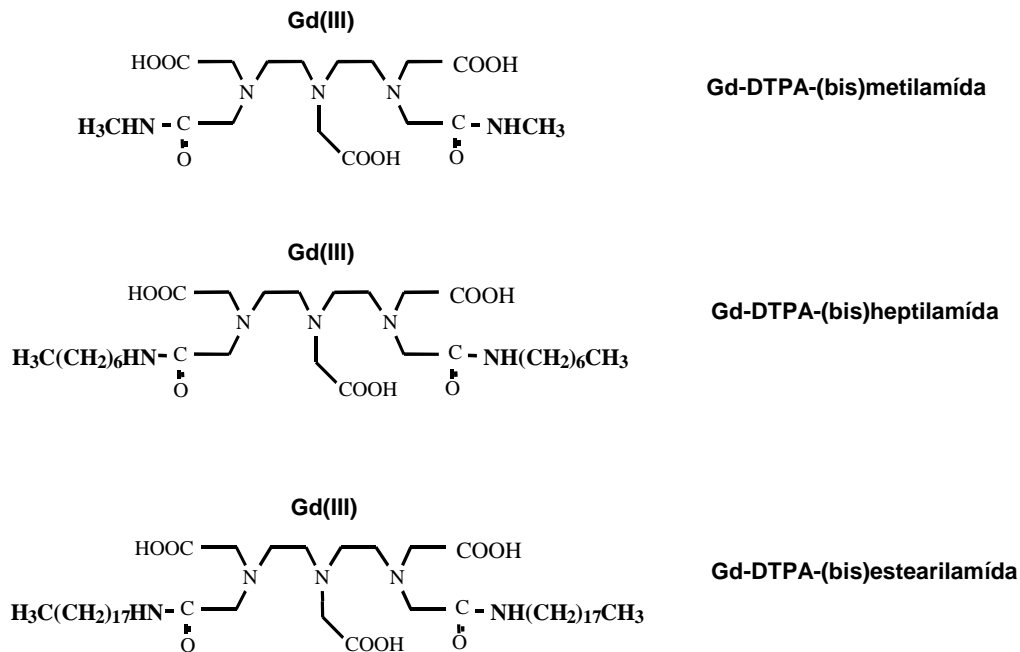


Figura 11. Fórmula química dos quelatos Gd-DTPA-*bis*alquilamidas sintetizados.

O aumento da hidrofobicidade tem várias implicações. Poderá conduzir a interacções mais fortes destes quelatos com as proteínas plasmáticas, como a albumina, ou com lípidos, potencializando a alteração da sua biodistribuição (Geraldes *et al.*, 1995). O aumento das cadeias laterais traduz-se no aumento do peso molecular do quelato, aumentando o tempo de correlação rotacional e, logo, a relaxividade em frequências altas (Caravan *et al.*, 1999).

Para além das implicações inerentes ao aumento da hidrofobicidade dos quelatos, a presença de funções amídicas nas cadeias laterais permite obter quelatos de Gd(III) não

iónicos e estáveis (tabela 7). A capacidade destes quelatos para estabelecer ligações de hidrogénio poderá conduzir a um aumento do número total de moléculas de água afectadas pelos iões Gd(III), aumentando assim a relaxividade e, conseqüentemente, a eficácia do potencial agente de contraste (Gerald *et al.*, 1995). A sua encapsulação em nanopartículas coloidais de poliésteres será também potencialmente mais eficaz se o grau de hidrofobicidade for elevado (Alléman *et al.*, 1993; Couvreur *et al.*, 1996; Niwa *et al.*, 1993).

Tabela 7. Constantes de estabilidade e DL₅₀ de quelatos de Gd(III) seleccionados

Quelato de Gd(III)	DL ₅₀	Log K* _{GdL} ^{a,*}	log K _{GdL} ^b	log K _{sel} ^c
Gd-DTPA- <i>bis</i> metilamida	14.8 [*]	14.90	15.78	9.04
Gd-DTPA- <i>bis</i> heptilamida	-	-	15.62	-
Gd-DTPA	5.6 [*]	17.70	22.26	7.04

^aConstante de estabilidade condicional (pH 7.4); ^{*}Adaptado de Cacheris *et al.*, 1990. ^bConstante de estabilidade termodinâmica; ^bAdaptado de Gerald *et al.*, 1995. ^cConstante de selectividade; ^cAdaptado de Chang, 1993; Não existe bibliografia referente ao quelato Gd-DTPA-*bis*sestearilamida.

A toxicidade *in vivo* deste tipo de quelatos está relacionada com vários factores termodinâmicos, cinéticos e com a carga do próprio quelato (Cacheris *et al.*, 1990).

A substituição de dois grupos carboxilo na molécula de DTPA por dois grupos amida provoca uma diminuição da constante de estabilidade termodinâmica (log K_{GdL}) do quelato de Gd(III) (Sherry *et al.*, 1988), o que poderia indiciar uma maior libertação de Gd(III) *in vivo*, com o conseqüente aumento de toxicidade aguda. No entanto, esse decréscimo de estabilidade é menos acentuado a pH fisiológico (log K*_{GdL}), sendo o comportamento destes quelatos significativamente superior ao do DTPA na presença de iões endógenos devido ao aumento da selectividade do ligando para o ião Gd(III) (Cacheris *et al.*, 1990). A razão para este aparente paradoxo deve-se ao facto de cada função amida coordenar com o ião Gd³⁺, decrescendo acentuadamente a toxicidade aguda neste tipo de quelatos (Chang, 1993; Sherry *et al.*, 1988). De facto, o decréscimo de basicidade associado à derivatização do DTPA em *bis*alquilamidas, com a conseqüente diminuição da estabilidade global do novo quelato (Sherry *et al.*, 1988), não se traduz numa toxicidade aguda (DL₅₀) mais acentuada (Cacheris *et al.*, 1990), mas sim num decréscimo significativo, ao qual não é alheio o carácter não iónico deste tipo de quelatos (Caravan *et al.*, 1999).

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Reagentes

O ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e o ácido 2,7-*bis*(*o*-arsenofenilazo)-1,8-dihidroinaftaleno-3,6-dissulfónico (Arsenazo III) foram adquiridos na Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). As soluções aquosas de metilamina (40%) e de heptilamina (70%), a estearilamina, o cloreto de gadolínio, o óxido de gadolínio, a hexametenotetramina, o anidrido acético e a piridina foram adquiridos na Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), bem como os solventes deuterados ácido trifluoracético (CF₃COOD), óxido de deutério (D₂O) e dimetilsulfóxido (DMSO-d₆). As placas de gele de sílica (Kieselgel 60) foram obtidas da Merck (Damstadt, Alemanha).

Outros reagentes, como o éter dietílico (Vaz Pereira), álcool isopropílico (Aldrich), HCl (Merck), etanol 95% (Pronolab, Vaz Pereira), metanol (Sigma), dimetilformamida (Sigma), acetona (Sigma), clorofórmio (Aldrich), ácido acético (Merck) e acetato de sódio (Merck) eram de grau analítico.

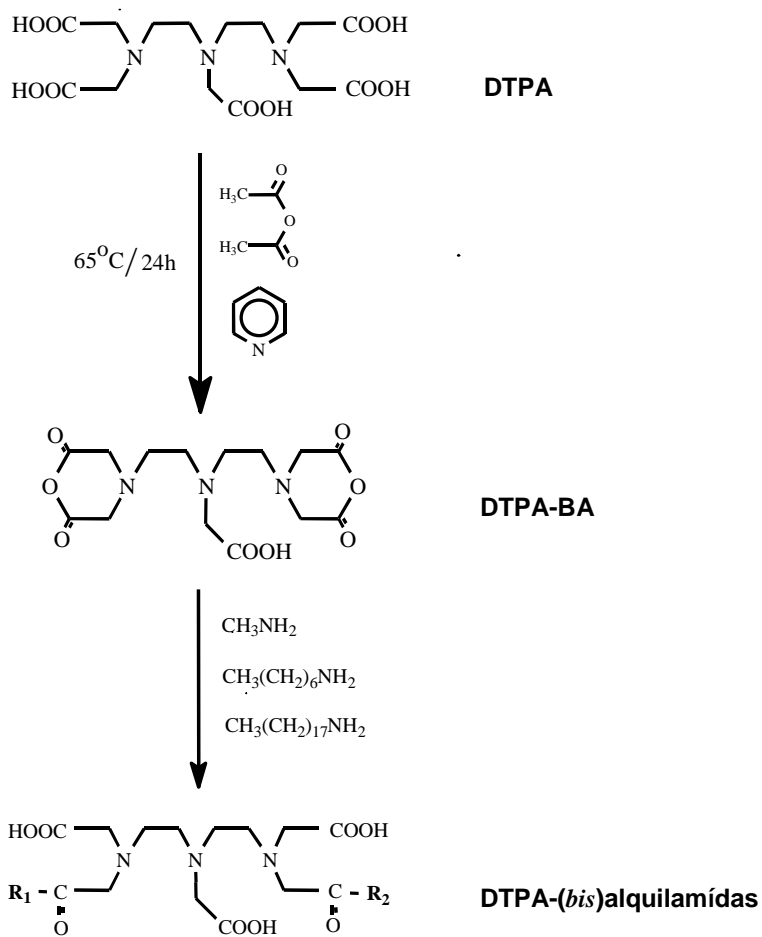
2.2.2. Síntese e caracterização dos ligandos *bis*alquilamidas de DTPA

Os ligandos sintetizados são derivados de DTPA por substituição de dois dos seus cinco grupos carboxilato por funções alquilamida [-CONHR; R=-CH₃, -(CH₂)₆CH₃ e -(CH₂)₁₇CH₃]. A síntese dos ligandos foi precedida pela conversão de DTPA na forma de ácido livre a DTPA-*bis*anidrido, uma forma mais conveniente para este tipo de sínteses, o que se encontra esquematizado na figura 12.

Na etapa inicial promoveu-se uma reacção de substituição nucleófila de acilo na molécula pentacarboxílica de DTPA, na presença de anidrido acético e piridina, obtendo-se o derivado *bis*anidrido do DTPA (DTPA-BA).

O possível mecanismo desta reacção, esquematizado na figura 13 prevê uma desprotonação inicial do grupo hidroxilo ácido (nucleófilo) pela piridina (base), a qual assegura a concentração máxima de nucleófilo carregado negativamente (desprotonado). Este promove então um ataque nucleófilo intramolecular ao segundo carbono carbonílico, com conseqüente formação do derivado *bis*anidrido, por eliminação de uma molécula de

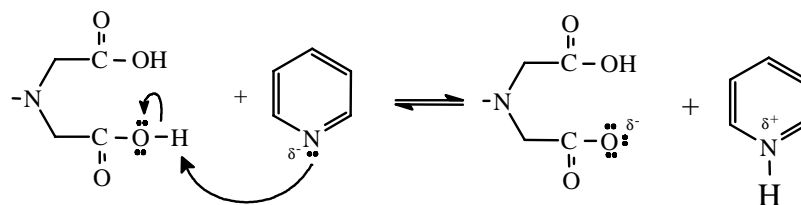
água (Volhardt e Schore, 1994). Esta desidratação é promovida pelo anidrido acético, favorecendo o equilíbrio pretendido (Vogel, 1989).



Radical alquilamina	Ligando obtido
$\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{NHCH}_3$	DTPA- <i>bis</i> -metilamida
$\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{NHC}_7\text{H}_{15}$	DTPA- <i>bis</i> -heptilamida
$\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{NHC}_{18}\text{H}_{37}$	DTPA- <i>bis</i> -estearilamida

Figura 12. Síntese dos ligandos *bis*-alquilamidas de DTPA.

1. Desprotonação do nucleófilo



2. Ataque nucleofílico intramolecular

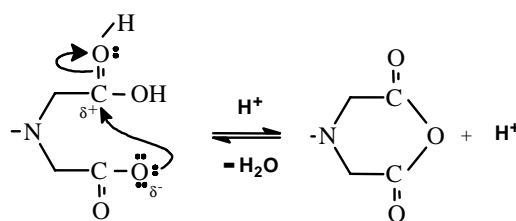


Figura 13. Possível mecanismo de síntese do DTPA-BA

Uma vez obtido o DTPA-BA, procedeu-se à síntese dos ligandos *bis*alquilamidas do DTPA, por reacção com as respectivas aminas alifáticas saturadas, as quais actuam como nucleófilos. O mecanismo da reacção encontra-se esquematizado na figura 14. As amidas são formadas por um mecanismo de adição-eliminação nucleofílica análogo ao do *bis*anidrido de DTPA (Morrison e Boyd, 1996, Volhardt e Schore, 1994). Resumidamente, a amida (nucleófilo) promove um ataque nucleofílico a um dos carbonos carbonílicos do anidrido cíclico, provocando a abertura do anel com ligação da amina e formação de um nucleófilo no segundo carboxilato. A transferência de um protão da amina para este grupo nucleófilo permite assim obter as respectivas *bis*amidas do DTPA (Volhardt e Schore, 1994).

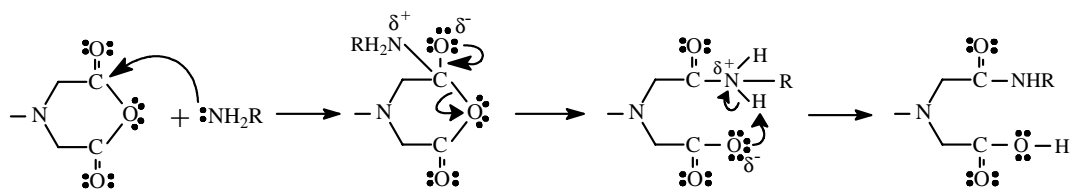


Figura 14. Possível mecanismo de síntese das *bis*alquilamidas de DTPA.

A. Síntese do derivado *bisanidrídeo* de DTPA (DTPA-BA)

N,N-*bis*[2-(2,6-dioxomorfolino)-etil]glicina

O composto foi sintetizado de acordo com o método proposto por Eckelman *et al.*, (1975) com ligeiras modificações. Aqueceu-se uma mistura de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) (49.0 g, 124.6 mmol), anidrido acético (51.8 g, 503.4 mmol) e piridina seca (62.3 ml, 771.8 mmol), a 65°C, durante 24 h, sob agitação magnética vigorosa. A mistura heterogénea de reacção foi filtrada e o sólido obtido foi lavado várias vezes com éter etílico seco, omitindo-se a lavagem com anidrido acético, proposta. O sólido foi seco a 50°C sob pressão reduzida durante 16-18 h, tendo sido utilizado sem qualquer purificação posterior (95.70%).

B. Síntese das *bisalquilamidas* de DTPA

i) bismetilamida do DTPA (DTPA-MA₂)

1,11-*bis*(metilamino)-1,11-dioxo-3,6,9-triaza-3,6,9-tris(carboxometil)undecano(DTPA-*bis*(metilamida))

De acordo com o método adoptado por Gerald¹⁷ *et al.*, (1995), adicionou-se DTPA-BA (15.28 g, 42.77 mmol) a uma solução aquosa a 40% (p/p) de metilamina (24.08 g, 310.4 mmol) arrefecida num banho de gelo, sob agitação magnética vigorosa. Após 30 minutos foi retirado o banho de gelo e a reacção prosseguiu à temperatura ambiente durante 1 h. A solução foi concentrada a pressão reduzida até se obter um volume final aproximado de 10 ml. O pH do líquido alaranjado foi ajustado a 2.5 com HCl concentrado. Adicionou-se álcool isopropílico (22.5 ml) e etanol a 95% (75 ml) e a solução foi colocada no congelador durante 40 h para induzir cristalização. O sólido foi recolhido por filtração, lavado com etanol a 95% e seco a 50°C, sob pressão reduzida, durante cerca de 20 h. O sólido incolor foi recristalizado em água/ álcool isopropílico/ etanol 95% (3:10:12) e seco (pressão reduzida) a 50°C até peso constante (81.93%).

¹⁷ Krejcarek, G.E.; Tucker, K.L., Covalent attachment of chelating groups to macromolecules. BBRC 77: 581-585, 1977 modificado por Dean, T.T.; Lin Y.; Weber, R.W.; White, D.H., Methods and composition for enhancing magnetic resonance imaging. US Patent 4, 826, 673.

ii) bisheptilamida do DTPA (DTPA-HPA₂)

1,11-bis(*n*-heptilamino)-1,11-dioxo-3,6,9-triaza-3,6,9-tris(carboxometil)undecano(DTPA-bis-*n*-heptilamida)

Seguindo o método adoptado por Gerald *et al.*, (1995), a suspensão de DTPA-BA (15.0 g; 42.0 mmol) em álcool isopropílico seco (75 ml) foi tratada com *n*-heptilamina (10.16 g; 88.19 mmol). A mistura reaccional foi mantida a 50°C durante 3 h, sob agitação magnética vigorosa. Seguidamente, foi diluída com metanol (200 ml) e filtrada. O filtrado foi seco sob pressão reduzida. O líquido viscoso amarelo obtido foi tratado com água/isopropanol/etanol 95% (3:12:10, 100 ml) em banho de gelo. O sólido branco foi recolhido por filtração. Após a sua recristalização no mesmo sistema de solventes (150 ml), foi seco a 45°C a pressão reduzida, até peso constante (23.60%).

iii) bisestearilamida do DTPA (DTPA-SA₂)

1,11-bis(octadecilamino)-1,11-dioxo-3,6,9-triaza-3,6,9-tris(carboxometil)undecano(DTPA-bis-*n*-octadecilamida)

O ligando foi obtido recorrendo ao método de síntese proposto por Jasanada e Nepveu (1992), modificado ligeiramente. As alterações efectuadas (fig. 15) referem-se essencialmente ao processo de purificação do composto, no intuito de aumentar o rendimento do processo bem como diminuir a morosidade do mesmo. A influência de tais alterações no grau de pureza obtido foi avaliada por RMN de ¹H e ¹³C.

Adicionou-se, gota a gota, uma solução de estearilamina (1.078 g, 4 mmol) em clorofórmio seco (80 ml, 40°C) a uma solução de DTPA-BA (0.786 g, 2.2 mmol) em dimetilformamida seca (100 ml, 40°C-60°C), sob agitação magnética vigorosa. A mistura reaccional foi mantida sob agitação durante 2 h, a 40°C. Após arrefecimento a 4°C/2 h, o sólido branco foi recolhido por filtração, lavado com acetona (3×150 ml) e seco (50°C) a pressão reduzida durante uma noite, obtendo-se um rendimento de 83.54%.

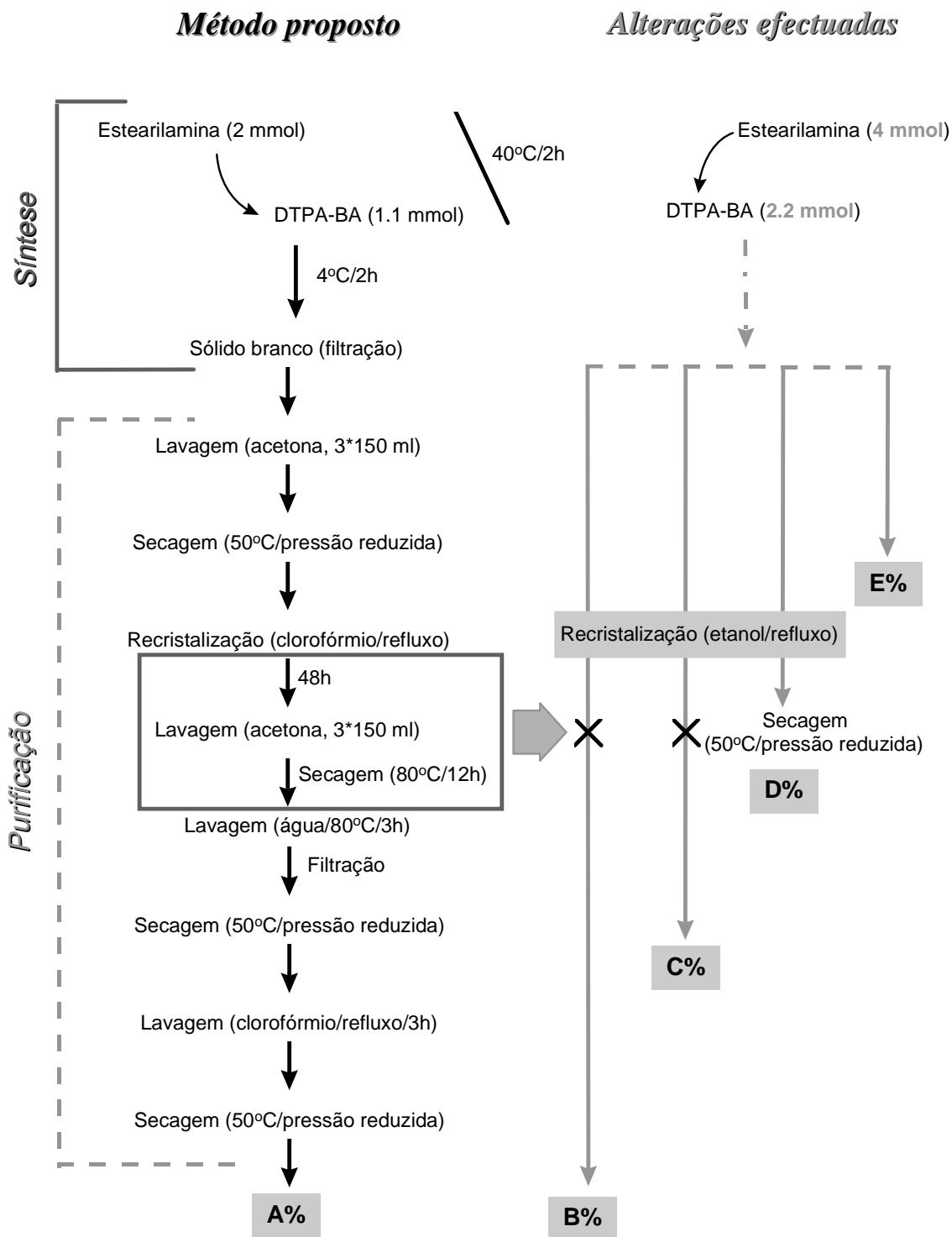


Figura 15. Alterações efectuadas ao método de síntese de DTPA-(bis)esterilamida proposto por Jasanada e Nepveu (1992).

C. Caracterização dos ligandos *bis*alquilamidas de DTPA e do intermediário *bis*anidrido do DTPA

Todos os derivados de DTPA obtidos (*bis*anidrido e ligandos *bis*alquilamidas) foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ($^1\text{H-RMN}$) e de carbono ($^{13}\text{C-RMN}$) a 500 MHz (RMN Varian Unity 500, Varian, Associate Inc., EUA).

2.2.3. Síntese e caracterização dos quelatos *bis*alquilamidas de DTPA com Gadolínio

Os quelatos de Gd(III) foram sintetizados de acordo com os métodos que a seguir se descrevem (2.2.3.A).

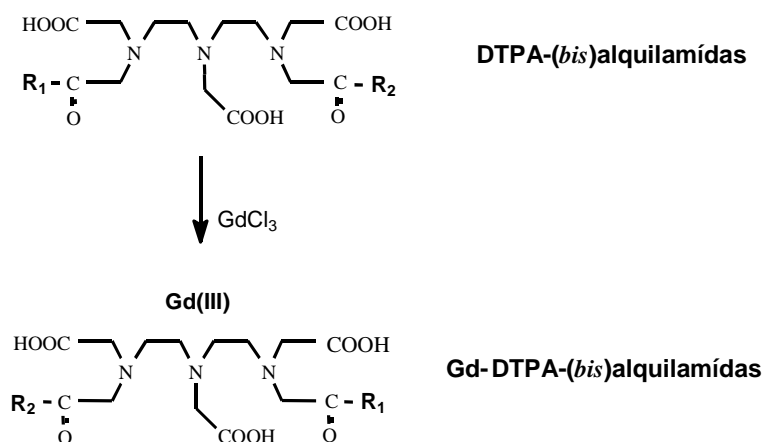


Figura 16. Processo geral de complexação de DTPA-*bis*alquilamidas com gadolínio.

No final das reacções, a presença de gadolínio livre foi avaliada qualitativamente pelo método do Arsenazo III (2.2.3.B).

A. Síntese dos quelatos *bis*alquilamidas de DTPA com Gadolínio

i) *Gd-DTPA-bis*metilamida (*Gd-DTPA-MA*₂)

{1,11-*bis*(metilamino)-1,11-dioxo-3,6,9-triaza-3,6,9-tris(carboxometil)undecano} gadolínio (III)

O quelato foi sintetizado de acordo com Konings *et al.* (1990). Aqueceu-se, sob refluxo, uma mistura de DTPA-MA₂ (455.48 mg; 1 mmol) e Gd₂O₃ seco (181.25 mg; 0.5 mmol) em água desionizada (25 ml). Após a dissolução total da mistura, acertou-se o pH a 6.5 com NaOH 1N. Adicionou-se acetona, sob agitação vigorosa, até se obter turvação da solução. Colocou-se no congelador (-30°C) para induzir cristalização. Após filtração, os cristais foram secos (60°C) a pressão reduzida durante uma noite. O rendimento da reacção foi de 41.94%.

ii) Gd-DTPA-bisheptilamida (Gd-DTPA-HPA₂)

{1,11-bis(*n*-heptilamino)-1,11-dioxo-3,6,9-triaza-3,6,9-tris(carboxometil)undecano} gadolínio (III)

De acordo com Konings *et al.*, (1990), aqueceu-se, sob refluxo, uma mistura de DTPA-HPA₂ (9.43 g; 15.12 mmol) e Gd₂O₃ seco (2.77 g; 7.64 mmol) em água desionizada (25 ml). Após a dissolução total da mistura, acertou-se o pH a 6.5 com NaOH 0.01M. Adicionou-se acetona, sob agitação vigorosa, até se obter turvação da solução. Colocou-se no congelador (-30°C) para induzir cristalização. Após filtração, os cristais foram secos (60°C) a pressão reduzida durante uma noite (70.4%).

iii) Gd-DTPA-bisestearilamida (Gd-DTPA-SA₂)

{1,11-bis(octadecilamino)-1,11-dioxo-3,6,9-triaza-3,6,9-tris(carboxometil)undecano} gadolínio (III)

O quelato foi sintetizado de acordo com o método proposto por Kabalka *et al.*, (1991) com ligeiras modificações. A solução aquosa (1 ml) de GdCl₃.6H₂O (91.0 mg; 245.0 μmol) foi adicionada, gota a gota, a 20 ml de solução etanólica de DTPA-SA₂ (200.0 mg; 223.0 μmol) sob refluxo. Após dissolução completa do ligando, a solução reaccional foi concentrada a cerca de 1/3 do seu volume, sob pressão reduzida. O pH foi aferido a 6.5 com NaOH 0.01M e a solução foi deixada refluir durante 24h. O sólido foi recolhido por filtração a pressão reduzida após ter cristalizado durante 72h a -30°C. Depois de lavado sucessivamente com água ultrapura, foi seco até peso constante (78.69%).

B. Detecção de Gd(III) livre por complexação com Arsenazo III

Este método é baseado na formação de um complexo corado verde-azulado após complexação do Gd(III) livre pelo Arsenazo III, em solução aquosa a pH 5.5-6.5 (Hvattum *et al.*, 1995; Buděšínský, 1968; Cassidy *et al.*, 1986).

A ausência de lantanídeo livre é detectada pela inalteração da forte coloração roxo escuro da solução de Arsenazo III. De modo a evitar que esta forte coloração mascarasse a presença de Gd(III) livre na solução a titular, as soluções reaccionais finais foram submetidas a cromatografia em camada fina em placas de gel de sílica.

Os cromatogramas foram obtidos por desenvolvimento em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (50:30:8:4). O pH do desenvolvimento foi previamente aferido a 5.5-6.5 com tampão acetato e hexametenotetramina a 1%.

Depois de secos, os cromatogramas foram pulverizados com uma solução aquosa de Arsenazo III (0.1mM) em ureia (0.01M). O pH da solução foi previamente aferido a 5.5-6.5 com tampão acetato e hexametenotetramina a 1% (Cassidy *et al.*, 1986).

Para controlar o método foram simultaneamente aplicadas manchas de solução aquosa de Gd(III) e soluções etanólicas dos ligandos livres.

C. Caracterização dos quelatos *bis*alquilamídicos de DTPA com Gadolínio

Os quelatos de Gd(III) foram caracterizados por análise elementar¹⁸ (%C; %N; %H). O teor de Gd(III) foi determinado por Espectroscopia de Emissão Atómica associada a Plasma acoplado por Indução (ICP-AES).

C.1. Espectroscopia de Emissão Atómica associada a Plasma acoplado por Indução (ICP-AES)

A espectroscopia de emissão atómica associada a plasma acoplado por indução (ICP-AES) é um método espectroscópico convencional utilizado desde a década de 70, cujas propriedades únicas advêm principalmente da fonte de excitação utilizada, o plasma induzido (Thompson e Walsh, 1983; Fassel e Kniseley, 1974).

¹⁸ Departamento de Química da Universidade de Aveiro, sob regime de prestação de serviços.

Quando acoplado ao argon (Ar) é uma fonte eficaz de emissão atômica que pode, teoricamente, ser utilizada na quantificação de todos os elementos da tabela periódica, com exceção do Ar, quer em análise simultânea (20 a 40 elementos) quer de um único elemento (Thompson e Walsh, 1983).

A espectrometria de emissão baseia-se na emissão de luz de comprimentos de onda definidos por átomos ou iões, energizados, ao reverterem espontaneamente para um estado energético inferior. Para a espectrometria de emissão quantitativa assume-se que a energia emitida é proporcional à concentração dos átomos ou iões. Contudo, é possível que alguns fótons emitidos sejam absorvidos pelos mesmos átomos ou iões, o que reduz a intensidade da radiação observada, impedindo a obtenção de proporcionalidade entre a concentração do elemento e a luz emitida.

O detector de ICP-AES é bem sucedido ao evitar estes processos de auto-absorção e auto-reversão, o que se traduz na vasta gama de concentrações para as quais se obtém linearidade de resposta do detector, geralmente entre 4 a 6 ordens de magnitude, o que permite uma elevada versatilidade de análise (Fassel e Kniseley, 1974).

A radiação de fundo é muito reduzida, o que contribui não só para a obtenção de linearidade, mas também para a melhoria dos limites de detecção, geralmente muito baixos (1-100 µg/L) para a maioria dos elementos. A literatura refere valores da ordem de 2 a 7 ng/L para o gadolínio (Mazzucotelli *et al.*, 1995).

Esta técnica possui também uma elevada sensibilidade inerente que advém da eficácia permitida pela temperatura uniforme e elevada, utilizada na excitação das linhas atômicas ou iónicas, conjuntamente com a reduzida radiação de fundo (Fassel e Kniseley, 1974).

A ausência quase total de interferências químicas advém principalmente da elevada temperatura da fonte de excitação e do ambiente quimicamente inerte em que a amostra é atomizada, pelo que o ICP é actualmente considerado o método menos sensível a interferências de entre todas as técnicas espectrométricas disponíveis (Thompson e Walsh, 1983; Moore, 1989), sendo eleito como método de referência para análise de elementos da série lantanídea, como é o caso do gadolínio (Kantipuly e Westland, 1988; Hagan *et al.*, 1988; Geraldès *et al.*, 1995).

As características únicas deste método têm permitido a sua aplicação a um vasto conjunto de áreas de estudo, nomeadamente mineralogia, geoquímica, química inorgânica, indústria cerâmica, de entre outras, aplicado a amostras tão diversas como sejam rochas,

minerais, solos, água, ar, tecidos vegetais e animais, e agentes de contraste particulares (Fossheim *et al.*, 1999; Frame e Uzgiris, 1998).

Este método tem sido utilizado na quantificação de gadolínio em amostras tecidulares (Fossheim *et al.*, 1999; Harpur *et al.*, 1993) e fluídos biológicos (Frame e Uzgiris, 1998; Silva *et al.*, 1998) de animais injectados com agentes de contraste.

A sua elevada sensibilidade para o Gd(III) (Kantipuly e Westland, 1988), a linearidade obtida com um vasto leque de concentrações, bem como a reduzida massa de amostra (1-10 mg) necessária à preparação das soluções (Frame e Uzgiris, 1998) conduziu à sua eleição como método de doseamento de Gd(III) utilizado neste trabalho, tendo sido efectuadas quantificações na gama de 10 ng/ml a 1.1 mg/ml.

i) Materiais e Métodos

O doseamento de Gd(III) foi efectuado pelo Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro (em regime de prestação de serviços). O Gd(III) foi libertado das amostras (quelatos e matriz polimérica) por tratamento químico. O seu teor foi determinado num espectrómetro sequencial (JY 70 Plus, Jobin Yvon, Edison, NJ, EUA) a 324.247 nm. As condições de análise encontram-se descritas na tabela 8.

Tabela 8 – Condições de análise de Gd(III) por ICP-AES

Potência incidente	1000 W
Potência reflectida	<5 W
Frequência do gerador	40.68 MHz
Fluxo de gás de arrefecimento	12 L min ⁻¹
Fluxo de gás auxiliar	0 L.min ⁻¹
Pressão do gás de nebulização	3.5 bar
Caudal de nebulização da solução	1.25 ml.min ⁻¹
Comprimento de onda analítico	Gd 324.247 nm
Nebulizador	Concêntrico em vidro (Meinhard TR 50 C1)
Integração	3×1s

Tratamento químico

As amostras sofreram ataque químico por digestão com ácido nítrico-ácido perclórico. A escolha desta técnica de tratamento recaiu sobre o facto desta ser aquela que causa menor interferência na intensidade do sinal emitido (Thompson e Walsh, 1983; Danzaki *et al.*, 1999).

Resumidamente, as amostras foram tratadas com HNO₃ concentrado e evaporadas à secura em placa a 100°C. Após repetição do processo, adicionaram-se HNO₃ e HClO₄. Após evaporação à secura, o resíduo foi dissolvido em HNO₃ a 10%.

Introdução da amostra (nebulização)

A solução aquosa de amostra foi nebulizada em pequenas gotas (diâmetro inferior a 10 µm), através da baixa pressão gerada por uma corrente de Ar a elevada velocidade no interior do nebulizador.

O aerossol resultante foi então transportado para o plasma de Ar através de um fluxo injector do mesmo gás.

Sistema de excitação da amostra

Um plasma é um gás no qual uma fracção significativa dos átomos está ionizada, o que lhe permite comportar-se como conductor eléctrico e interagir com campos magnéticos (Fassel e Kniseley, *et al.*, 1974).

O Árgon, gás não condutor, ascende através de um circuito vertical de três círculos concêntricos de quartzo, envolvidos exteriormente por uma corrente de elevada frequência. Por acção de uma serpentina Tesla, o Árgon é ionizado, formando-se o plasma de iões e electrões (Moore, 1989).

O fluxo da corrente de frequência elevada gera um campo magnético de oscilação rápida, o qual interage com o plasma, sob forma de acoplamento induzido. A resistência oferecida pelas partículas do plasma durante a aceleração resultante gera temperaturas entre 8000 a 10000K (Fassel e Kniseley, 1974). O circuito é arrefecido por um fluxo tangencial de Árgon.

A amostra nebulizada, transportada por uma corrente central de Árgon, forma um túnel no interior da “chama” de plasma, alcançando uma temperatura próxima de 8000K (Thompson e Walsh, 1983). A esta temperatura a atomização é virtualmente completa devido à excitação e ionização parcial, dos átomos.

Recolha de dados

A “cauda do plasma”, localizada alguns milímetros acima do núcleo de plasma, é a região utilizada para observação espectroscópica, uma vez que aí as emissões atómicas podem ser quantificadas contra uma radiação de fundo mínima (Thompson e Walsh, 1983; Fassel e Kniseley, 1974).

A intensidade de luz emitida pelos átomos ou iões é convertida em sinais eléctricos quantificáveis aos comprimentos de onda de cada elemento.

Cada elemento apresenta várias linhas espectrais, seleccionando-se a melhor linha para aplicação analítica. O Gd(III) caracteriza-se por 12 linhas espectrais, tendo-se seleccionado a linha Gd 324.247 nm, a qual, sendo a de maior intensidade espectral, é aquela que apresenta o menor limite de detecção (Danzaki *et al.*, 1999).

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Caracterização do derivado *bisanidrido* de DTPA (DTPA-BA)

O método de síntese original propunha a lavagem alternada do sólido com anidrido acético e éter etílico, tendo-se verificado que a omissão do primeiro, extremamente tóxico, resultava na obtenção de DTPA-BA com um grau de pureza similar, razão da opção tomada. De facto, a piridina é geralmente o principal contaminante do composto sintetizado. Com esta alteração, a piridina foi totalmente removida, como demonstra a ausência dos seus sinais característicos¹⁹ nos espectros de ¹H (δ 7.1-8.8 ppm) e ¹³C (δ 124-150 ppm).

A formação do *bisanidrido* de DTPA, simétrico, é confirmada pelo sinal obtido a 166.101 ppm (fig. 17B) referente aos quatro grupos carbonilo dos anéis anidrido, bem como pela presença de um único sinal referente a grupos carboxilato (172.244 ppm), resultados concordantes com os sinais obtidos por análise de ¹H (fig. 17A). Na molécula de DTPA livre, este carboxilato – grupo glicina – surge numa frequência um pouco mais elevada (181.323 ppm) e os quatro carboxilatos simétricos surgem a 181.216 ppm.

Estes resultados são similares aos já publicados por Geraldès *et al.* (1995) para a síntese deste composto, obtendo-se um rendimento semelhante (95.7%).

Caracterização por RMN (fig. 17):

A. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ref^a TMS a δ 0.0 ppm) δ (ppm): 3.511 (s, 2H, $\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 3.426 (s, 8H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{COOOCCH}_2\text{N}^1$); 2.966 (t, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 2.871 (t, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$).

B. RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6 , ref^a *t*-butanol a δ 31.200 ppm) δ (ppm): 171.863 ($\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 165.718 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{COOOCCH}_2\text{N}^1$); 54.463 ($\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 52.527 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{COOOCCH}_2\text{N}^1$); 51.686 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 50.633 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$).

2.3.2. Síntese e caracterização das bisalquilamidas de DTPA

i) bis-metilamida do DTPA (DTPA- MA_2)

A estrutura simétrica deste derivado é denunciada pelos espectros de ^1H (fig. 18A) e de ^{13}C (fig. 18B), com um único sinal (^{13}C , δ 27.308 ppm; ^1H , δ 2.801 ppm) para os grupos metilo laterais; as ausências dos sinais referentes quer à metilamina livre³ (^{13}C , δ 26.397 ppm, ^1H , δ 1.373 ppm) quer aos grupos carboxilato simétricos do DTPA na forma livre (^{13}C , δ 181.216 ppm e 181.323 ppm), pressupõem um grau de pureza satisfatório. Os resultados obtidos são concordantes com outros já publicados para a síntese deste composto (Geraldes *et al.*, 1995) tendo-se alcançado um rendimento consideravelmente superior (81.93%) ao registado por esses autores (50.4%).

Caracterização por RMN (fig. 18):

A. RMN de ^1H (500 MHz, D_2O , ref^a TMS a δ 0.0 ppm) δ (ppm): 3.888 (s, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CO}_2$); 3.779 (s, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CONH}$); 3.746 (s, 2H, $\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 3.405 (t, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 3.327 (t, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 2.801 (s, 6H, NHCH_3).

B. RMN de ^{13}C (500 MHz, D_2O , ref^a *t*-butanol a δ 31.200 ppm) δ (ppm): 173.724 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CO}_2$); 173.267 ($\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 170.756 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CONH}$); 58.219 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CO}_2$); 57.859 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CONH}$); 56.072 ($\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 52.906 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 52.799 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 27.308 (NHCH_3);

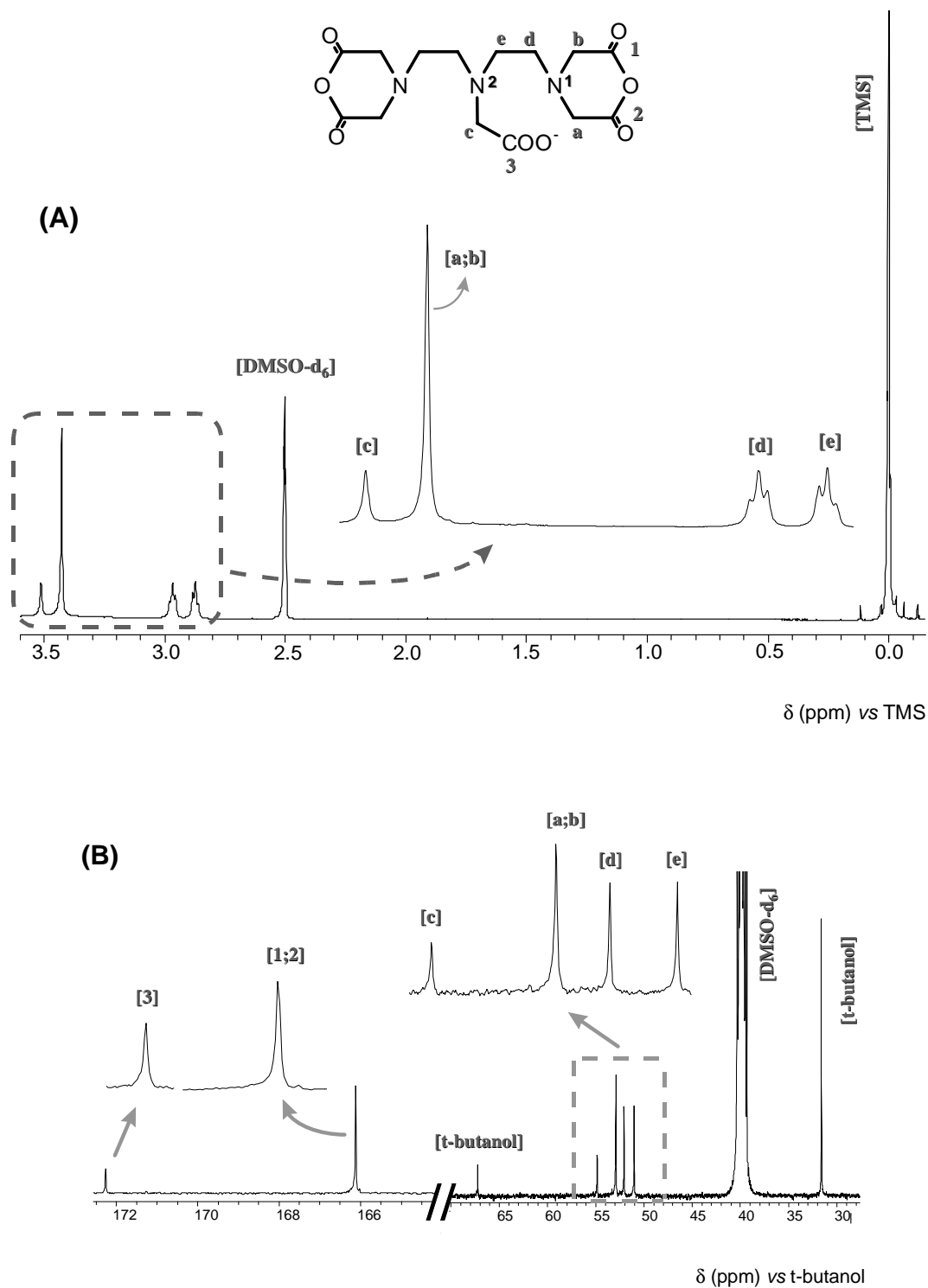


Figura 17. Espectros de RMN (500 MHz) de (A) ^1H e de (B) ^{13}C do DTPA-BA em DMSO-d_6 . Nos espectros de ^1H as posições dos sinais foram medidas relativamente ao sinal correspondente ao TMS (δ 0.0 ppm) e nos de ^{13}C , relativamente ao sinal correspondente ao *t*-butanol (δ 31.600 ppm). Na figura é também incluída a estrutura do DTPA-BA com o esquema para a identificação dos grupos metilénicos e carbonilos.

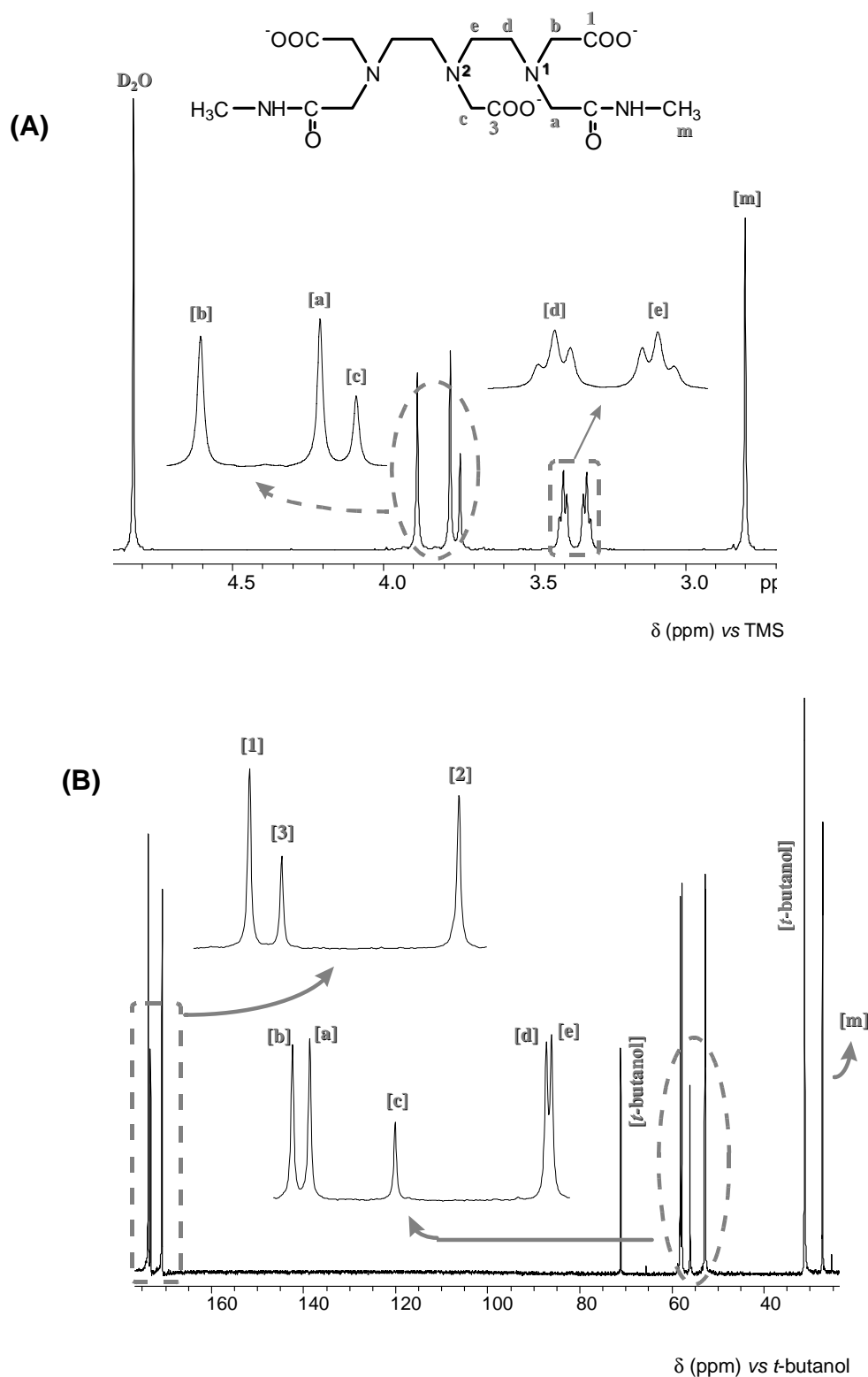


Figura 18. Espectros de RMN (500 MHz) de (A) ^1H e de (B) ^{13}C do DTPA-MA₂ em D₂O. Nos espectros de ^1H as posições dos sinais foram medidas relativamente ao sinal correspondente ao TMS (δ 0.0 ppm) e nos de ^{13}C , relativamente ao sinal correspondente ao *t*-butanol (δ 31.600 ppm). Na figura é também incluída a estrutura do DTPA-MA₂ com o esquema para a identificação dos grupos metilénicos e carbonílicos.

ii) bisheptilamida do DTPA (DTPA-HPA₂)

Com base no espectro de ¹H obtido (fig. 19A) e de acordo com a integração dos vários sinais, verifica-se a presença das duas cadeias laterais, cuja existência de sinais únicos relativos a cada grupo de prótons equivalentes indicia a simetria das mesmas. A análise do espectro de ¹³C (fig. 19B) vem confirmar estas observações, em conformidade com os aspectos já focados para o ligando *bismetilamida*. Os resultados obtidos são concordantes com os publicados por Gerald *et al.* (1995).

Caracterização por RMN (fig. 19):

A. RMN de ¹H (500 MHz, D₂O/NaOD, ref^a TMS a δ 0.0 ppm) δ(ppm): 3.407 (s, 2H, N²CH₂CO₂); 3.350 (s, 4H, N¹CH₂CO₂); 3.221 (s, 4H, N¹CH₂CONH); 3.055 (q, 4H, N¹CH₂CH₂N²); 2.939 [t, 4H, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 2.816 (t, 4H, N¹CH₂CH₂N²); 2.499 [s, 4H, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 1.397 [t, 4H, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 1.236 [m, 12H, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 0.850 (t, 6H, NHCH₃).

B. RMN de ¹³C (500 MHz, DMSO-d₆, ref^a *t*-butanol a δ 31.200 ppm) δ(ppm): 172.513 (N¹CH₂CO₂); 169.962 (N¹CH₂CONH); 169.608 (N²CH₂CO₂); 57.460 (N¹CH₂CO₂); 55.213 (N²CH₂CO₂); 55.073 (N¹CH₂CONH); 52.149 (N²CH₂CO₂); 50.882 (N¹CH₂CH₂N²); 38.314 [CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 29.109 [CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 28.409 [CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 26.375 [CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 22.034 [CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃]; 13.875 [CONHCH₂CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃];

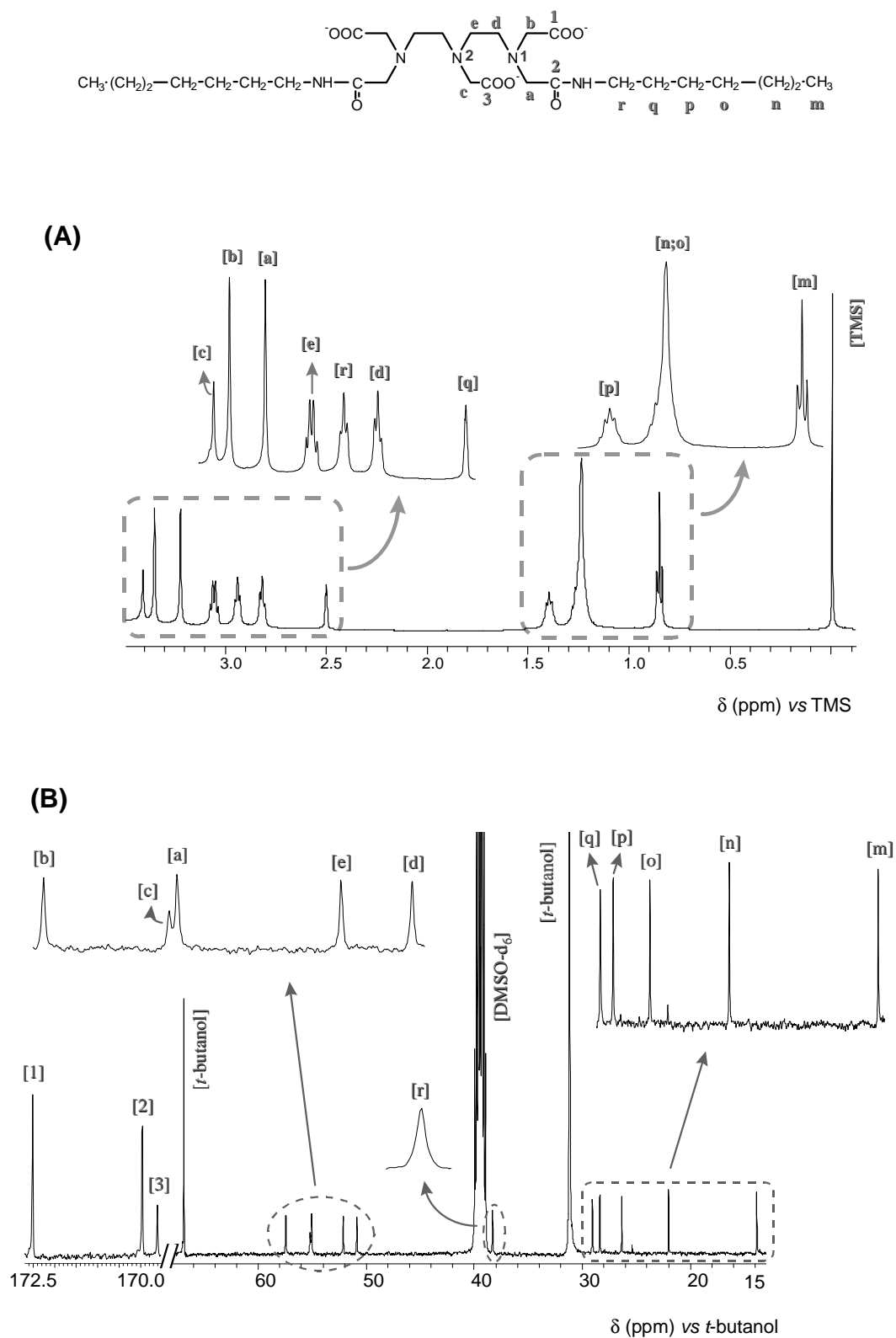


Figura 19. Espectros de RMN (500 MHz) de (A) ¹H e de (B) ¹³C do DTPA-HPA₂ em D₂O/NaOD e DMSO-d₆, respectivamente. Nos espectros de ¹H as posições dos sinais foram medidas relativamente ao sinal correspondente ao TMS (δ 0.0 ppm) e nos de ¹³C, relativamente ao sinal correspondente ao *t*-butanol (δ 31.200 ppm). Na figura é também incluída a estrutura do DTPA-HPA₂ com o esquema para a identificação dos grupos metilénicos e carbonilos.

iii) bis-estearilamida do DTPA (DTPA-SA₂)

No intuito de aumentar o rendimento da síntese deste composto bem como diminuir a morosidade da mesma, procedeu-se a uma avaliação qualitativa, por RMN de ¹H e ¹³C, do impacto que teria no grau de pureza do ligando, a introdução de determinadas alterações, nomeadamente a duplicação da quantidade de reagentes, a modificação do solvente de recristalização e a omissão de alguns processos de purificação, conforme esquematizado anteriormente na figura 15. Os resultados estão patentes na figura 20.

Partindo de quantidades molares duplas dos reagentes, procedeu-se inicialmente à alteração do solvente de recristalização, tendo-se optado por etanol em detrimento do clorofórmio, uma vez que este solvente originava uma recristalização que, além de morosa (48h), originava grandes perdas de ligando, como se verifica pelo fraco rendimento obtido (29.98%). Com esta alteração e omitindo a segunda lavagem com acetona, foi possível ascender a um rendimento de 45.67%. Por comparação dos espectros de RMN (¹H e ¹³C) do ligando, obtidos após efectuada a síntese com estes dois grupos de condições, verificou-se não existirem quaisquer malefícios detectáveis no grau de pureza do ligando³.

Neste contexto, optou-se seguidamente pela omissão da lavagem com clorofórmio, a qual visava remover a estearilamina eventualmente presente. Novamente se observou um aumento do rendimento de síntese (55.15%) sem prejuízo para o grau de pureza do composto.

No entanto, embora o rendimento tenha sido aumentado significativamente, esta síntese ainda se revestia de elevada morosidade. A obtenção do ligando omitindo a lavagem com água, a qual pretendia eliminar eventuais resíduos de DTPA na forma livre, após a recristalização em etanol, demonstrou ser um procedimento seguro, conforme se verificou por RMN de ¹H e ¹³C do ligando. No entanto, foi a omissão dessa mesma recristalização que nos permitiu obter a melhoria mais significativa no rendimento da síntese deste ligando (83.54%), tendo-se verificado que o grau de pureza não sofreu prejuízo significativo, conforme a análise dos respectivos espectros de RMN de ¹H (fig. 21A) e ¹³C (fig. 21B). Os espectros confirmam a síntese do ligando DTPA-SA₂, bem como a simetria da molécula, de acordo com os aspectos já focados e resultados publicados por outros autores (Kabalka *et al.*, 1991; Jasanada e Nepveu, 1992).

A ausência de sinais inerentes ao DTPA [δ (ppm), ^1H : 2.997, 3.090, 3.368, 3.498; ^{13}C : 181.323, 181.216, 60.419, 59.996, 53.295] na forma livre vem confirmar a não deleteriedade das alterações efectuadas.

Desta forma foi possível aumentar o rendimento desta síntese, obtendo-se seis vezes mais sólido em 25% do tempo inicialmente previsto.

Caracterização por RMN (fig. 21):

A. RMN de ^1H (500 MHz, CF_3COOD , ref^a TMS a δ 0.0 ppm) δ (ppm): 4.551 (s, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CO}_2$); 4.530 (s, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CONH}$); 4.120 (s, 2H, $\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 4.073 (t, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 3.765 (t, 4H, $\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 3.409 [t, 4H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$]; 1.642 [t, 4H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$]; 1.356 [s, 60H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$]; 0.919 [t, 6H, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$];

B. RMN de ^{13}C (500 MHz, CF_3COOD , ref^a CF_3COOD a δ 114.51 ppm e 161.52 ppm) δ (ppm): 175.286 ($\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 171.144 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CO}_2$); 166.846 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CONH}$); 59.275 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CO}_2$); 57.847 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CONH}$); 55.949 ($\text{N}^2\text{CH}_2\text{CO}_2$); 55.779 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 53.030 ($\text{N}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^2$); 43.236 [$\text{CONHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$]; 33.694 [$\text{CONHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$]; 24.249-31.423 [$\text{CONHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$]; 14.648 [$\text{CONHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$].

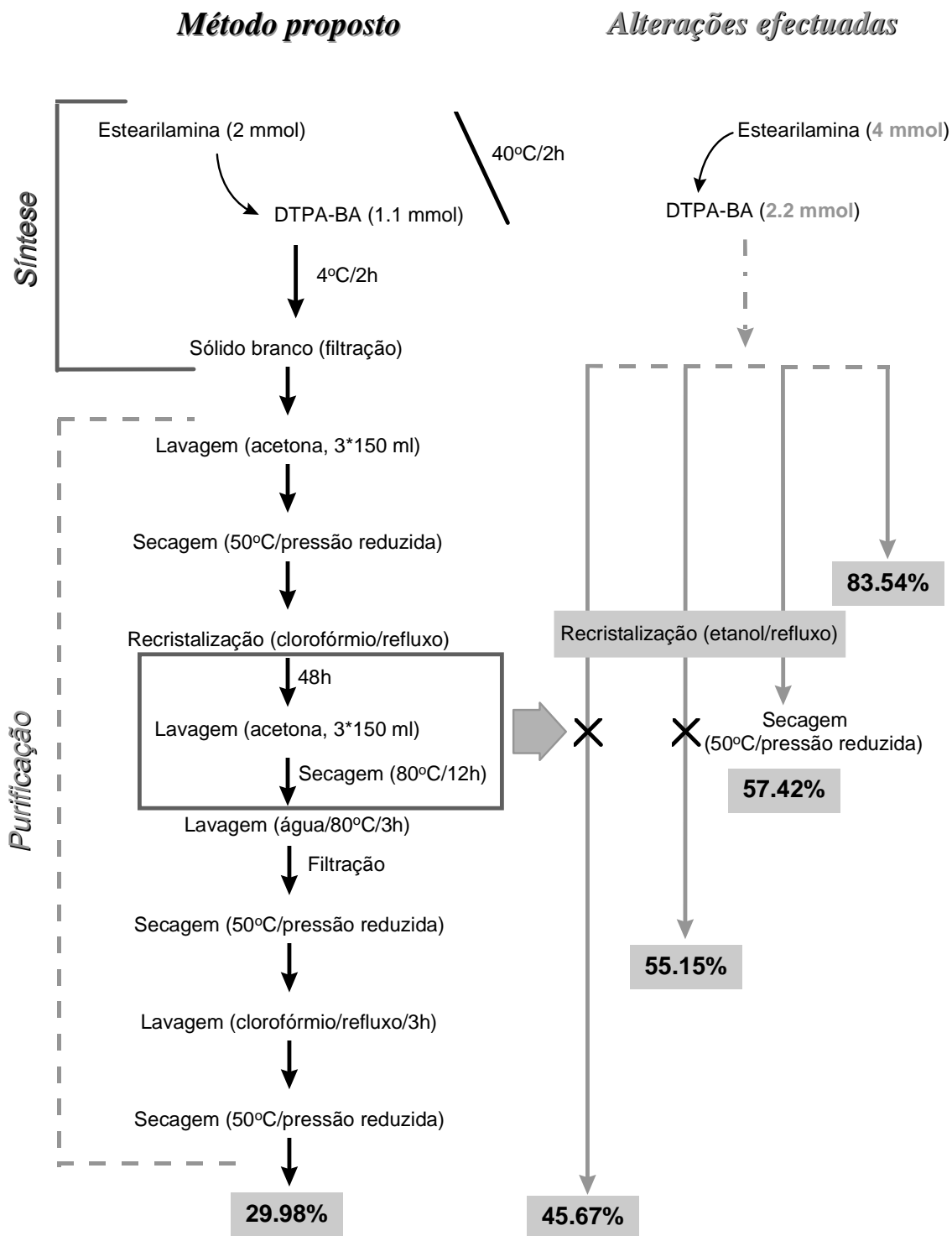


Figura 20. Rendimentos obtidos por alteração do método de síntese e purificação de DTPA-SA₂, proposto por Jasanada e Nepveu (1992).

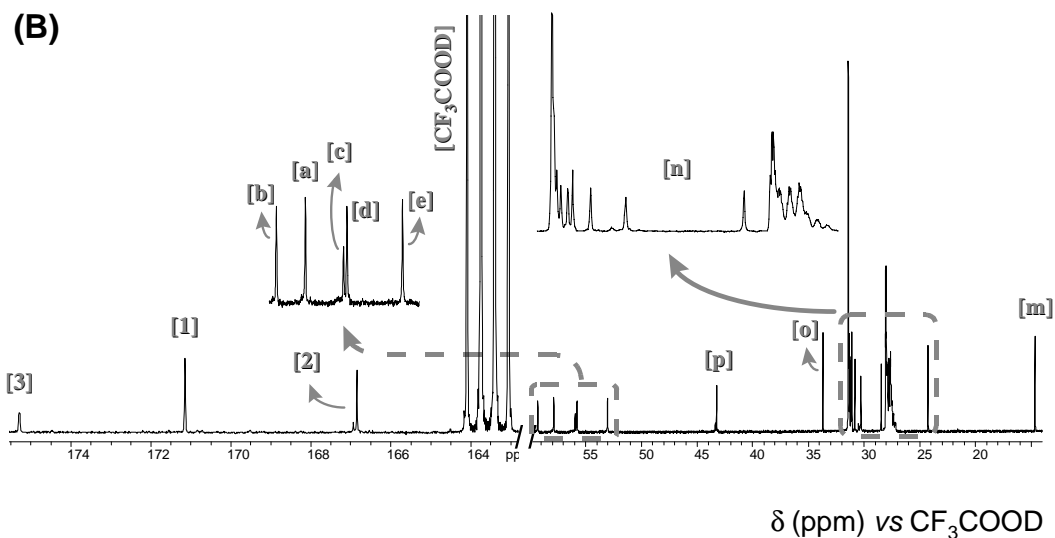
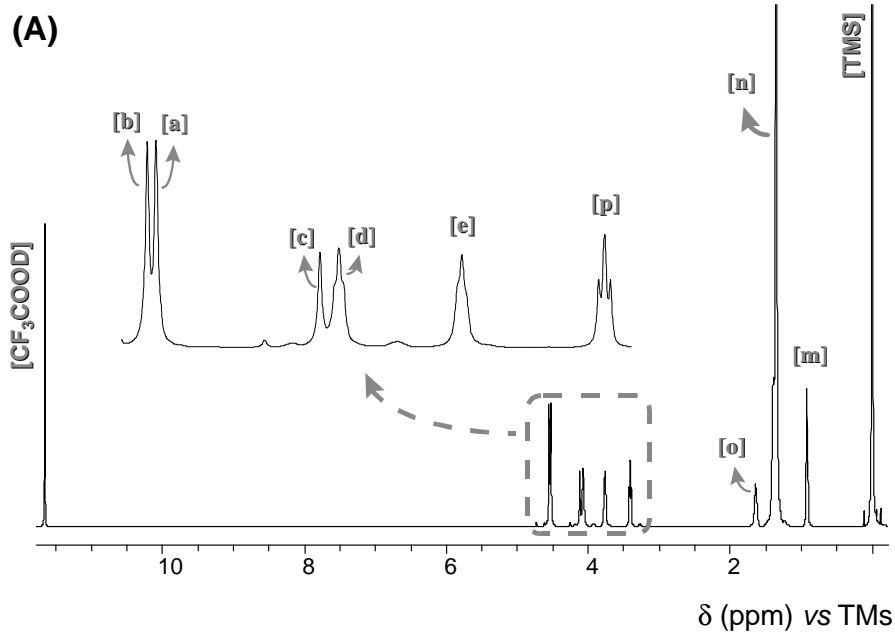
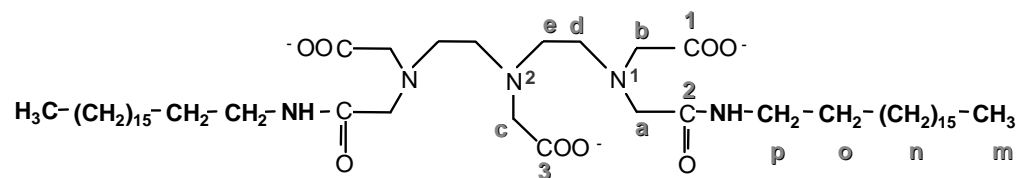


Figura 21. Espectros de RMN (500 MHz) de (A) ^1H e de (B) ^{13}C do DTPA-SA₂ em CF_3COOD . Nos espectros de ^1H as posições dos sinais foram medidas relativamente ao sinal correspondente ao TMS (δ 0.0 ppm) e nos de ^{13}C , relativamente ao sinal correspondente ao CF_3COOD (δ 114.510 ppm). Na figura é também incluída a estrutura do DTPA-SA₂ com o esquema para a identificação dos grupos metilénicos e carbonilos.

2.3.3. Síntese e caracterização dos quelatos *bis*alquilamidas de DTPA com gadolínio

i) Gd-DTPA-bismetilamida (Gd-DTPA-MA₂)

A obtenção deste quelato no estado sólido revestiu-se de alguma fragilidade inerente à dificuldade de cristalização, o que se traduziu por um rendimento de aproximadamente 42%. Após a sua síntese procedeu-se à pesquisa de Gd(III) livre (2.2.3.B), a qual indicou a sua ausência. A análise elementar efectuada confirma o elevado grau de pureza do quelato, concordante com trabalhos já publicados (Geraldés *et al.*, 1995). O teor de água considerado é concordante com o esperado para o hidrato tipo I deste composto (Aukrust *et al.*, 2001).

Análise quantitativa: Teores calculados e obtidos para C₁₆H₂₆N₅O₈Gd·4H₂O (PM 645.72)

	% C	% H	% N	% Gd
Teor calculado	29.761	5.307	10.846	24.353
Teor obtido	29.767	5.081	10.933	24.300
<i>Varição</i>	<i>0.006</i>	<i>0.226</i>	<i>0.087</i>	<i>0.053</i>

ii) Gd-DTPA-bisheptilamida (Gd-DTPA-HPA₂)

A obtenção deste derivado no estado sólido foi facilitada pela sua maior hidrofobicidade relativamente ao quelato *bis*amida, permitindo obter um rendimento semelhante (ca. 70%) ao de outros autores (Geraldés *et al.*, 1995), com ausência de Gd(III) revelada pelo ensaio com Arsenazo III (2.2.3.B). No entanto, o seu carácter higroscópico dificultou a sua obtenção com um menor número de hidratação, conforme já publicado (Geraldés *et al.*, 1995). As variações obtidas no teor de C e H limitaram a utilização deste quelato em estudos posteriores, tendo-se recorrido a um lote puro gentilmente cedido pelo Prof. Doutor Carlos Geraldés (Depto. Bioquímica, FCTUC, Universidade de Coimbra).

Análise quantitativa: Teores calculados e obtidos para $C_{28}H_{50}N_5O_8 \text{ Gd} \cdot 11H_2O$ (PM 940.15)

	% C	% H	% N	% Gd
Teor calculado	35.772	7.719	7.449	16.726
Teor obtido	36.310	6.246	7.452	16.800
Varição	0.538	-1.473	0.002	0.074

iii) Gd-DTPA-bisestearilamida (Gd-DTPA-SA₂)

O carácter duplo, lipófilo e complexante, confere aos ligandos *bis*alquilamidas de cadeia longa características tensoactivas (Jasanada, 1992). Na síntese deste quelato a concentração de ligando ascendeu a 10.6M, valor muito superior à sua concentração micelar crítica, $2.3 \pm 0.3 \times 10^{-4}M$, podendo eventualmente ter constituído uma barreira à livre complexação com Gd(III). Esta hipótese poderá explicar a elevada dificuldade em obter o quelato com teores de Gd(III) satisfatórios, conforme se verificou pelos resultados de análise quantitativa. O rendimento ascendeu a 78.7%.

Análise quantitativa: Teores calculados e obtidos para $C_{50}H_{94}N_5O_8 \text{ Gd} \cdot 3H_2O$ (PM 1104.62)

	% C	% H	% N	% Gd
Teor calculado	54.367	9.124	6.340	14.236
Teor obtido	54.343	9.211	6.413	11.000
Varição	0.025	0.087	0.072	3.236

Como conclusão, as sínteses efectuadas recorreram a uma via geral aplicável à preparação de derivados *bis*amida do DTPA com uma vasta variedade de amins alifáticas de cadeia longa (Geraldés *et al.*, 1995).

Os sinais obtidos por RMN de ^{13}C unidimensional foram atribuídos com certeza razoável com base nos desvios químicos e comparações com resultados publicados para o mesmo tipo de compostos (Geraldés *et al.*, 1995; Kabalka *et al.*, 1991; Jasanada e Nepveu,

1992). Os desvios químicos obtidos por RMN de ^1H , bem como a integração dos respectivos sinais, complementaram os resultados.

Estes estudos mostraram sem qualquer ambiguidade a simetria dos análogos de DTPA com duas funções amida e duas cadeias lipofílicas laterais, com ausência de misturas de derivados mono- e dialquilamida, possíveis na síntese desta família de ligandos (Sherry *et al.*, 1988).

A complexação com Gd(III) permitiu-nos obter os três quelatos necessários à prossecução dos trabalhos, cujo grau de pureza é reflectido nos resultados obtidos por análise quantitativa.

Capítulo 3

Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas coloidais

3.1. Introdução

O desenvolvimento de sistemas coloidais como veículos de meios de contraste para IRM não tem sido alvo, nos últimos anos, de grande desenvolvimento. Os trabalhos publicados incidem fundamentalmente no desenvolvimento de vectores lipossómicos (Gregoriadis e Florence, 1993; Misselwitz e Sachse, 1997), ao que não é alheio o facto dos quelatos mais estudados e com perfis de segurança bem estabelecidos, como é o caso dos quelatos de Gd(III) já utilizados clinicamente, serem predominantemente hidrofílicos (Rocklage e Watson, 1993). Como tal, *à priori*, a sua encapsulação no interior aquoso de lipossomas parece ser a estratégia mais adequada, em detrimento da sua vectorização por sistemas poliméricos nanoparticulares, como os desenvolvidos no âmbito desta tese. Talvez por isso poucos sejam os trabalhos até à data publicados que se enquadrem no desenvolvimento de meios de contraste coloidais poliméricos biodegradáveis, para IRM. Os trabalhos existentes são ainda incipientes e focam áreas como as SLN (Morel *et al.*, 1998) e microsferas de amido (Fahlvik *et al.*, 1990; Fossheim *et al.*, 1999).

No entanto, a elevada sensibilidade das membranas lipossómicas à degradação ambiental, a fuga do meio de contraste através da bicamada fosfolipídica, os problemas de transposição à escala industrial e a débil estabilidade *in vivo* geralmente associada a este tipo de vectores tem limitado o seu desenvolvimento e comercialização (Fielding, 1991; Gabizon, 1995). As nanopartículas parecem constituir uma alternativa interessante (Couvreur *et al.*, 1995). Possuem maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (Knopp *et al.*, 1999; Coffin *et al.*, 1992) e a sua preparação é mais adequada à transposição industrial (Bodmeier *et al.*, 1998; Alléman *et al.*, 1998).

As nanopartículas podem ser preparadas por polimerização de monómeros dispersos ou solubilizados (Gaspar *et al.*, 1991; Couvreur *et al.*, 1992), ou por dispersão de um polímero pré-formado (Bodmeier *et al.*, 1998).

A maioria das nanopartículas formadas por polimerização não é biodegradável. O facto dos seus produtos de degradação nem sempre serem totalmente biocompatíveis e a potencial persistência de resíduos tóxicos como monómeros, oligómeros e catalisadores, constituem limitações de extrema importância, nomeadamente se se pretender a sua administração endovenosa (Couvreur *et al.*, 1996; Maaßen *et al.*, 1993). Além disso, quando a polimerização é induzida por meio de radiação, é provável que ocorram quer reacções cruzadas com o fármaco ou degradação dos componentes das nanopartículas (Alléman *et*

al., 1993). A perda de actividade de peptídeos devido ao processo de polimerização também tem sido referida (Grangier *et al.*, 1991). Além disso, este método é ainda limitado pela própria citotoxicidade dos polímeros resultantes (Müller *et al.*, 1996) e pelos monómeros disponíveis (Bodmeier *et al.*, 1998).

Os polímeros utilizados para preparar nanopartículas podem ser classificados em dois grupos gerais: polímeros sintéticos e compostos de origem natural como proteínas e lípidos. Têm sido propostos diferentes métodos de preparação de nanopartículas com moléculas de origem natural, envolvendo o uso de calor (Couvreur *et al.*, 1995) ou sonicação (Bodmeier *et al.*, 1998), volumes elevados de solventes orgânicos ou óleos e agentes químicos de cross-linking tóxicos (Kreuter, 1991). Para além disso, a incerteza da origem e pureza das macromoléculas bem como a sua antigenicidade potencial restringem o uso deste tipo de nanopartículas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

Considerando as limitações das nanopartículas obtidas com moléculas naturais e por técnicas de polimerização, particularmente se são para administração parentérica, escolhemos utilizar polímeros pré-formados bem definidos e caracterizados (Vert e Garreau, 1991).

Os métodos de preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados apresentam alguma semelhança entre si, nomeadamente ao envolverem a utilização de uma solução orgânica contendo os componentes das nanopartículas e que funciona como fase interna durante a preparação, e uma solução aquosa de estabilizante que constitui o meio de dispersão. A encapsulação de moléculas moderadamente hidrófilas ou muito hidrófilas em nanopartículas preparadas desta forma é considerada pouco eficaz. De facto, até à data e apesar das várias tentativas, as técnicas permanecem apenas eficazes para fármacos lipofílicos (Mauduit e Vert, 1993).

Estes métodos podem ser classificados em quatro categorias:

1. Emulsificação-evaporação

É uma técnica muito utilizada na produção de microsferas biodegradáveis (Wang *et al.*, 1999; Chacón *et al.*, 1996). Neste método, o fármaco e o polímero são dispersos ou solubilizados num solvente orgânico volátil e imiscível em água (ex: cloreto de metileno, clorofórmio, acetato de etilo). Esta solução ou dispersão é posteriormente emulsionada numa fase aquosa externa contendo um estabilizante. A emulsão O/A formada é depois homogeneizada por microfluidização (Venier-Julienne e Benoît, 1996; Niwa *et al.*, 1993) ou

sonicação (Gaspar *et al.*, 1998; Nakada *et al.*, 1998; Blanco e Alonso, 1997). A evaporação subsequente do solvente orgânico permite a obtenção de nanosferas (Zambaux *et al.*, 1999).

As suas principais limitações estão associadas à utilização generalizada de solventes clorados como o clorofórmio e cloreto de metileno, tóxicos mesmo em quantidades residuais, não autorizados para administração parentérica (Jain *et al.*, 1998). O hidrocolóide não biodegradável poli(álcool vinílico) (PVA) é geralmente o estabilizante de escolha (Julienne *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2001). Não é autorizado para administração endovenosa devido à sua elevada toxicidade, sendo por vezes substituído pela albumina (Torchilin e Trubetskoy, 1995). No entanto, a origem e o grau de pureza desta são aspectos que podem ser limitantes, nomeadamente em escala industrial. Além disso, a emulsificação é geralmente conseguida recorrendo à utilização de ultra-sons, com o concomitante perigo de contaminação por Titânio. A utilização de ultra-sons conduz à obtenção de populações polidispersas (Blanco e Alonso, 1997), podendo também induzir reacções químicas ou degradação quer do polímero quer da molécula a encapsular, sendo considerado um método difícil de transpor à escala industrial (Bodmeier e Maincent, 1998).

2. “Salting-out”

As nanopartículas são preparadas pela adição de uma fase aquosa saturada com um electrólito ou não electrólito a uma solução de polímero e fármaco solubilizados num solvente orgânico imiscível em água, sob agitação. A adição posterior de água a esta emulsão O/A conduz à difusão do solvente orgânico para a fase aquosa externa com consequente precipitação do polímero e formação das nanopartículas (Alléman *et al.*, 1993).

Este método de preparação é limitado a agentes de “salting-out” que permitam separação de fases sem precipitação de fármaco e a fármacos solúveis em acetona. Analogamente ao método anterior, recorre à utilização de PVA, exigindo um longo processo de purificação (Kristl, *et al.*, 1996). No entanto, o PVA é extremamente difícil de remover da superfície das nanopartículas (Zambaux *et al.*, 1998).

3. Emulsificação-difusão

A produção de nanopartículas por emulsificação-difusão deriva do método de “salting-out” (Alléman *et al.*, 1998) proposto por Leroux *et al.* (1995) com o objectivo de evitar a utilização de grandes quantidades de sais, com os quais nem todos os fármacos são compatíveis (Berton *et al.*, 1999). Embora seja considerado um método de fácil transposição

à escala industrial, utiliza como hidrocolóides estabilizantes o PVA ou a gelatina, com todos os inconvenientes anteriormente focados. O solvente orgânico geralmente utilizado é o álcool benzílico. Além disso, a produção de nanopartículas por este método exige a eliminação de elevados volumes de água da suspensão, sendo pouco eficaz na encapsulação de moléculas hidrossolúveis devido à sua perda para a fase aquosa durante a emulsificação (Niwa *et al.*, 1994; Leroux *et al.*, 1995). Este método tem sofrido algumas modificações, como demonstra o trabalho publicado por Quintanar-Guerrero (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996, 1997 e 1998a).

4. Deslocação de solvente

Este método foi proposto por Fessi *et al.* (1989) e é caracterizado por evitar o recurso ao calor ou sonicação, sendo facilmente transposto à escala industrial (Niwa *et al.*, 1994). Não utiliza solventes clorados, permitindo produzir facilmente populações de nanopartículas unimodais de PLGA e PCL (Lourenço *et al.*, 1996).

O estabilizante utilizado (poloxamero 188) tem $DL_{50} > 5g/Kg$ (praticamente atóxico) (Sagrado *et al.*, 1994), sendo autorizado para administração endovenosa. Em sua substituição alguns autores utilizam o poloxamero 407, uma vez que este permite aumentar o tempo de residência intravascular das nanopartículas, diminuindo a sua captação pelo MPS (Lenaerts *et al.*, 1995; Dunn *et al.*, 1997). No entanto, o poloxamero 407 é mais tóxico que o poloxamero 188 (Sagrado *et al.*, 1994) e pode sofrer desadsorção da superfície do vector *in vivo*, pelo que a este nível é preferível a utilização de polímeros com ligação covalente a PEG (Neal *et al.*, 1998).

No entanto, a sua utilidade está limitada a solventes hidromiscíveis, nos quais a velocidade de difusão seja suficiente para produzir emulsificação espontânea (Torchilin *et al.*, 1995).

Para a preparação de nanosferas biodegradáveis escolhemos os polímeros PLA, PLGA e PCL. Estes polímeros fazem parte da classe de poliésteres α -hidroxilados e têm demonstrado boa histocompatibilidade e biodegradabilidade (Brophy *et al.*, 1990; Göpferich, 1996), sendo autorizados para administração parentérica. Os poli(α -hidroxiácidos) são assimilados após degradação ou eliminados sob forma de CO_2 e H_2O (Vert *et al.*, 1991; Jain *et al.*, 1998). Os seus produtos de degradação são os ácidos láctico e glicólico que se encontram entre os metabolitos intermediários naturais do organismo (Alléman *et al.*, 1998). Além disso, a segurança destes polímeros para uso humano tem sido extensamente

documentada durante os últimos anos (Brannon-Peppas, 1995; Merkli *et al.*, 1995; Uhrich *et al.*, 1999).

A acetona é facilmente removida por evaporação a pressão reduzida (Niwa *et al.*, 1994) à temperatura ambiente, evitando a utilização de temperaturas elevadas, as quais podem provocar um retardamento na velocidade de libertação do fármaco (Omelczuk e McGinity, 1993).

O objectivo principal deste trabalho foi, pois, **testar a hipótese de que a encapsulação de quelatos de Gd(III) em nanopartículas poliméricas coloidais aumentaria a relaxividade do quelato encapsulado**, sugerindo a possibilidade deste tipo de formulações poder ser utilizado no desenvolvimento de meios de contraste vectorizados para populações celulares específicas.

Para testar esta hipótese, recorreu-se principalmente aos poli (α -hidroxiácidos) PLA e PLGA, dois polímeros biodegradáveis constituídos por polimerização de unidades monoméricas de ácido láctico (PLA) ou copolimerização deste com monómeros de ácido glicólico (PLGA) (Blanco e Alonso, 1997) (figura 22). Os poliésteres resultantes são, até à data, os únicos polímeros autorizados para administração endovenosa (Jain *et al.*, 1998). Foram ainda realizados alguns estudos com o polímero poli (ϵ -caprolactona) (figura 22).

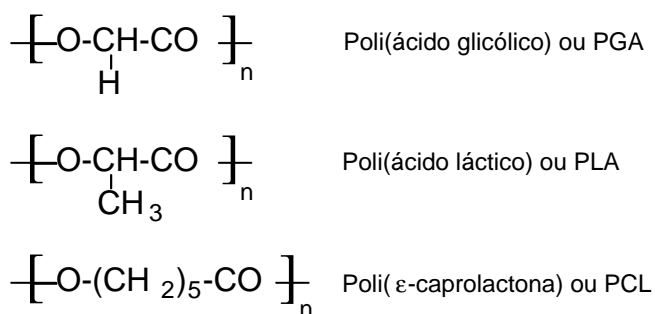


Figura 22. Estrutura monomérica dos polímeros de ácido láctico, dos seus copolímeros com ácido glicólico e da poli (caprolactona). Adaptado de Blanco e Alonso, 1997.

Neste contexto e dada a escassa bibliografia disponível, foi necessário proceder a estudos preliminares com vários homo – e co-polímeros de poli (ácido láctico) com poli (ácido glicólico), recorrendo à variação de alguns parâmetros tecnológicos, no sentido de avaliar qual ou quais, os conjuntos de condições tecnológicas mais adequadas à

encapsulação dos quelatos disponíveis. Os quelatos de Gd(III) utilizados incluíram três Gd(DTPA-*bis*alquilamidas) sintetizadas no âmbito deste trabalho (Capítulo 2) e duas outras gentilmente cedidas pelo Prof. Doutor Carlos Geraldês (figura 23, D e E).

Os três quelatos sintetizados são *bis*alquilamidas de DTPA com cadeias laterais alquílicas saturadas, de hidrofobicidade crescente (figura 23, A, B e C). Sabe-se que a encapsulação em nanopartículas de poliésteres e, principalmente, pelo método de deslocação de solvente, é mais adequada a moléculas marcadamente hidrófobas (Legrand *et al.*, 1999; Leroux *et al.*, 1995; Govender *et al.*, 1999). Como tal, aumentando a hidrofobicidade do quelato de Gd(III) mais utilizado clinicamente, a Gd(DTPA-*bis*metilamida), por aumento das suas cadeias hidrocarbonadas laterais, aumentar-se-ia a probabilidade de uma encapsulação bem sucedida. Neste contexto, para além deste quelato (figura 23, A), foram efectuados estudos com Gd(DTPA-*bis*heptilamida) (figura 23, B) e Gd(DTPA-*bis*estearilamida) (figura 23, C). Os quelatos Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) (figura 23, D) e Gd(DTPA-*bis*metoxietilamida) (figura 23, E), embora hidrofílicos, apresentam grupos funcionais nas suas cadeias laterais, passíveis de estabelecer interacções moleculares com as cadeias poliméricas, razão principal da sua utilização neste trabalho.

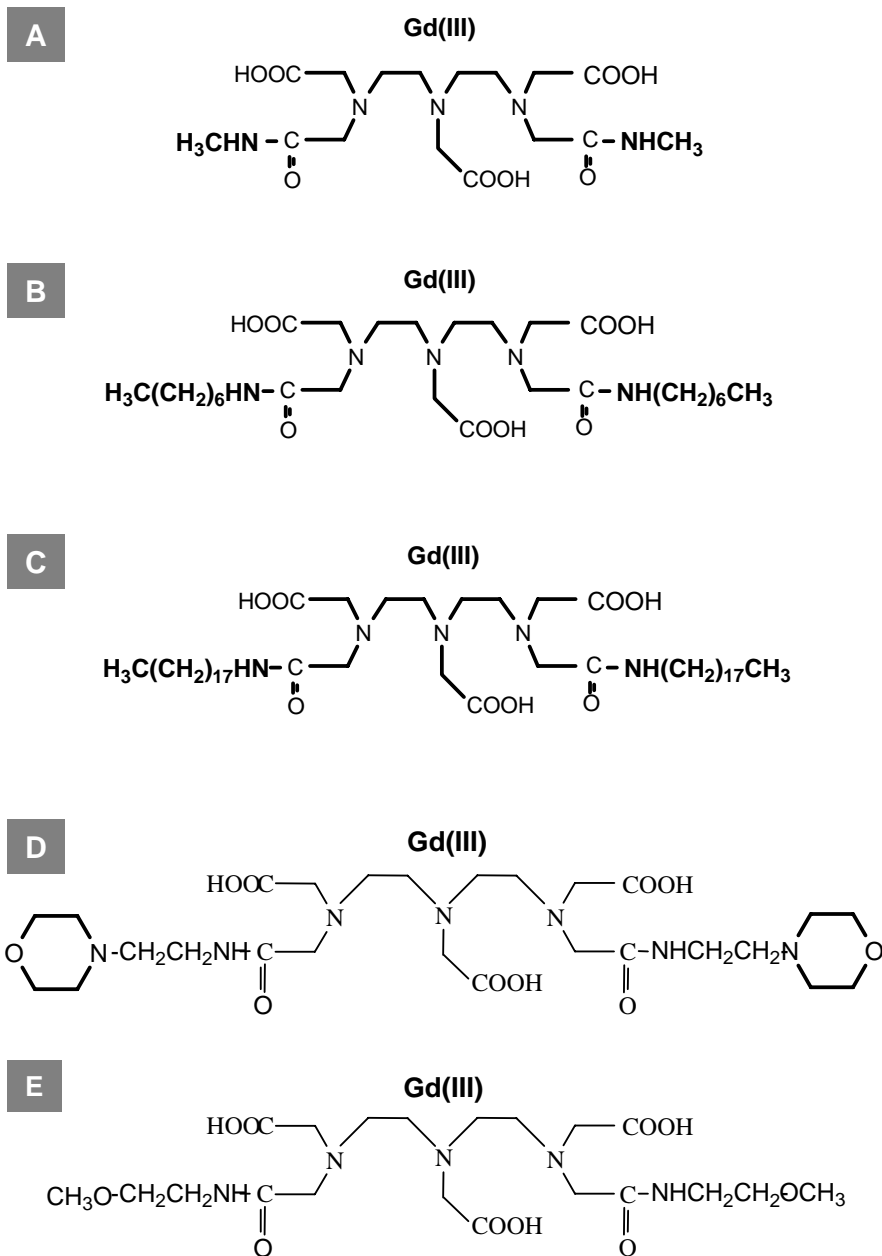


Figura 23. Quelatos de Gd(III) utilizados nos estudos de encapsulação de *bis*alquilamidas de DTPA em nanopartículas poliméricas de PLGA. A, Gd(DTPA-*bis*metilamida); B, Gd(DTPA-*bis*heptilamida); C, Gd(DTPA-*bis*estearilamida); D, Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida); E, Gd(DTPA-*bis*metoxietilamida).

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Materiais

Os poli (D,L-ácido láctico) (PLA) R 202H (PM 11 kDa) e R 203 (PM 29,6 kDa) e os poli(D,L-ácido láctico-*co*-glicólico) (PLGA) RG 502H (50/50, PM 6 kDa), RG 503H (50/50, PM 32,4 kDa), RG 503 (50/50, PM 39 kDa) e RG 755 (75/25, PM 63,6 kDa) foram adquiridos na Boehringer (Boehringer Ingelheim, Alemanha). O poli(ácido láctico) (PM 90 kDa), o poli(ácido láctico-*co*-glicólico) (PM 50-75 kDa), a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (PM 128 kDa) e a acetona foram adquiridos na Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). O poloxamero 188 (Synperonic F68) foi obtido na ICI (ICI, França). O lípido 1,2-dioleoil-3-propanoato de trimetilamônio (DOTAP), solubilizado em clorofórmio, foi adquirido à Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA). A água utilizada era de grau ultrapuro (Elgastat R).

3.2.2. Metodologias Gerais

3.2.2.1. *Preparação das nanopartículas pelo método inicial*

As nanopartículas foram preparadas por deslocação de solvente (Fessi *et al.*, 1999), conforme esquematizado na figura 24.

Resumidamente, adicionou-se à solução acetónica de polímero uma solução alcoólica (etanol, etanol/água ou metanol) de quelato de Gd(III) a 1% (p/p). A solução resultante foi imediatamente homogeneizada por vórtex, sendo seguidamente vertida sobre uma solução aquosa de poloxamero 188 (0,25%, p/v), sob agitação magnética moderada. Após evaporação da fase orgânica a 40°C sob pressão reduzida, as suspensões de nanopartículas foram filtradas e o volume foi aferido a 10 ml com água ultrapura.

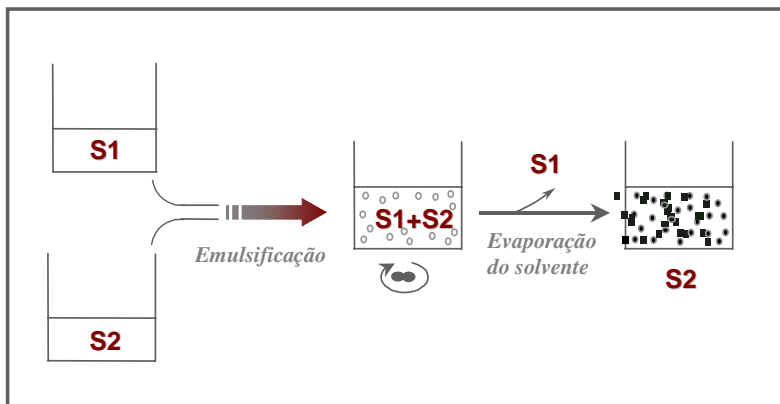


Figura 24. Método geral de preparação de nanopartículas por deslocamento de solvente. S1, fase orgânica (solução acetônica de polímero com solução alcoólica de quelato); S2, fase aquosa (poloxamero 188 a 0,25%, p/v).

3.2.2.2. Liofilização das nanopartículas

As nanopartículas foram congeladas a -40°C e liofilizadas durante 48h (Labconco FreeZone®, Labconco Co., EUA) à mesma temperatura. A liofilização secundária foi efectuada a $4^{\circ}\text{C}/4\text{h}$ após rampa de $0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.2.2.3. Caracterização físico-química

A caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulares incidiu sobre a avaliação da sua distribuição granulométrica e carga de superfície, através dos parâmetros dimensão média (Z , nm) e índice de polidispersão, e potencial zeta (mV), respectivamente. Foram também avaliados os parâmetros eficácia de encapsulação (%), teor de quelato (%) e recuperação de quelato na suspensão final de nanopartículas (%).

i) Avaliação da distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica foi avaliada por Espectroscopia de Correlação Fotónica (PCS) (AutoSizer® 2c, Malvern Instruments, Inglaterra e Coulter® N4 Plus, Coulter Instruments, EUA) com um ângulo incidente de 90° proveniente de um laser de He de 633,0 nm. As análises foram realizadas a $20,0^{\circ}\text{C}$ sobre amostras diluídas de acordo com as exigências dos aparelhos. Cada amostra foi analisada em triplicado.

ii) Avaliação da carga de superfície

A carga de superfície das nanopartículas em suspensão foi avaliada por Análise Doppler da Luz Dispersada por partículas sujeitas a Electroforese (DELSA), determinando-

se a mobilidade electroforética e, como consequência, o potencial zeta (Coulter® DELSA 440, Coulter Instruments, FL, EUA).

As análises foram efectuadas em triplicado sobre suspensões diluídas entre 5 e 10 % (p/v), submetidas a 5, 10 e 15V. Todos os ensaios foram realizados a $25\pm 0,2^\circ\text{C}$. Os ensaios foram efectuados de acordo com as condições optimizadas para este tipo de formulação (Lourenço *et al.*, 1996).

iii) Avaliação da eficácia de encapsulação e teor de quelato

A eficácia de encapsulação e o teor de quelato foram calculados de acordo com as equações [3-1] e [3-2], respectivamente:

$$\text{Eficácia de Encapsulação (\%)} = \frac{\text{quantidade (mg) de quelato encapsulado}}{\text{quantidade (mg) de quelato adicionado ao sistema}} \times 100 \quad [3-1]$$

$$\text{Teor de quelato (\%)} = \frac{\text{massa (mg) de quelato encapsulado}}{\text{massa total (mg) de nanopartículas}} \times 100 \quad [3-2]$$

A quantidade de quelato encapsulado foi avaliada por ICP-AES (Cap. II, 2.2.3. C1) em nanopartículas liofilizadas após a remoção do quelato livre por dupla ultracentrifugação ($146000 \times g/4^\circ\text{C}/1\text{h}$).

iv) Avaliação da recuperação de quelato na suspensão final de nanopartículas

Para avaliar a rentabilidade do método de produção determinou-se a recuperação de quelato na suspensão final de nanopartículas. A massa de quelato de Gd(III) presente na suspensão de nanopartículas no final da preparação foi determinada por ICP-AES (Cap. 2, 2.2.3. C1). Os resultados são expressos em percentagem de massa de acordo com a equação [3-3]:

$$\text{Recuperação de quelato (\%)} = \frac{\text{massa total (mg) de quelato presente na suspensão final}}{\text{massa total (mg) de quelato adicionado ao sistema}} \times 100 \quad [3-3]$$

3.2.3. Metodologias específicas

A. Ensaio preliminares

No intuito de avaliar qual a estratégia de produção mais adequada à encapsulação de Gd(DTPA-*bis*alquilamidas) em nanosferas de PLGA por deslocação de solvente, avaliaram-se os polímeros PLA 203, PLA 202H e PLGA 502H, recorrendo a três razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa, de acordo com a tabela 9.

Tabela 9. Condições tecnológicas utilizadas na produção de nanosferas de PLA (203 e 202H) e PLGA 502H

Polímero ^(a)	Razão fase orgânica/fase aquosa: (v/v)	Condição
PLA 203	0,33	C
PLA 203	0,60	A
PLA 203	1,00	D
PLA 202H	0,60	B
PLGA 502H	0,33	E

^(a) 10 mg/ml na fase orgânica

Cada uma destas condições foi aplicada a cinco quelatos, quer com cadeia alquílica simples [Gd(DTPA-*bis*metilamida), Gd(DTPA-*bis*heptilamida) e Gd(DTPA-*bis*sestearilamida)] quer com funcionalidades químicas adicionais [Gd(DTPA-*bis*metoxietilamida) e Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida)].

As nanopartículas obtidas foram submetidas a caracterização físico-química em termos de eficácia de encapsulação, teor e recuperação de quelato, carga de superfície e distribuição granulométrica (dimensão média e índice de polidispersão). O número de lotes submetidos a caracterização granulométrica encontra-se disposto na tabela 10. Os restantes parâmetros de caracterização físico-química (eficácia de encapsulação, teor e recuperação de quelato e carga de superfície) foram avaliados uma só vez. A encapsulação de Gd(DTPA-*bis*sestearilamida) só foi avaliada pelos métodos D e E. Em todas as situações, todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

Tabela 10. Número de lotes sujeitos a caracterização granulométrica; ND, não determinado.

Quelato	Condição				
	A	B	C	D	E
Gd(DTPA- <i>bis</i> metilamida)	2	2	2	2	1
Gd(DTPA- <i>bis</i> heptilamida)	3	2	2	2	1
Gd(DTPA- <i>bis</i> estearilamida)	ND	ND	ND	ND	3
Gd(DTPA- <i>bis</i> metoxietilamida)	2	2	2	2	1
Gd(DTPA- <i>bis</i> morfolinoetilamida)	3	3	3	3	3

B. Ensaio de optimização da eficácia de encapsulação

B.I. Gd(DTPA-*bis*estearilamida)

Face aos resultados obtidos nos ensaios preliminares ao nível da eficácia de encapsulação deste quelato em nanopartículas de PLA e PLGA, os estudos foram continuados recorrendo a duas estratégias distintas: o aumento do peso molecular do polímero e a diminuição da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa.

B.I.1. Aumento do peso molecular do polímero

Prepararam-se nanopartículas com 10 mg/ml de PLA 90 (PM 90000) na fase orgânica numa razão volumétrica de 0,33 entre esta e a fase aquosa. Os resultados foram comparados com os obtidos nos ensaios preliminares com nanopartículas de PLA 203 (PM 29600), nas mesmas condições. O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p).

B.I.2. Diminuição da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa

As nanopartículas de PLGA 502H foram preparadas com 10 mg de polímero/ml de fase orgânica, numa razão volumétrica de 0.17 entre esta e a fase aquosa. O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p). Os resultados foram comparados com os obtidos nos ensaios preliminares após produção de nanopartículas com uma razão volumétrica de 0.33, nas mesmas condições.

Após a preparação das nanopartículas com 1% (p/p) de Gd(DTPA-SA₂), procedeu-se à caracterização físico-química dos lotes nos quais se obtiveram resultados mais promissores, nomeadamente em termos de eficácia de encapsulação, teor e recuperação de quelato,

carga de superfície, dimensão média e índice de polidispersão. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

B.II. Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida)

Com o objectivo de otimizar a encapsulação de quelato, foram avaliados dois tipos diferentes de preparação da fase orgânica, diferindo principalmente no estado físico do polímero aquando da adição da solução de quelato e designados por método inicial e método inicial modificado.

As nanopartículas foram preparadas e caracterizadas conforme descrito (3.2.2.). Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

B.II.A. Produção de nanosferas pelo método inicial

O método inicial, assim designado por meras questões de sistematização, refere-se ao método geral de preparação de nanosferas por deslocação de solvente, no qual a solução etanólica com 1% (p/p) de quelato foi adicionada ao polímero previamente solubilizado em acetona. Este método encontra-se descrito em Material e Métodos (3.2.2.).

Recorrendo a este método, avaliou-se a influência de diversos parâmetros tecnológicos na encapsulação de quelato em nanosferas de PLA, PLGA e PCL, no intuito de aumentar a eficácia do processo, obtendo simultaneamente populações monodispersas e com distribuição granulométrica unimodal. Neste contexto, foi estudada a influência do peso molecular e do tipo de polímero e também da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa.

B.II.A.1. Influência do peso molecular do polímero

Prepararam-se nanopartículas de PLA e PLGA, de pesos moleculares crescentes, nas mesmas condições, recorrendo as duas razões distintas de razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa (tabela 11). O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p) e a concentração de polímero de 10 mg/ml.

Tabela 11. Pesos moleculares dos polímeros utilizados na otimização da eficácia de encapsulação de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*). A razão volumétrica entre as fases encontra-se assinalada (+) para cada polímero utilizado. Todos os lotes foram produzidos com 10 mg/ml de polímero na fase orgânica. O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p).

Polímero	Peso Molecular	<i>Razão f. orgânica/f. aquosa (v/v)</i>	
		0,17	0,25
PLA 202H	11000	+	+
PLA 203	29600	+	+
PLA 90	90000	+	+
PLGA 502H	6000	+	+
PLGA 503H	32400	NE	+
PLGA 755	63000	+	NE
PLGA 50-75	50-75000	+	+

NE, não efectuado.

B.II.A.2. Influência do tipo de polímero

Foram preparadas nanopartículas com vários homopolímeros do poli(ácido láctico) (PLA) e diversos copolímeros com ácido glicólico (PLGA), recorrendo sempre a 10 mg/ml de polímero na fase orgânica (tabela 12). O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p). Os polímeros de maior peso molecular de cada categoria foram comparados com poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

Tabela 12. Tipos de polímeros utilizados na otimização da eficácia de encapsulação de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) e respectivos pesos moleculares. As variáveis de produção encontram-se assinaladas (+). O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p).

Polímero	Peso Molecular	<i>Razão f. orgânica/f. aquosa (v/v)</i>	
		0,17	0,25
PLA 202H	11000	+	+
PLGA 502H	6000	+	+
PLA 203	29600	+	+
PLGA 503H	32400	NE	+
PCL	128 000	+	+
PLA 90	90000	+	+
PLGA 50-75	50-75000	+	+

NE, não efectuado.

B.II.A.3. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa

Este parâmetro foi avaliado recorrendo a oito polímeros distintos (tabela 13).

Tabela 13. Razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa, utilizadas na optimização da eficácia de encapsulação de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida). Os polímeros utilizados em cada caso encontram-se assinalados (+). NE, não efectuado.

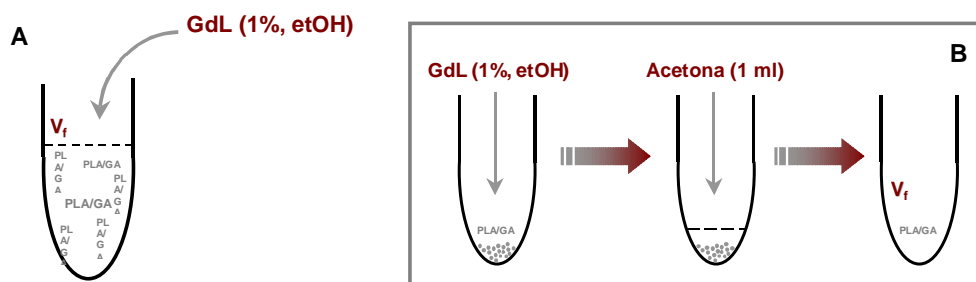
Razão O/A	PLA			PCL		PLGA		
	202H	203	90		502H	503H	50-75	755
0,17	+	+	+	+	+	NE	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+	+	NE
0,33	NE	+	NE	NE	+	+	NE	NE
0,6	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE
1,00	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE

A produção de nanopartículas foi submetida a razões volumétricas entre ambas as fases de 0,17 a 1,00. A concentração de polímero na fase orgânica foi, invariavelmente, de 10 mg/ml e o teor de quelato adicionado de 1% (p/p).

B.II.B. Produção de nanosferas por modificação do método inicial

As nanopartículas foram preparadas pelo método de deslocação de solvente, com uma pequena alteração na preparação da fase orgânica. A solução etanólica de quelato (1%, p/p) foi adicionada ao polímero seco (figura 25). Após adição de 1 ml de acetona, a solução orgânica foi homogeneizada por vórtex e o volume foi perfeito a 5 ml com acetona. As nanopartículas foram preparadas conforme descrito anteriormente (3.2.2.).

Figura 25. Alteração efectuada na preparação da fase orgânica utilizada na produção de nanopartículas por deslocação de solvente. No método inicial (A) o quelato (1%, p/p) foi adicionado ao polímero previamente solubilizado em acetona e no método modificado (B), a adição foi feita ao polímero no estado seco. Seguidamente adicionou-se 1 ml de acetona e, após dissolução total do polímero, homogeneizou-se a fase orgânica e perpez-se o volume com acetona.



B.II.B.1. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa

Foram preparadas nanopartículas de PLGA 502H numa concentração de 10 mg/ml de fase orgânica, em razões volumétricas de 0,17 a 0,33 entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p).

B.II.B.2. Influência da concentração de polímero na fase orgânica

Prepararam-se nanopartículas de PLGA 502H cujas concentrações na fase orgânica foram de 10 mg/ml e 15 mg/ml. A razão de volumes entre as fases foi de 0,17. O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p).

B.II.B.3. Influência da utilização conjunta de polímeros de peso molecular díspar

Este parâmetro foi avaliado com nanopartículas preparadas com 25 mg de PLGA 502H (PM 6000), adicionado de igual massa de PLGA 755 (PM 63600) ou PLGA 50-75 (PM 50-75000), numa concentração final de 10 mg de polímero/ml de solução orgânica. O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p). A razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa foi de 0,17.

B.II.B.4. Influência da adição do lípido DOTAP à fase orgânica

Na preparação de nanopartículas com PLGA 502H foi adicionado 1% (p/p) de DOTAP em etanol à fase orgânica já contendo 10 mg de polímero/ml. O teor de quelato adicionado foi de 1% (p/p). A razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa foi de 0,17.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Ensaio preliminares

Ao proceder aos ensaios preliminares pretendia-se avaliar qual, ou quais, as variáveis de produção mais adequadas a uma encapsulação eficaz deste tipo de quelatos em nanosferas²⁰ de PLA e PLGA, permitindo simultaneamente obter populações de distribuição granulométrica unimodal, passíveis de utilização como meio de diagnóstico.

Como se observa na figura 26, a distribuição granulométrica obtida com as condições utilizadas parece não depender significativamente do quelato encapsulado, verificando-se, de um modo geral, a obtenção de populações unimodais com índices de polidispersão inferiores a 0,1, o que é comum na preparação de nanosferas de PLGA pelo método de deslocação de solvente (Fessi *et al.*, 1989). O diâmetro médio foi, em geral, inferior a 200 nm. Este aspecto é de extrema importância ao nível do tipo de vectorização que se pretenda alcançar, uma vez que é geralmente aceite ser necessário um intervalo entre 70 nm a 200 nm para sistemas coloidais vectorizados (Davis *et al.*, 1993; Stolnik *et al.*, 1995). É sabido que o diâmetro médio e a distribuição granulométrica dos vectores coloidais influenciam significativamente o seu perfil de biodistribuição (Allen *et al.*, 1995; Chouly *et al.*, 1996; Fossheim *et al.*, 1997). De facto, as nanopartículas com diâmetro inferior a 70 nm são rapidamente removidas da circulação ao extravasarem (Seijo *et al.*, 1990; Gref *et al.*, 1995), enquanto que as de diâmetro superior a 200 nm são sujeitas a mecanismos inespecíficos de filtração esplénica (Davis *et al.*, 1993; Alléman *et al.*, 1998).

A produção de nanopartículas com PLA 203 pela condição C constituiu, a este nível, a única excepção na encapsulação da maioria dos quelatos. No entanto, a utilização desta condição de produção na encapsulação de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) permitiu obter populações de nanopartículas caracterizadas por diâmetros médios da ordem dos 200 nm e distribuição granulométrica estreita (IP<0,05).

Os resultados obtidos com a utilização de PLA 203 na encapsulação dos vários quelatos indicia uma influência da razão volumétrica (r) entre as duas fases. O aumento desta razão permitiu reduzir o diâmetro médio das nanopartículas obtidas, independentemente do quelato em questão. Os valores mais elevados foram obtidos com as

²⁰ A produção de nanopartículas por deslocação de solvente permite obter nanosferas e nanocápsulas. No entanto, estas só são obtidas na com adição à fase orgânica de um óleo imiscível em água (Fessi *et al.*, 1989).

condições C ($r=0,33$), decrescendo com as condições A ($r=0,60$), sendo os mais reduzidos os referentes à preparação de nanopartículas com uma razão volumétrica de 1,00 (condição D).

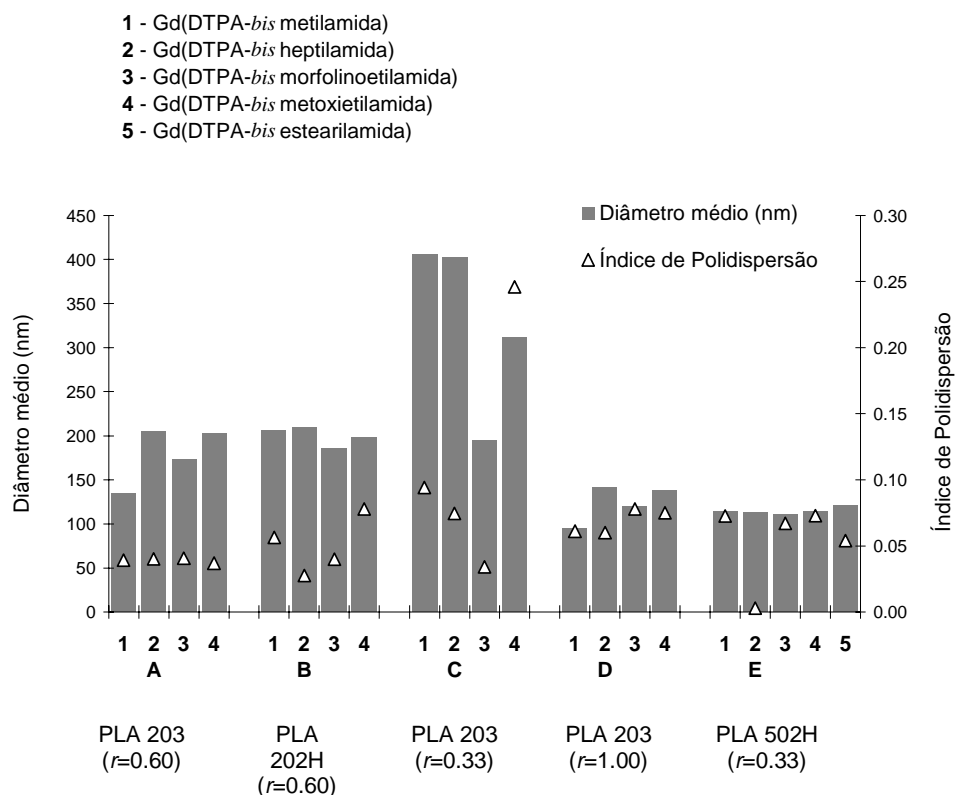


Figura 26. Influência das condições de produção nas características granulométricas de nanopartículas de PLGA (10 mg/ml) com Gd(DTPA-*bis*metilamida) (1), Gd(DTPA-*bis*heptilamida) (2), Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) (3), Gd(DTPA-*bis*metoxietilamida) (4) e Gd(DTPA-*bis*estearilamida) (5), recorrendo às condições de produção A, PLA 203 ($r=0,60$); B, PLA 202H ($r=0,60$); C, PLA 203 ($r=0,33$); D, PLA 203 ($r=1,00$) e E, PLGA 502H ($r=0,33$). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p); ($n=1-3$).

O tipo de PLA parece não influir significativamente na distribuição granulométrica obtida, pelo que os resultados obtidos com os poli(ácido láctico) 203 ($r=0,60$) (condição A) e 202H (condição B) foram muito semelhantes. Contudo, foi com o copolímero PLGA que se obtiveram populações de menor diâmetro médio, o que poderá estar relacionado com o seu menor peso molecular (6000) e com a sua estrutura monomérica (Gref *et al.*, 1995).

Para além das características granulométricas, também as propriedades de superfície de nanopartículas coloidais influenciam o seu perfil de biodistribuição (Stolnik *et al.*, 1995; Nakada *et al.*, 1998; Müller e Wallis, 1993; Espuelas *et al.*, 1998).

De entre essas propriedades, são a carga e a composição da superfície do vector que determinam a sua interacção com o meio biológico, nomeadamente com as proteínas

plasmáticas e sistema complemento, regulando a sua depuração da circulação sistémica (Papisov, 1995) Essa depuração, resultante da opsonização e captação subsequente por parte do MPS, é geralmente considerada mais eficaz nos casos de cargas de superfície negativas relativamente a cargas positivas ou neutras, não obstante a obtenção de resultados contraditórios (Stolnik, 1995). As superfícies neutras parecem ser as mais adequadas à obtenção de semi-vida plasmática longa (Chouly *et al.*, 1996). Labhasetwar *et al.* (1998) demonstraram que a presença de uma forte carga positiva à superfície de nanopartículas de PLGA aumenta consideravelmente a sua captação arterial, potenciando a cedência de fármacos para o tratamento da restenose arterial.

No entanto, a própria composição química do vector polimérico poderá estar na origem dos resultados díspares obtidos pelos diversos autores. A presença na superfície do vector de grupos funcionais nucleófilos²¹ conduz à activação do sistema complemento, resultando na adsorção dos seus componentes a essa superfície, com a consequente depuração da circulação sistémica (Papisov, 1995) mesmo no caso de superfícies muito hidrófilas (Alléman, 1993).

A carga de superfície das várias populações obtidas só foi avaliada em alguns lotes (tabela 14). A forte carga negativa observada em todos os lotes analisados é uma característica comum em sistemas poliméricos nanoparticulares de poliésteres (Berton *et al.*, 1999). Independentemente do tipo de poliéster utilizado, *i.e.*, PLA ou PLGA, o potencial zeta obtido foi geralmente muito negativo, o que advém principalmente da presença de grupos carboxilato terminais nos polímeros (PLA 202H e PLGA 502H), presentes à superfície das nanopartículas (Blanco e Alonso, 1997). No caso de nanopartículas preparadas com PLA 203, em que esses grupos se encontram esterificados²², a forte carga negativa poderá estar associada com a presença de grupos carbonilo das funções éster expostos na superfície do vector coloidal.

Contudo, a composição química do polímero poderá não ser o único factor determinante da carga de superfície do vector. A carga de superfície pode também ser condicionada pela forma como cada quelato está associado a cada um dos polímeros, nomeadamente se estiver adsorvido à superfície das nanopartículas (Barrat, 1999). Neste contexto, facilmente se entendem as diferenças obtidas com cada um dos quelatos, quando

²¹ A presença de grupos amina à superfície do vector conduz à adsorção do fragmento C4 enquanto que a presença de grupos álcool constitui um alvo para o fragmento C3b (Papisov, 1995).

²² A esterificação do polímero depende do iniciador da polimerização. A utilização de octanoato de Sn como iniciador conduz à obtenção de PLA ou PLGA com grupos álcool terminais esterificados por resíduos de ácido octanóico (Gaspar *et al.*, 1998).

encapsulados em polímeros diferentes, bem como quando preparados com o mesmo polímero e pelo mesma razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa. Embora a carga de superfície das nanosferas apenas tenha sido determinada em alguns casos, a carga negativa generalizada permite antever uma rápida eliminação sistêmica destes sistemas quando administrados parenteralmente.

Tabela 14. Influência das condições de produção nas características de superfície de nanopartículas de PLGA (10 mg/ml) com Gd(DTPA-*bis*metilamida), Gd(DTPA-*bis*heptilamida), Gd(DTPA-*bis*estearilamida), Gd(DTPA-*bis*metoxietilamida) e Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida), recorrendo às condições A, PLA 203 ($r=0,60$); B, PLA 202H ($r=0,60$); C, PLA 203 ($r=0,33$); D, PLA 203 ($r=1,00$) e E, PLGA 502H ($r=0,33$). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p); ($n=1$).

Condição	Quelato de Gd(III) ^a				
	GdMA ₂	GdHPA ₂	GdSA ₂	GdMPEA ₂	GdMEA ₂
Potencial Zeta (mV)					
A	-55,9	-45,8	Nd ^b	-49,5	-54,5
B	Nd	-54,3	Nd	-45,8	Nd
C	-36,5	-43,0	Nd	-56,5	Nd
D	-48,6	-21,1	Nd	-45,8	Nd
E	Nd	Nd	-18,4	Nd	Nd

^aGdMA₂, Gd(DTPA-*bis*metilamida); GdHPA₂, Gd(DTPA-*bis*heptilamida); GdSA₂, Gd(DTPA-*bis*estearilamida); GdMPEA₂, Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida); GdMEA₂, Gd(DTPA-*bis*metoxietilamida); ^bNd, não determinado.

Tal como se observa na figura 27, a eficácia dos poliésteres utilizados para encapsular este tipo de quelatos é variável. Essa eficácia dependeu não só do tipo de polímero e do quelato em causa, como também das variáveis de produção utilizadas. A eficácia de encapsulação dos quelatos de cadeia alquílica simples - GdMA₂, GdHPA₂ e GdSA₂ – embora não tenha permitido obter os resultados mais satisfatórios, mostrou um comportamento previsível.

A produção de nanopartículas com PLA e PLGA pelo método de deslocação de solvente é mais adequada à encapsulação de moléculas fortemente hidrófobas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Como tal, a crescente hidrofobicidade dos quelatos Gd(DTPA-*bis*heptilamida)²³ e Gd(DTPA-*bis*estearilamida)²⁴ relativamente ao quelato Gd(DTPA-*bis*metilamida)²⁵, resultante do aumento das suas cadeias laterais saturadas, antevia um aumento concomitante da eficácia de encapsulação.

²³ Quelato de cadeia lateral R, R=-(CH₂)₆CH₃.

²⁴ Quelato de cadeia lateral R, R=-(CH₂)₁₇CH₃.

²⁵ Quelato de cadeia lateral R, R=-CH₃.

Embora a encapsulação do derivado estearilamida pela condição D (PLA 203, $r=1,00$) tenha sido praticamente nula (E.E.=0,02%), os resultados obtidos com a condição E (PLGA 502H, $r=0,33$) foram significativamente superiores aos obtidos com os derivados metil- e heptilamida (figura 27).

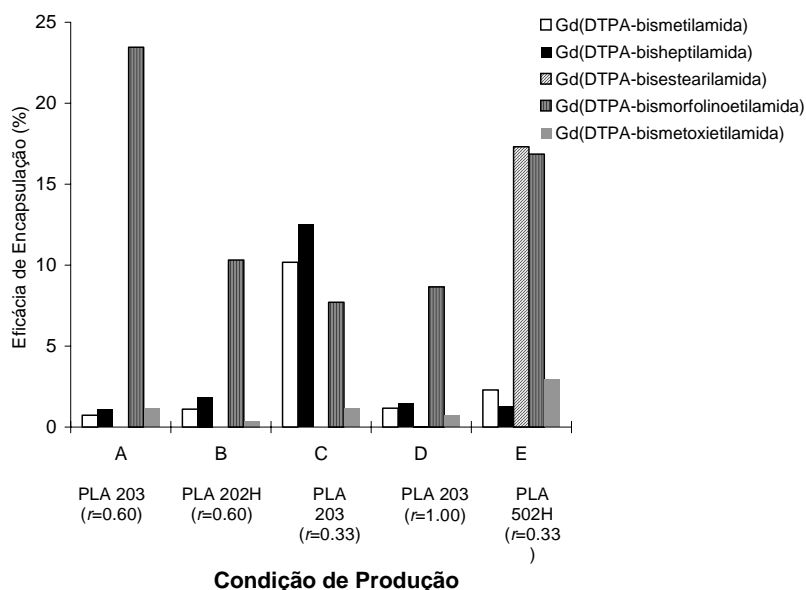


Figura 27. Influência das condições de produção na eficácia de encapsulação de nanopartículas de PLGA (10 mg/ml) com Gd(DTPA-bismetilamida), Gd(DTPA-bisheptilamida), Gd(DTPA-bisestearilamida), Gd(DTPA-bismetoxietilamida) e Gd(DTPA-bismorfolinoetilamida), recorrendo às condições de produção A, PLA 203 ($r=0,60$); B, PLA 202H ($r=0,60$); C, PLA 203 ($r=0,33$); D, PLA 203 ($r=1,00$) e E, PLGA 502H ($r=0,33$). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p); (n=1).

Da mesma forma, verificou-se que com a maioria dos métodos de produção, a encapsulação do derivado heptilamida, mais hidrofóbico, foi mais eficaz que a do derivado metilamida, mais hidrofílico. A encapsulação de ambos os quelatos foi mais eficaz com a condição C (PLA 203; $r=0,33$) mas os elevados diâmetros médios obtidos, muito superiores a 200 nm constituíram um aspecto limitante.

Embora este aumento de hidrofobicidade tenha permitido aumentar a eficácia de encapsulação, os melhores resultados obtidos com os derivados heptil- e estearilamida não ultrapassaram 12,5% e 17,3%, respectivamente (figura 27).

A encapsulação do quelato Gd(DTPA-bismetoxietilamida), fortemente hidrofílico (Adzamli *et al.*, 1999), não demonstrou quaisquer potencialidades com os polímeros utilizados. De facto, independentemente do polímero ou da condição de produção utilizados, a eficácia de encapsulação obtida foi sempre muito reduzida, ascendendo apenas a um máximo de 3% (condição E, figura 27).

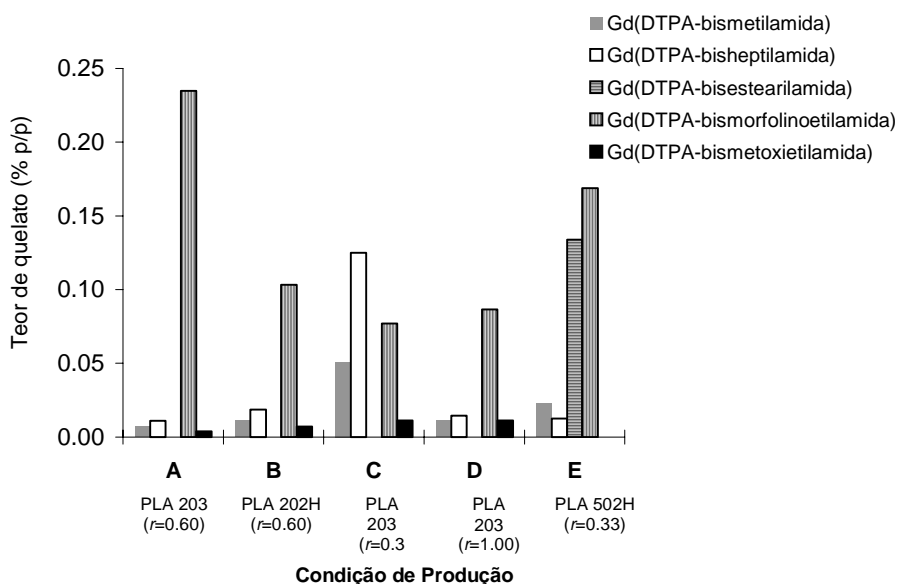


Figura 28. Influência das condições de produção no teor de quelato encapsulado em nanopartículas de PLGA (10 mg/ml) com Gd(DTPA-*bismetilamida*), Gd(DTPA-*bisheptilamida*), Gd(DTPA-*bisestearilamida*), Gd(DTPA-*bismetoxietilamida*) e Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*), recorrendo às condições de produção A, PLA 203 ($r=0,60$); B, PLA 202H ($r=0,60$); C, PLA 203 ($r=0,33$); D, PLA 203 ($r=1,00$) e E, PLGA 502H ($r=0,33$). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p); (n=1).

Embora igualmente hidrofílico, o quelato Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) demonstrou algumas potencialidades ao nível da sua encapsulação com PLA e PLGA (figura 27). A sua encapsulação em nanopartículas de PLA 203 permitiu obter os melhores resultados face aos polímeros PLA 202H e PLGA 502H, tendo-se verificado eficácias de encapsulação de 23,5% (condição A), 10,3% (condição B) e 16,9% (condição E), respectivamente. A eficácia de encapsulação do quelato com PLA 203 foi condicionada pela razão volumétrica entre as fases, tendo-se obtido valores inferiores a 10% com as condições C (7,7%) e D (8,7%), em que esse quociente é mais extremo.

Os teores obtidos na encapsulação dos quelatos de cadeia alquílica simples – Gd(DTPA-*bismetilamida*), Gd(DTPA-*bisheptilamida*) e Gd(DTPA-*bisestearilamida*) – apenas ascenderam a 0,13% com os dois últimos, quando encapsulados recorrendo às condições C e E, respectivamente. Os teores obtidos na encapsulação dos derivados metil- e metoxietilamida mantiveram-se sempre inferiores a 0,1%, independentemente da condição de produção utilizada. Apenas na encapsulação do derivado morfolínico se obtiveram teores de quelato um pouco mais elevados, ascendendo a 0,17% e 0,24%, quando se recorreram às condições E e A, respectivamente.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos por outros autores com a encapsulação de moléculas moderada ou marcadamente hidrofílicas, recorrendo a polímeros como o PLA e PLGA (Yoo *et al.*, 1999; Govender *et al.*, 1999).

A obtenção de baixos teores de fármaco em nanosferas preparadas por deslocação de solvente tem sido referido como uma desvantagem deste método de produção, devida essencialmente à partição preferencial da molécula para a fase aquosa durante o processo de produção (Niwa *et al.*, 1994).

No intuito de avaliar as possíveis causas de encapsulações tão pouco eficazes, determinámos os teores de quelato presentes na suspensão de nanopartículas no final da produção (figura 29).

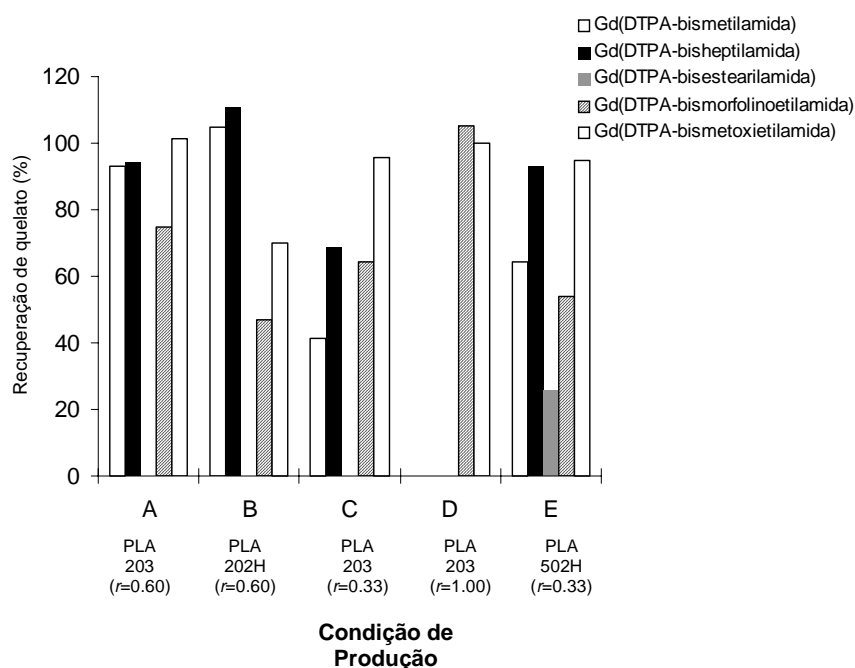


Figura 29. Influência das condições de produção na percentagem de quelato recuperado na suspensão final de nanopartículas de PLGA (10 mg/ml) com Gd(DTPA-bismetilamida), Gd(DTPA-bisheptilamida), Gd(DTPA-bisestearilamida), Gd(DTPA-bismorfolinoetilamida) e Gd(DTPA-bismetoxietilamida), recorrendo às condições de produção A, PLA 203 ($r=0,60$); B, PLA 202H ($r=0,60$); C, PLA 203 ($r=0,33$); D, PLA 203 ($r=1,00$) e E, PLGA 502H ($r=0,33$). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p); (n=1).

Verificou-se que na generalidade ocorreram perdas significativas de quelato durante o processo de produção, diminuindo a quantidade disponível para encapsulação. Tais perdas poderão estar associadas à cristalização de quelato durante o método de produção (Bodmeier *et al.*, 1998). Os quelatos estudados não são solúveis em acetona, o solvente constituinte da fase orgânica, pelo que lhe foram adicionados solubilizados em etanol, etanol/água ou metanol. Esta diferença de solubilidade poderá estar na origem da precipitação do quelato aquando da sua adição à fase orgânica, nomeadamente no caso do quelato de cadeia metilamida, mais hidrofílico. A precipitação de quelato na interface entre as fases orgânica e aquosa no momento da sua adição poderá igualmente estar associado

a recuperações tão reduzidas, principalmente no caso do derivado estearilamída, o mais hidrofóbico.

De facto, no processo de encapsulação do derivado heptilamída pela condição C, com a qual se obteve a eficácia de encapsulação mais elevada (12,5%), o teor de quelato recuperado não ultrapassou os 69%, o que se traduziu por uma perda de 31% durante o processo de produção das nanopartículas e logo, numa diminuição considerável do teor de quelato disponível para encapsulação. Essa diminuição foi ainda maior na encapsulação do derivado estearilamída (condição E), ascendendo a 74,4%, pelo que apenas 25,6% do teor de quelato adicionado ficou disponível para encapsulação, resultando numa eficácia de apenas 17,3%.

Também no processo de encapsulação de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamída) se registaram perdas de quelato consideráveis. A sua recuperação pela condição A, com a qual se obtiveram os melhores resultados de encapsulação (23,5%), não ultrapassou 74,9%, o que se traduz numa perda de cerca de 25% de quelato durante o processo de produção. Essa perda foi de cerca de 46% quando se recorreu à sua encapsulação pela condição E, restando apenas 53,9% de quelato disponível para encapsulação. No entanto, são muito poucos os trabalhos publicados em que este aspecto é avaliado. Por outro lado, a maioria dos trabalhos referentes à encapsulação de moléculas de hidrofobicidade reduzida incide na utilização de microsferas (Walter *et al.*, 1999; Mandal, 1998; Johansen *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos, ainda que preliminares, permitiram retirar alguns indícios relativamente ao tipo de estratégia a seguir para otimizar a encapsulação destes quelatos.

Com base na triagem efectuada, os polímeros PLA 203 e PLGA 502H parecem ter potencial para encapsular alguns dos quelatos estudados pelo método de deslocação de solvente, nomeadamente a Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamída) e a Gd(DTPA-*bis*estearilamída).

A encapsulação do quelato hidrofílico Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamída) demonstrou a maior potencialidade, apesar dos teores encapsulados serem em geral muito reduzidos face ao teor de 1% (p/p) de quelato adicionado (figura 28).

A encapsulação de Gd(DTPA-*bis*estearilamída) em nanosferas de PLGA 502H indicou também alguma potencialidade, a ser confirmada por mais estudos. Nesse sentido, o trabalho prosseguiu incidindo não só na confirmação dos resultados já obtidos com os dois quelatos mais promissores, mas principalmente na sua ampliação, no intuito de avaliar e detectar outras condições de produção passíveis de tornar a encapsulação destes quelatos

em nanosferas de poliésteres, por deslocação de solvente, mais eficaz, aspectos ainda não explorados ao nível da bibliografia publicada.

3.3.2. Ensaio de optimização da eficácia de encapsulação

Face aos resultados obtidos nos ensaios preliminares, os estudos foram continuados no sentido de optimizar a encapsulação dos quelatos Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) [Gd(DTPA-MPEA₂)] e Gd(DTPA-*bis*estearilamida) [Gd(DTPA-SA₂)], em detrimento de Gd(DTPA-*bis*metilamida) [Gd(DTPA-MA₂)] e Gd(DTPA-*bis*heptilamida) [Gd(DTPA-HPA₂)], uma vez que estes dois quelatos apresentaram um menor potencial de encapsulação com os polímeros utilizados.

I. Gd(DTPA-*bis*estearilamida)

Com o intuito de optimizar o processo de produção de nanosferas de PLA para que a encapsulação de Gd(DTPA-*bis*estearilamida) fosse mais eficaz, foi avaliada a influência do aumento de peso molecular do polímero e a diminuição da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa.

1. Influência do aumento do peso molecular do polímero

Como se observa na tabela 15, a utilização de um polímero de maior peso molecular (90000) permitiu um aumento considerável da eficácia de encapsulação de Gd(DTPA-SA₂) em nanopartículas de PLA, o que poderá estar associado não só ao aumento concomitante da viscosidade da fase orgânica (Blanco e Alonso, 1997) como também a um endurecimento mais rápido do polímero durante a produção das nanosferas. Este aspecto tem sido referido por alguns autores na encapsulação de fármacos em microsferas de PLGA (Nakada *et al.*, 1998).

O facto deste quelato ter carácter anfipático (Jasanada *et al.*, 1992 e 1996) levanta a hipótese de formar micelas em meio aquoso nas concentrações utilizadas durante a formulação. Nesse caso, pressupõe-se uma encapsulação tanto mais eficaz quanto mais rápido for o endurecimento do polímero e a viscosidade da fase orgânica, impedindo a sua micelização na fase aquosa durante o processo de encapsulação.

Tabela 15. Características de nanopartículas de PLA 90⁽¹⁾ (10 mg/ml) com Gd(DTPA-SA₂). Resultados obtidos no processo de optimização das formulações obtidas nos ensaios preliminares, em que se avaliou as potencialidades de PLA 203⁽¹⁾ (10 mg/ml). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Polímero	Parâmetros de encapsulação				Características granulométricas		Carga de superfície
	PM	E.E. (%)	Teor de quelato (%)	Recuperação (%)	Diâmetro médio ^a (nm)	I.P. ^a	Pot. Zeta ^b (mV)
PLA 203	29600	0,02±0,01 ^b	0,00±0,00 ^b	23,1±15,1 ^b	Nd	Nd	Nd
PLA 90	90000	38,9±38,7 ^c	0,39±0,27 ^c	43,2±27,3 ^c	235,8±10,1	0,06±0,01	-24,2±2,4

(a), Índice de Polidispersão, n=10; (b), n=3; (c), n=2; Nd, não determinado. ⁽¹⁾Razão volumétrica entre a fase orgânica e a fase aquosa de 0,33.

O carácter micelar deste quelato poderá também explicar a carga obtida à superfície das nanosferas. De facto, os valores de potencial zeta obtidos quer com nanosferas de PLA vazias (Berton *et al.*, 1999; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998a) quer nos ensaios preliminares com a encapsulação de outros quelatos anteriormente analisados, foram consideravelmente mais negativos. A menor negatividade das nanosferas com este quelato poderá assim estar associada à sua presença na superfície do vector, comportando-se como surfactante não iónico, os quais se sabem poder reduzir a hidrofobicidade da superfície deste tipo de sistema coloidal (Carstensen *et al.*, 1991; Sagrado *et al.*, 1994). Esta redução de hidrofobicidade foi também verificada com lipossomas revestidos com estearilamina (Barrat, 1999).

A eficácia de encapsulação deste quelato em nanopartículas de PLA 203, cujo peso molecular médio ascende a 29600, foi praticamente nula, o mesmo se verificando com o teor de quelato encapsulado. Estes resultados poderão advir não só do baixo peso molecular do polímero, como também da elevada perda de quelato que se verificou durante a produção de nanopartículas, como se observa pela recuperação de apenas 23,1% de quelato na suspensão final.

A encapsulação de Gd(DTPA-SA₂) recorrendo a um PLA de elevado peso molecular (90000) aumentou a recuperação de quelato para 43,2%, traduzindo-se numa eficácia de encapsulação de cerca de 40%, embora com elevada variabilidade. Apesar do aumento significativo destes dois parâmetros, a perda de quelato manteve-se muito elevada (56,8%), podendo constituir um impedimento à encapsulação de teores de quelato mais elevados.

2. Influência da diminuição da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa

Nos ensaios preliminares, a encapsulação de Gd(DTPA-SA₂) com PLGA 502H traduziu-se numa eficácia de encapsulação média de 17,3%, apesar da elevada perda de quelato registada (69,5%).

O aumento da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa de 0,17 para 0,33 permitiu um ligeiro aumento (ca. 5%) do teor de fármaco recuperado, embora a eficácia de encapsulação tenha diminuído drasticamente para valores quase nulos. Os resultados observados encontram-se registados na tabela 16. De facto, quanto maior a razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa, mais lenta é a migração da acetona para a fase aquosa, permitindo uma perda maior de quelato para a fase aquosa (Blanco e Alonso, 1997; Niwa *et al.*, 1993; Niwa *et al.*, 1994).

Tabela 16. Características de nanopartículas de PLGA 502H (10 mg/ml) com Gd(DTPA-SA₂). Resultados obtidos no processo de optimização das formulações obtidas nos ensaios preliminares, por diminuição da razão volumétrica entre as fases (*r*), de 0,33 para 0,17. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

<i>r</i> (v/v)	Parâmetros de encapsulação		Características granulométricas		Carga de superfície	
	E.E. (%)	Teor de quelato (%)	Recuperação (%)	Diâmetro médio ^a (nm)	I.P. ^a	Pot. Zeta ^b (mV)
0,33	17,3±7,9 ^b	0,17±0,08 ^b	25,6±15,6 ^b	121,6±3,2 ^a	0,054±0,02 ^a	-18,4±2,99 ^b
0,17	0,03±0,01 ^b	0,00±0,00 ^b	30,5±2,6 ^b	Nd	Nd	Nd

(a), Índice de Polidispersão, n=8; (b), n=3; Nd, não determinado.

Concluindo, os resultados obtidos com a encapsulação deste quelato de Gd(III) em nanopartículas de PLA ou PLGA não permitiram verificar a hipótese de que a presença de cadeias laterais hidrofóbicas conduziria a uma interacção forte com estes polímeros, possivelmente devido ao carácter anfipático do quelato, reduzindo a possibilidade de se estabelecerem interacções hidrofóbicas entre o quelato e os polímeros.

II. Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida)

A optimização da encapsulação deste quelato incidiu na avaliação da influência de vários parâmetros tecnológicos de produção, com o intuito de obter uma formulação com teor de quelato mais elevado, cujas condições de produção permitissem obter

simultaneamente populações de nanosferas unimodais e monodispersas, por deslocação de solvente.

Neste contexto, foram avaliadas dois tipos diferentes de preparação da fase orgânica, diferindo principalmente no estado físico do polímero aquando da adição da solução de quelato e designados por método inicial (3.2.2.1) e método modificado (3.B.II.B).

A. Produção de nanosferas pelo método inicial

Na preparação de nanosferas pelo método inicial estudaram-se a influência dos parâmetros peso molecular do polímero, tipo de polímero e razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa, na encapsulação de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida).

A.1. Influência do peso molecular do polímero

No intuito de avaliar a influência do peso molecular do polímero na eficácia de encapsulação deste quelato, recorreu-se a vários polímeros de poli(ácido láctico) e poli(ácido láctico-*co*-glicólico).

A.1.1. PLGA

Em geral, a utilização de polímeros de maior peso molecular conduz à obtenção de fases orgânicas mais viscosas. Como consequência, a dispersão da fase orgânica na fase aquosa externa é mais dificultada, obtendo-se nanosferas de maior dimensão (Blanco e Alonso, 1997; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996). No entanto, a encapsulação do quelato em nanosferas de PLGA (50/50) de peso molecular crescente não demonstrou influenciar significativamente as características granulométricas deste tipo de sistema polímero-vector, como tem sido verificado noutros trabalhos (Niwa *et al.*, 1993), embora se tenha verificado um ligeiro decréscimo com a maior razão volumétrica, também já evidenciado por outros (Witschi e Doelker, 1998).

As populações obtidas foram em geral unimodais com diâmetros médios entre 98,7 nm e 107,7 nm, como se observa na tabela 17. A obtenção do maior diâmetro médio com PLGA 755 resulta eventualmente não só do seu elevado peso molecular, como também da sua composição monomérica. Enquanto que os restantes PLGA utilizados têm igual teor (50/50) de lactato e glicolato, este contém 75% de lactato e apenas 25% de glicolato. Como

tal, a maior proporção de grupos α -metilo do lactato na sua estrutura poderá estar na origem do aumento de diâmetro médio das nanosferas.

Tabela 17. Características granulométricas de nanosferas obtidas com PLGA (10 mg/ml) de peso molecular crescente, pelo método inicial e recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. A tabela indica os diâmetros médios (nm) obtidos e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Peso molecular	Polímero	Razão f. orgânica/f. aquosa (v/v)	
		0.17	0.25
6000	PLGA 502H	107.5 (0.13)	107.7 (0.08)
32400	PLGA 503H	ND	106.1 (0.11)
63000	PLGA 755	122.1 (0.07)	ND
50-75000	PLGA 50-75	107.3 (0.08)	98.7 (0.09)

ND, não determinado.

Ao avaliar a influência do peso molecular do PLGA na encapsulação de Gd(DTPA-bismorfolinoetilamida) verificou-se que a utilização de polímeros de peso molecular mais elevado conduzia a um decréscimo considerável da eficácia de encapsulação (figura 30) e do teor de quelato encapsulado (figura 31).

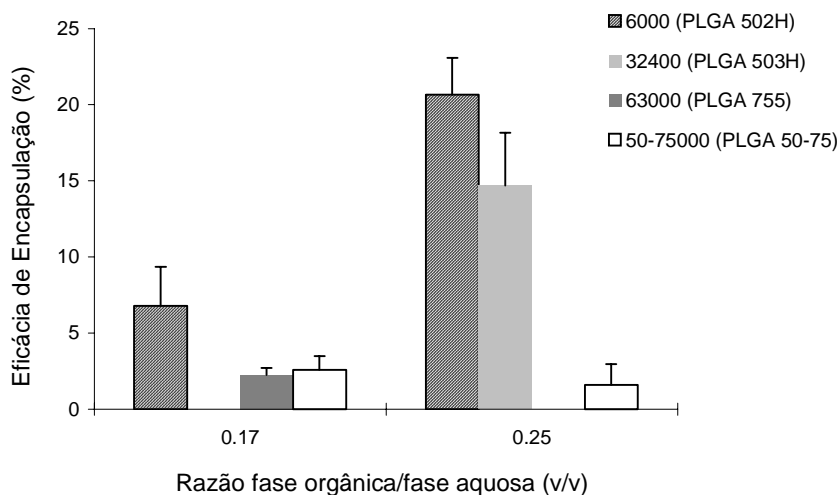


Figura 30. Influência do peso molecular de PLGA (10 mg/ml) na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-bismorfolinoetilamida) em nanosferas preparadas pelo método inicial com razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa, de 0,17 e 0,25. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Conforme se observa nas figuras 30 e 31, esta influência é independente da razão volumétrica utilizada entre as fases orgânica e aquosa, sendo a eficácia de encapsulação do quelato inferior a 5% com os polímeros PLGA 755 e PLGA 50-75, de pesos moleculares 63600 e 50-7500, respectivamente. No entanto, a preparação de nanosferas com o PLGA 502H, de menor peso molecular, recorrendo à razão volumétrica mais elevada permitiu obter

eficácias de encapsulação e teores de quelato mais significativos, ascendendo a cerca de 20% e 0,14%, respectivamente.

O aumento do peso molecular do polímero conduz ao aumento da viscosidade da fase orgânica (Wang *et al.*, 1999; Blanco e Alonso, 1997), originando a migração mais lenta da acetona para a fase aquosa, o que possibilita uma maior fuga de quelato presente na interface para a fase aquosa (Niwa *et al.*, 1993 e 1994).

No entanto, outros factores poderão estar envolvidos na encapsulação deste quelato. Dos quatro PLGA utilizados, os PLGA 502H e 503H são caracterizados pela presença de grupos COOH terminais enquanto que os PLGA 755 e 50-75 contêm esses grupos esterificados (COOR). Como tal, para a mesma massa de polímero, a utilização de PLGA 503H conduz à presença de um menor número desses grupos aniónicos (Zambaux *et al.*, 1999), os quais podem interagir com os grupos amina do quelato, promovendo a sua encapsulação. Esta hipótese é concordante com os resultados obtidos por Blanco e Alonso (1997) na encapsulação de um modelo peptídico (BSA) em nanosferas de PLGA. Por outro lado, esta hipótese é apoiada pelos resultados obtidos com os PLGA 755 e 50-75 (fig. 31). A encapsulação com estes dois polímeros com grupos COOR terminais foi muito reduzida. De forma a caracterizar melhor o processo de produção e tentando identificar as possíveis causas para a reduzida taxa de encapsulação que se verificou, doseámos o quelato existente na suspensão final de nanosferas após a sua produção.

Embora o aumento do peso molecular dos polímeros PLGA utilizados tenha diminuído a eficácia de encapsulação e o teor de quelato, observados, foi benéfica ao nível da recuperação de quelato na suspensão final de nanosferas, apesar da variabilidade observada.

De facto, como se observa na figura 32, são os polímeros PLGA 755 (PM 63600) e PLGA 50-75 (PM 50-75000) que melhor previnem a perda de quelato durante o processo de produção de nanosferas recuperando-se, com este último, uma média de 75,4% de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*). Estes resultados poderão estar associados a uma maior velocidade de deposição de polímero devido ao decréscimo da sua solubilidade com o aumento do peso molecular (Niwa *et al.*, 1993).

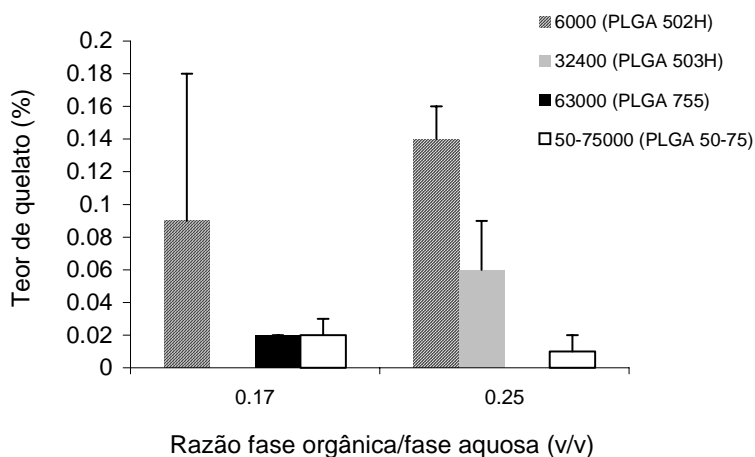


Figura 31. Influência do peso molecular de PLGA (10 mg/ml) no teor (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) encapsulado em nanosferas preparadas pelo método inicial com razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa, de 0,17 e 0,25. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

A produção de nanosferas de PLGA de elevado peso molecular permitiu desta forma a existência de um teor mais elevado de quelato disponível durante o processo de encapsulação. No entanto, este facto não se traduziu, como se verifica nas figuras 30 e 31, numa encapsulação mais eficaz.

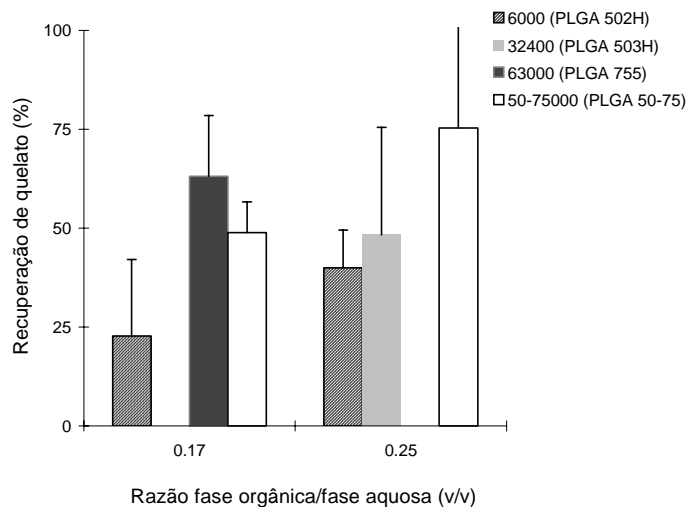


Figura 32. Influência do peso molecular de PLGA (10 mg/ml) na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas preparadas pelo método inicial com razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa, de 0,17 e 0,25. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Estes dados apontam assim para uma fraca eficácia destes polímeros para a encapsulação do quelato em causa, uma vez que, apesar da perda de quelato durante o processo de produção das nanosferas ter sido relativamente reduzida face aos resultados obtidos com os polímeros de menor peso molecular e, portanto, se ter obtido o teor mais elevado de quelato disponível para ser encapsulado, isso não se traduziu na obtenção de sistemas coloidais com eficácias de encapsulação significativas. Por outro lado, apesar do teor de quelato recuperado com PLGA 502H e, portanto, disponível para encapsulação, não

ter ultrapassado, em média, 40%, a eficácia de encapsulação correspondente ascendeu a 20,7%, o que indicia algum potencial deste polímero ao nível da encapsulação de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*).

Estes polímeros, de maior peso molecular, possuem os seus grupos carboxilo terminais esterificados, o que poderá também constituir um factor importante na encapsulação do quelato, favorecendo uma interacção de carácter electrostático entre ambos. Neste contexto, os resultados indiciam que, dos vários PLGA utilizados, a encapsulação será mais eficaz com aqueles que reunam simultaneamente as características de baixo peso molecular e cujos grupos carboxilo terminais se apresentam livres, o que parece conduzir a uma maior interacção polímero-quelato. Estas interacções iónicas têm sido referidas como condicionando uma libertação mais lenta do agente encapsulado (Blanco e Alonso, 1997; Mauduit e Vert, 1993; Witschi e Doelker, 1998).

A.1.2. PLA

Ao contrário dos resultados obtidos com PLGA de diferentes pesos moleculares, as características granulométricas dos sistemas nanoparticulares obtidos por encapsulação de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) com PLA foram condicionadas pelo peso molecular do polímero. Como se observa na tabela 18, a utilização de PLA de peso molecular crescente diminuiu o diâmetro médio obtido, principalmente quando se recorreu à razão volumétrica mais elevada (0,25) entre as fases orgânica e aquosa. Zambaux *et al.* verificaram uma ligeira redução do diâmetro médio na encapsulação de albumina sérica humana (Zambaux *et al.*, 1998) e proteína C (Zambaux *et al.*, 1999) com PLA de peso molecular crescente. No entanto, este comportamento parece ser também condicionado por essa mesma razão volumétrica.

Tabela 18. Características granulométricas de nanosferas obtidas pelo método inicial com PLA (10 mg/ml) de peso molecular crescente, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. A tabela indica os diâmetros médios (nm) obtidos e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

		<i>Ratio f. orgânica/f. aquosa (v/v)</i>	
		0.17	0.25
Peso molecular	Polímero		
11000	PLA 202H	122.3 (0.08)	226.9 (0.15)
29600	PLA 203	186.9 (0.06)	185.5 (0.03)
90000	PLA 90	140.3 (0.08)	142.2 (0.10)

A encapsulação deste quelato em nanosferas de PLA demonstrou um perfil, em termos gerais, muito semelhante ao registado com PLGA. De facto, como se observa na figura 33, o recurso a polímeros de poli(ácido láctico) de peso molecular crescente traduziu-se num decréscimo acentuado da eficácia de encapsulação. A hidrofobicidade do PLA é atenuada pelo efeito dos grupos carboxilo terminais. Considerando uma massa constante de polímero, o número destes grupos diminui com o aumento do peso molecular, aumentando o seu carácter hidrofóbico. No entanto, a sua influência na encapsulação de moléculas depende do tipo de interacções que se possam estabelecer com o polímero. Zambaux *et al.* (1999) não observou quaisquer alterações da eficácia de encapsulação de proteína C pelo aumento do peso molecular do polímero.

Por outro lado, a hidrofilia do polímero poderá ser crucial na encapsulação de moléculas pouco hidrófobas. Recentemente, Li *et al.* (1999) verificou que a utilização de PLA mais hidrofílico, por introdução de domínios etilenoglicol na sua estrutura, conduzia a um aumento muito elevado da eficácia de encapsulação de antígenos hidrofílicos.

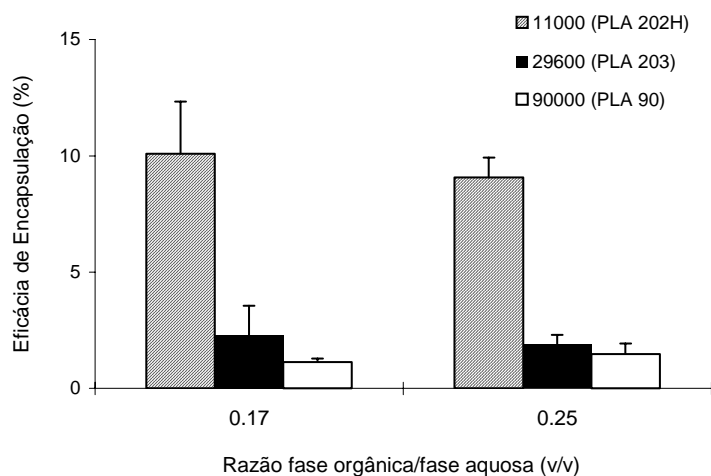


Figura 33. Influência do peso molecular dos polímeros de poli(ácido láctico) (10 mg/ml) na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-bismorfolinoetilamida) em nanosferas preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

De facto, embora os três polímeros utilizados fossem caracterizados por pesos moleculares muito diferentes, esse decréscimo foi mais acentuado com o PLA 203 (PM 29,6 kDa, COOR), diminuindo a eficácia de encapsulação média de 10% com PLA 202H (PM 11 kDa, COOH) para 2,3% com esse polímero.

O aumento do peso molecular do PLA para 90000 provocou apenas um ligeiro decréscimo, pouco significativo. Este comportamento foi independente da razão volumétrica utilizada, sendo extensível aos resultados obtidos ao nível do teor de quelato encapsulado (figura 34).

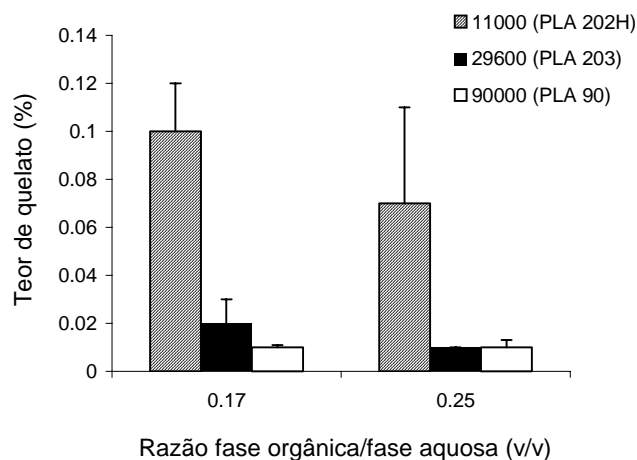


Figura 34. Influência do peso molecular dos polímeros de poli(ácido láctico) (10 mg/ml) no teor (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

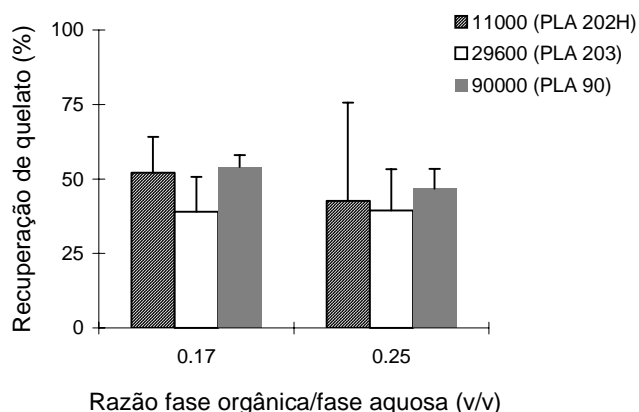


Figura 35. Influência do peso molecular dos polímeros de poli(ácido láctico) (10 mg/ml) na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Contrariamente aos resultados obtidos na recuperação de quelato na suspensão final de nanopartículas de PLGA, o aumento do peso molecular do PLA utilizado não demonstrou ter qualquer influência a este nível. A menor hidrofilia do PLA em relação ao PLGA pode condicionar a afinidade quelato-polímero, diminuindo a recuperação, o que é corroborado pela menor eficácia de encapsulação do PLA face ao PLGA.

Como se observa na figura 35, independentemente do peso molecular do polímero e para ambas as razões volumétricas utilizadas, a perda de quelato durante o processo de

produção das nanosferas aproximou-se, em média, de 50%, reduzindo para metade o teor de quelato disponível para encapsulação. Esta perda de quelato poderá estar na base das reduzidas eficácias de encapsulação verificadas com os polímeros de poli(ácido láctico). No entanto, o facto da eficácia de encapsulação ser significativamente diferente entre o PLA 202H e os PLA 203 e 90 poderá também estar relacionada com uma outra característica destes polímeros. De facto, o PLA 202H apresenta os seus grupos carboxilo terminais livres, enquanto que os PLA 203 e PLA 90 apresentam estes grupos esterificados, o que parece constituir um aspecto negativo na interacção polímero-quelato.

2. Influência do tipo de polímero

Com o objectivo de avaliar a eventual influência do tipo de polímero na encapsulação do quelato, foram comparados os resultados obtidos com três grupos de polímeros de pesos moleculares relativamente próximos de entre si, nomeadamente PLA 202H *vs.* PLGA 502H, PLA 203 *vs.* PLGA 503H e PCL *vs.* PLA 90 *vs.* PLGA 50-75, no intuito de discriminar, em cada grupo, qual o tipo de polímero mais eficaz.

A caracterização físico-química obtida após encapsulação de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de PCL, PLA e PLGA, demonstra uma influência clara do tipo de polímero utilizado ao nível da distribuição granulométrica e polidispersão, dos sistemas resultantes.

Tabela 19. Características granulométricas de nanosferas obtidas com diferentes polímeros (10 mg/ml) de PLA, PLGA e PCL, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa e preparadas pelo método inicial. A tabela indica os diâmetros médios obtidos (nm) e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p). Nd, não determinado.

Polímero	<i>Ratio f. orgânica/f. aquosa (v/v)</i>	
	0,17	0,25
PLA 202H	122,3±3,6 (0,08)	226,9±1,2 (0,15)
PLGA 502H	107,5±2,3 (0,13)	107,7±2,5 (0,08)
PLA 203	186,9±4,9 (0,06)	185,5±0,1 (0,03)
PLGA 503H	Nd	106,1±3,5 (0,11)
PCL	229,4±8,9 (0,13)	255,6±16,8 (0,18)
PLA 90	140,3±3,19 (0,08)	142,2±2,88 (0,10)
PLGA 50-75	107,3±2,14 (0,08)	98,73±9,73 (0,09)

Como se observa na tabela 19, independentemente da razão volumétrica utilizada entre as fases orgânica e aquosa, a encapsulação de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) em nanosferas de poli(ϵ -caprolactona) conduziu à obtenção de populações com o diâmetro médio e índice de polidispersão, mais elevados, relativamente aos valores obtidos com os poliésteres PLA e PLGA. A distribuição granulométrica obtida com o recurso a estes polímeros resultou, invariavelmente, em diâmetros médios mais elevados para os polímeros de PLA face aos polímeros de PLGA, devido ao maior teor de grupos α -metilo na estrutura dos PLA (Witschi e Doelker, 1998).

A encapsulação do quelato, independentemente da razão volumétrica utilizada, foi mais eficaz com os poli(ácido láctico) e poli(ácido láctico-*co*-glicólico) que apresentam grupos carboxílicos terminais livres (PLA 202H, PLGA 502H e PLGA 503H) face aos poliésteres em que estes grupos se encontram esterificados (PLA 203, PLA 90 e PLGA 50-75) (figuras 36-38).

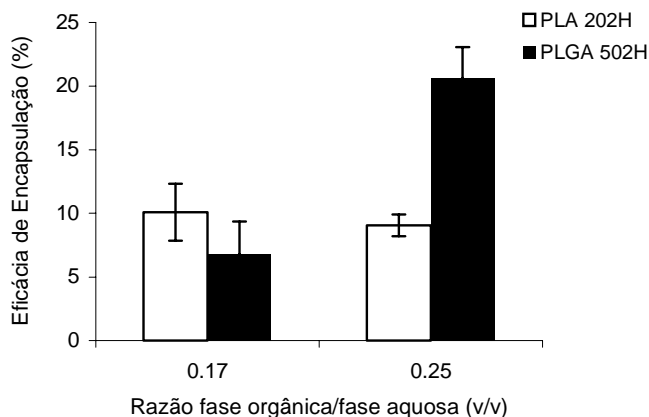


Figura 36. Influência do tipo de polímero (10 mg/ml) na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) em nanosferas de PLA 202H e PLGA 502H preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25 entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

De facto, como se observa na figura 36, as eficácias de encapsulação mais elevadas foram obtidas com PLGA 502H e PLA 202H, atingindo valores médios máximos de 20% e 10%, respectivamente, às quais correspondem teores médios de 0,14% e 0,1%. Por outro lado, a própria estrutura monomérica do polímero parece ter alguma influência. O impedimento estérico provocado pelos grupos α -metilo no PLA 202H poderá limitar o estabelecimento de ligações de hidrogénio entre os oxigénios carbonílicos do polímero e os grupos amina do quelato (Johansen *et al.*, 1999).

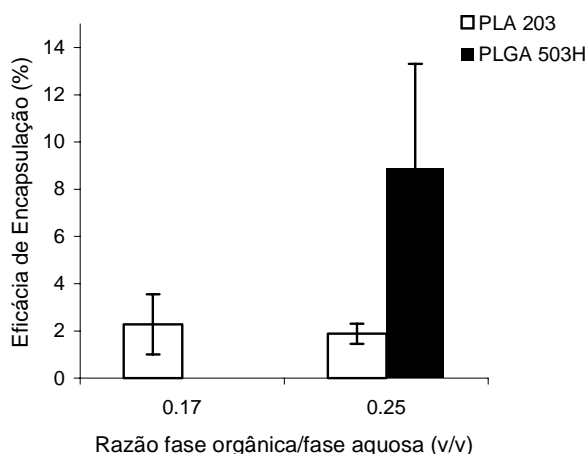


Figura 37. Influência do tipo de polímero (10 mg/ml) na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de PLA 203 e PLGA 503H preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25 entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

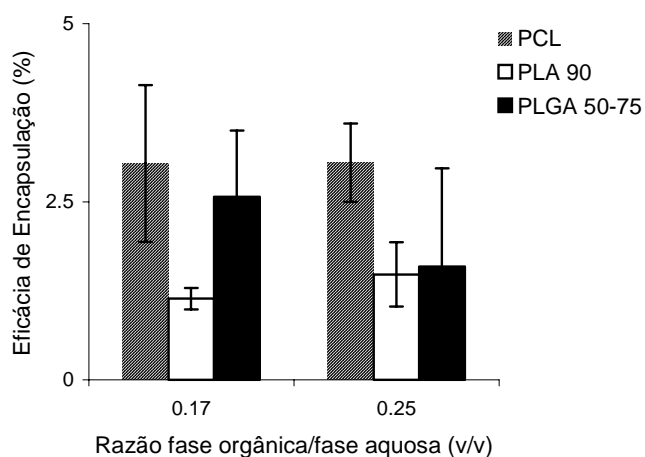


Figura 38. Influência do tipo de polímero (10 mg/ml) na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de PCL, PLA 90, ou PLGA 50-75 preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25 entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

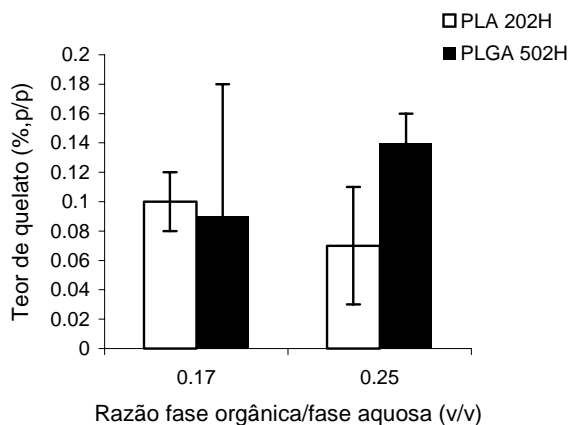


Figura 39. Influência do tipo de polímero no teor (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de PLA 202H e PLGA 502H preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

A encapsulação mais eficaz do quelato com estes dois polímeros (PLA 202H, PLGA 502H) poderá estar relacionada com a sua maior hidrofília face aos polímeros PLA 203, PLA 90, PLGA 50-75 e PCL, mais hidrófobos, o que também poderá, em parte, explicar os resultados mais positivos obtidos com o PLGA 502H relativamente ao PLA 202H. Johansen *et al.* (1998) verificaram que os polímeros mais hidrofílicos encapsulavam mais eficazmente o toxóide tetânico em microsferas, independentemente do método de produção. Estes resultados são concordantes com os obtidos pelos mesmos autores, em que o PLGA (50/50) com carboxilo terminal conduziu à encapsulação mais eficaz dos toxóides tetânico e diftérico, quando comparados com carboxilo esterificado (Johansen *et al.*, 1999).

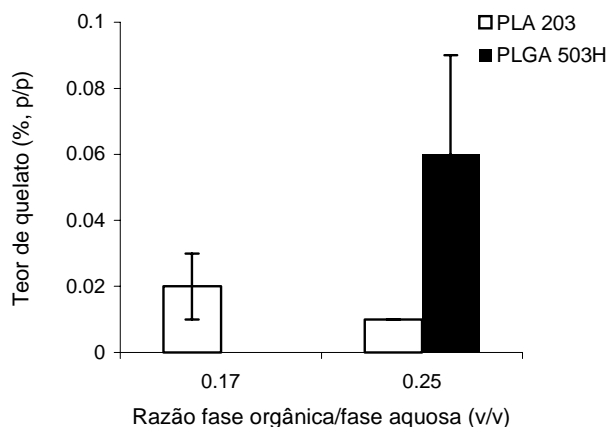


Figura 40. Influência do tipo de polímero no teor (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de PLA 203 e PLGA 503H preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

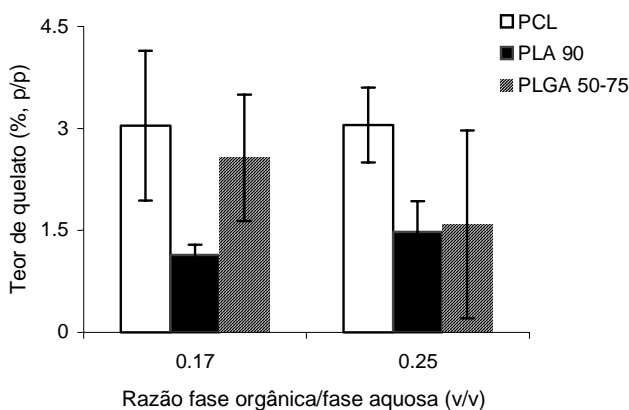


Figura 41. Influência do tipo de polímero no teor (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de PCL, PLA 90 ou PLGA 50-75 preparadas pelo método inicial, recorrendo às razões volumétricas 0,17 e 0,25, entre as fases orgânica e aquosa. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

O tipo de polímero parece também condicionar o teor de quelato recuperado após a produção de nanosferas (figura 42-44). A poli(ϵ -caprolactona) foi o polímero que melhor preveniu a perda de quelato, independentemente da razão volumétrica utilizada entre as fases orgânica e aquosa. O quelato recuperado na suspensão de nanosferas de PCL variou entre 60 e 65% (figura 44), valores superiores aos obtidos com PLA e PLGA (figura 42). Embora a produção de nanosferas com PLGA 502H tenha conduzido a perdas entre 50% e 60%, foi com este polímero que se obteve a melhor eficácia de encapsulação (figura 36) e teor de quelato (figura 39).

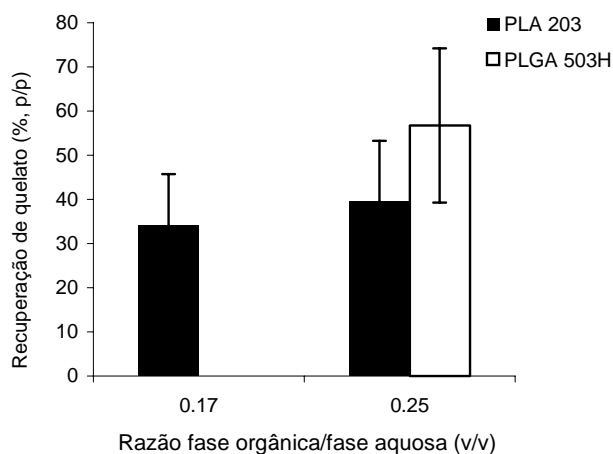


Figura 42. Influência do tipo de polímero (10 mg/ml) na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) na suspensão final de nanosferas de PLA 202H ou PLGA 502H produzidas pelo método inicial com razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa de 0,17 e 0,25. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

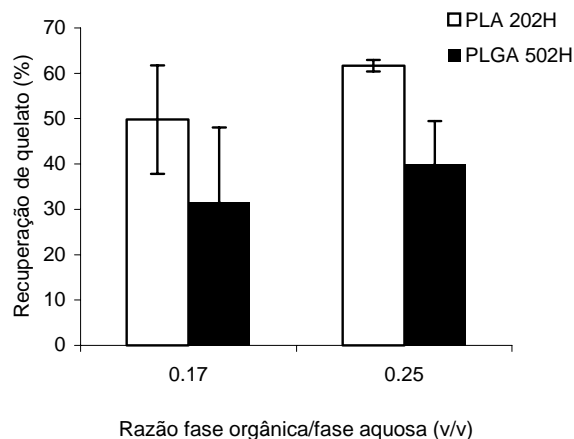


Figura 43. Influência do tipo de polímero (10 mg/ml) na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) na suspensão final de nanosferas de PLA 203 ou PLGA 503H produzidas pelo método inicial com razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa de 0,17 e 0,25. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

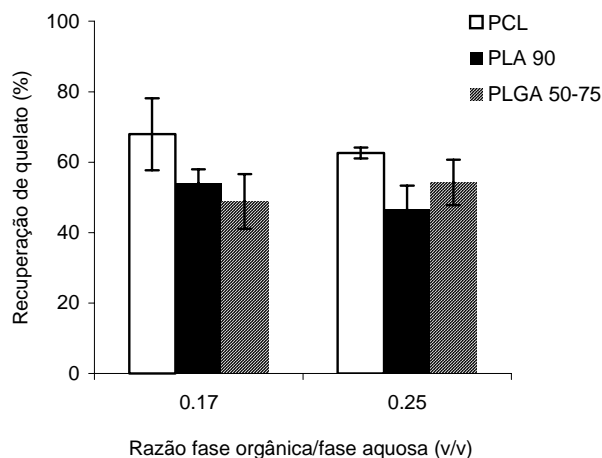


Figura 44. Influência do tipo de polímero (10 mg/ml) na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) na suspensão final de nanosferas de PCL, PLA 90 ou PLGA 50-75 produzidas pelo método inicial com razões volumétricas entre as fases orgânica e aquosa de 0,17 e 0,25. O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

3. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa

A variação da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa não influenciou significativamente as características granulométricas das nanosferas obtidas com os diferentes polímeros, o que tem sido referido na literatura (Wehrle *et al.*, 1995; Leroux *et al.*, 1995).

Tabela 20. Características granulométricas de nanosferas preparadas pelo método inicial com diferentes polímeros (10 mg/ml) de PLA, PLGA e PCL, recorrendo a razões volumétricas crescentes entre as fases orgânica e aquosa. A tabela indica os diâmetros médios obtidos (nm) e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Polímero	<i>Razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa</i>				
	0.17	0.25	0.33	0.60	1.00
	<i>Diâmetro médio (nm) (I.P.)</i>				
PLA 202H	122.3 (0.08)	226.9 (0.15)		119.7 (0.08)	
PLA 203	186.9 (0.06)	185.5 (0.03)	172.8 (0.04)	186.0 (0.04)	194.5 (0.03)
PLA 90	140.3 (0.08)	142.2 (0.10)			
PCL	229.4 (0.13)	255.6 (0.18)			
PLGA 502H	107.5 (0.13)	107.7 (0.08)	112.0 (0.09)		
PLGA 503H		107.0 (0.12)	106.1 (0.11)		
PLGA 50-75	107.3 (0.08)	98.7 (0.09)			
PLGA 755	122.1 (0.07)				

Os resultados obtidos (tabela 20) demonstram, em termos gerais, ligeiras variações dos diâmetros médios, com excepção do polímero PLA 202H, com o qual se verificou um aumento significativo deste parâmetro com o aumento da razão volumétrica de 0,17 para 0,25. As populações obtidas foram, na sua maioria, unimodais e monodispersas, com excepção dos polímeros PLGA 503H e PCL.

Também a eficácia de encapsulação do quelato parece não ser muito influenciada pela razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa. Como se observa na figura 45, apenas com nanosferas de PLGA 502H e PLGA 503H se verificou uma influência clara deste parâmetro quer na eficácia de encapsulação quer no teor de quelato encapsulado (figura 46). O aumento da razão volumétrica de 0,25 para 0,33 na produção de nanosferas de PLGA 503H conduziu a um decréscimo nítido de ambos. Pelo contrário, o comportamento do PLGA 502H face ao aumento da razão volumétrica foi inverso. O aumento desta razão de 0,17 para 0,25 permitiu aumentar a eficácia de encapsulação média de 7% para 20%, mantendo-se com o aumento da razão para 0,33. Este comportamento depende do binómio molécula-polímero (Mandal, 1998).

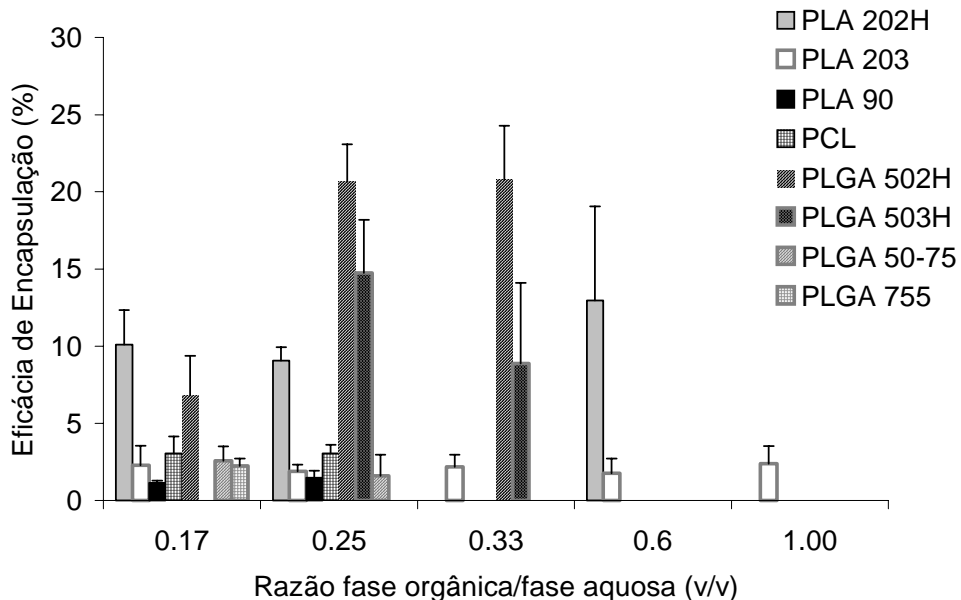


Figura 45. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) em nanosferas produzidas pelo método inicial com diferentes polímeros (10 mg/ml) de poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-*co*-glicólico) e poli(ϵ -caprolactona). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

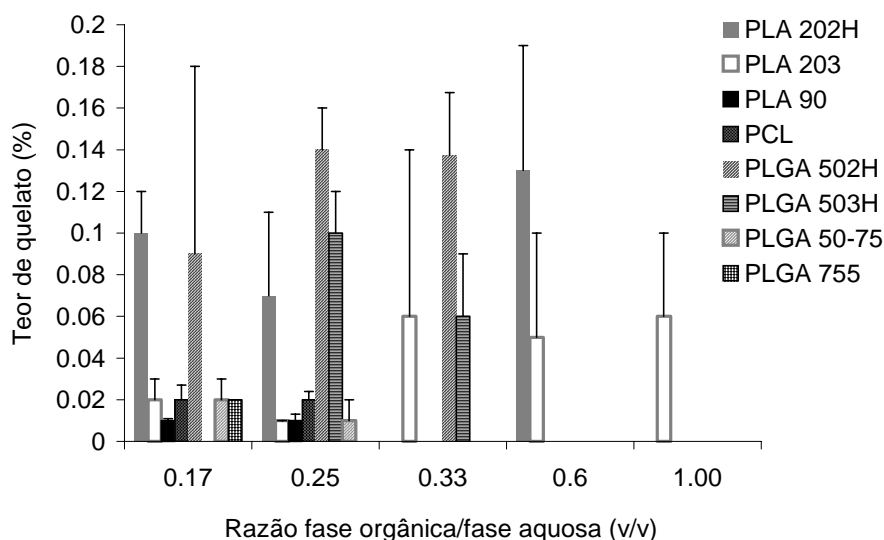


Figura 46. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa no teor (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) encapsulado em nanosferas produzidas pelo método inicial com diferentes polímeros (10 mg/ml) de poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-*co*-glicólico) e poli(ϵ -caprolactona). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

O teor de quelato recuperado foi, em geral, superior a 40%. Apenas com os polímeros PLGA 502H e PLA 203 se verificaram variações significativas deste parâmetro por influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa.

A produção de nanosferas de PLA 203 numa razão volumétrica de 0,33 e de PLGA 502H (0,17) conduziram às menores perdas de quelato, recuperando-se 76,3% e 77,2%, respectivamente.

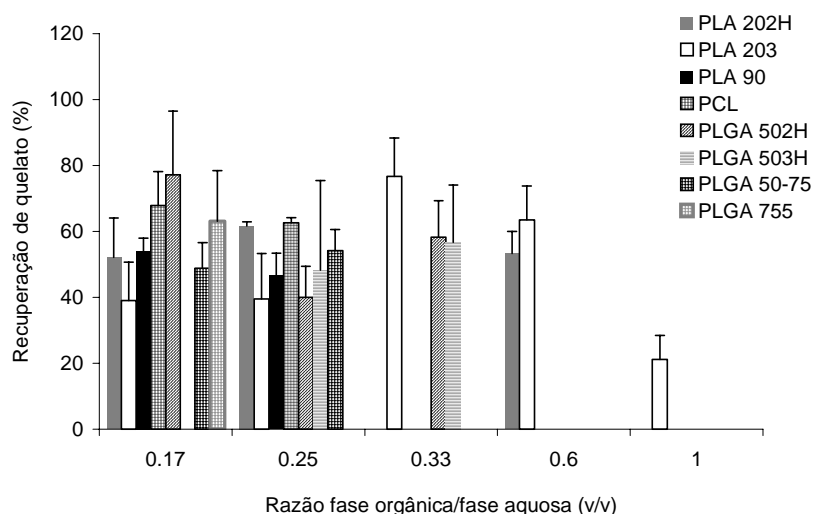


Figura 47. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) na suspensão final de nanosferas produzidas pelo método inicial com diferentes polímeros (10 mg/ml) de poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-*co*-glicólico) e poli(ϵ -caprolactona). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Os resultados obtidos permitiram-nos retirar alguns indícios relativos às estratégias mais adequadas à encapsulação de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) em nanosferas de PLGA por deslocação de solvente. Os poliésteres de baixo peso molecular cujos grupos carboxilo terminais se encontram livres, nomeadamente o PLGA 502H (PM 6000), parecem ser os mais adequados. No entanto, a eficácia de encapsulação mais elevada não ultrapassou 20%, verificando-se simultaneamente a perda elevada de quelato, o que limita a eficácia do processo.

A encapsulação deste quelato parece depender não só das condições de produção mas principalmente das interacções moleculares com o polímero. Neste contexto, as ligações de hidrogénio e interacções polares poderão ter um papel crucial na encapsulação deste quelato em PLGA, como tem sido defendido por outros autores (Johansen *et al.*, 1998 e 1999) na encapsulação de peptídeos e proteínas.

B. Produção de nanosferas pelo método inicial modificado

Com o objectivo de otimizar a encapsulação de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) tornando o processo mais eficaz e com menores perdas de quelato, a produção de nanosferas por deslocação de solvente foi efectuada alterando o modo de preparação da fase orgânica. Por este método, designado de método inicial modificado, a solução de quelato foi adicionada ao polímero no estado seco contrariamente à sua adição ao polímero em solução orgânica, conforme efectuado pelo método inicial. Esta alteração visou promover um contacto melhor entre o quelato e o polímero, diminuindo a quantidade de quelato perdida, eventualmente por precipitação na fase acetónica.

A optimização do processo recorrendo ao método inicial modificado incidiu no estudo da *i)* razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa, *ii)* concentração de polímero na fase orgânica, *iii)* na utilização simultânea de dois polímeros de peso molecular díspar e *iv)* na adição do lípido DOTAP à fase orgânica.

1. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa

Como se observa na tabela 21, a distribuição granulométrica não parece ser influenciada pelo método de preparação da fase orgânica nem pela variação da razão

volumétrica entre as fases orgânica e aquosa. No entanto, o teor de quelato encapsulado foi mais eficaz pelo método inicial modificado, o que é confirmado pelo facto de que, independentemente da razão volumétrica utilizada, o método inicial modificado ter conduzido sempre à obtenção de eficácias de encapsulação mais elevadas (figura 48).

Tabela 20. Características granulométricas e teor de quelato encapsulado (%) em nanosferas preparadas pelos métodos inicial e inicial modificado com PLGA 502H (10 mg/ml) recorrendo a razões volumétricas crescentes entre as fases orgânica e aquosa. A tabela indica os diâmetros médios obtidos (nm) e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

<i>Razão f. orgânica/f. aquosa (v/v)</i>	Método inicial		Método inicial modificado	
	<i>Diâmetro médio (nm)/IP</i>	<i>Teor de quelato (%)</i>	<i>Diâmetro médio (nm)/IP</i>	<i>Teor de quelato (%)</i>
0,17	107,5 (0,13)	0,09	109,2 (0,1)	0,363
0,25	107,7 (0,08)	0,14	111,1 (0,07)	0,216
0,33	112 (0,09)	0,14	109,7 (0,08)	0,273

Com o método inicial modificado conseguiu-se uma eficácia de encapsulação máxima de 36,3%, enquanto que com o método inicial só se conseguiu encapsular 20,7% de quelato. Este resultado leva-nos a colocar a hipótese de que a preparação da fase orgânica pelo método inicial modificado permite um contacto melhor entre o polímero e o fármaco, promovendo uma maior interacção entre ambos. Embora esta hipótese não tenha sido subsequentemente explorada, o facto desta modificação conduzir inevitavelmente à presença de uma concentração de quelato muito mais elevada na solução polimérica, poderá estar na origem desta melhoria de resultados. Uma vez que ambos os métodos de encapsulação foram efectuados sensivelmente à mesma temperatura ambiente, a probabilidade de ocorrerem interacções moleculares entre ambos é função directa das concentrações presentes (Martin, 1993).

Ao contrário do método inicial, a eficácia de encapsulação com o método inicial modificado é também mais eficaz recorrendo à menor razão volumétrica (0,17), com a qual se obteve o resultado mais elevado (36,3%), apesar da perda de aproximadamente 55% de quelato durante o processo de encapsulação (figura 49). O resultado obtido com esta razão indicia claramente o potencial deste polímero na encapsulação do quelato, uma vez que embora sendo a razão volumétrica com a qual se verificou uma maior perda de quelato é também aquela com a qual se obteve a maior eficácia de encapsulação.

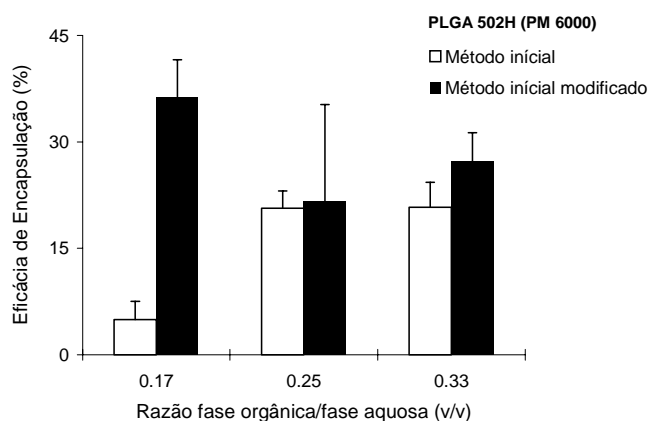


Figura 48. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de poli(ácido láctico-*co*-glicólico) 502H (PM 6000), preparadas pelo método de deslocação de solvente com ou sem alteração do método de adição dos componentes que constituíram a fase orgânica. A solução etanólica de quelato foi adicionada à solução acetónica de polímero (método inicial) ou ao polímero no estado seco (método inicial modificado).

Em ambos os métodos verificou-se um acréscimo da recuperação de quelato com o aumento da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa. No entanto, quando se recorreu à razão de 0,17 verificou-se uma recuperação de quelato muito mais eficaz com o método inicial modificado (44,6%) face ao método inicial (22,8%). Esta diferença diminuiu progressivamente com o aumento da razão volumétrica, igualando-se praticamente com a razão volumétrica 0,33, sendo de 58,3% com o método inicial e 56,8% com o método inicial modificado.

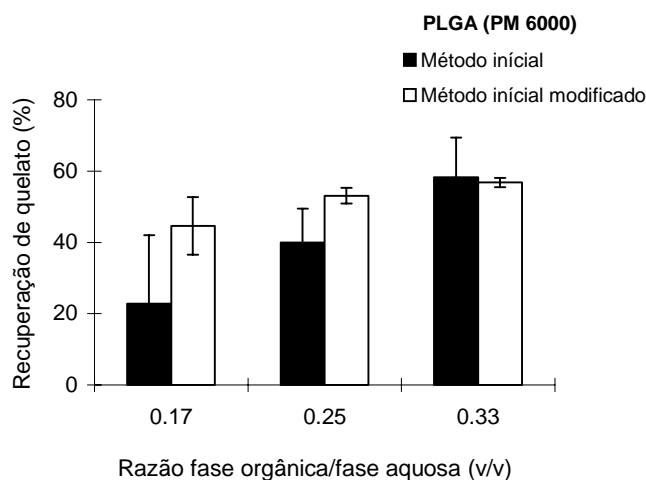


Figura 49. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) em nanosferas de poli(ácido láctico-*co*-glicólico) 502H (PM 6000), preparadas pelo método de deslocação de solvente com ou sem alteração do método de adição dos componentes que constituíram a fase orgânica. A solução etanólica de quelato foi adicionada à solução acetónica de polímero (método inicial) ou ao polímero no estado seco (método inicial modificado).

2. Influência da concentração de polímero na fase orgânica

O aumento da concentração de PLGA 502H na fase orgânica de 10 mg/ml para 15 mg/ml resultou na diminuição da eficácia de encapsulação média de quelato de 36,3% para 20,9%, o que poderá resultar do aumento da viscosidade dessa fase (figura 50). Este aumento de viscosidade poderá diminuir a liberdade conformacional das cadeias poliméricas, limitando a interação quelato-polímero.

O aumento de viscosidade poderá também estar na origem do aumento de diâmetro médio observado nas populações obtidas com maior concentração de polímero (tabela 22) (Bodmeier *et al.*, 1998; Leroux *et al.*, 1995).

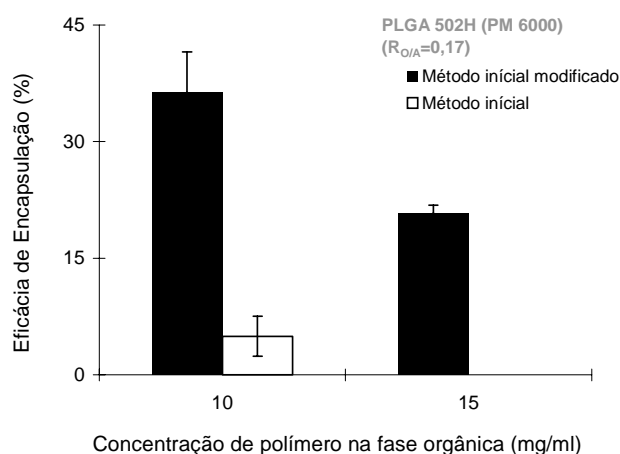


Figura 50. Influência da concentração de polímero na fase orgânica na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-bismorfolinoetilamida) em nanosferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) 502H (PM 6000), preparadas pelo método de deslocação de solvente com ou sem alteração do método de adição dos componentes que constituíram a fase orgânica. A solução etanólica de quelato foi adicionada à solução acetônica de polímero (método inicial) ou ao polímero no estado seco (método inicial modificado).

Tabela 22. Características granulométricas e teor de quelato encapsulado (%) em nanosferas preparadas pelos métodos inicial e inicial modificado com 10 mg/ml e 15 mg/ml de PLGA 502H recorrendo a uma razão volumétrica de 0,17 entre as fases orgânica e aquosa. A tabela indica os diâmetros médios obtidos (nm) e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

Concentração de PLGA 502H (mg/ml)	Método inicial		Método inicial modificado	
	Diâmetro médio (nm)/IP	Teor de quelato (%)	Diâmetro médio (nm)/IP	Teor de quelato (%)
10	107,5 (0,13)	0,09	109,2 (0,1)	0,363
15	Nd	Nd	131,9 (0,09)	0,209

Verificou-se que a produção de nanosferas com 10 mg/ml de PLGA 502H conduz a uma encapsulação consideravelmente mais eficaz de quelato (figura 50).

Embora com esta concentração de polímero, o método inicial modificado tenha permitido uma maior recuperação de quelato (44,6%) com menor variabilidade face ao método inicial (22,8%), o aumento da concentração para 15 mg/ml não conduziu a quaisquer variações significativas, tendo-se recuperado 42,6% de quelato (figura 51).

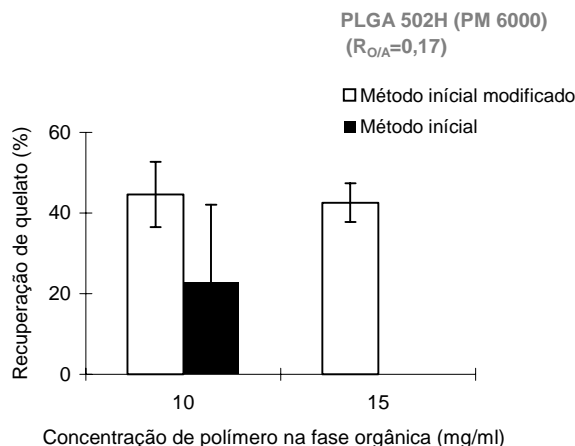


Figura 51. Influência da razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa na recuperação (%) de Gd(DTPA-bismorfolinoetilamida) em nanosferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) 502H (PM 6000), preparadas pelo método de deslocamento de solvente com ou sem alteração do método de adição dos componentes que constituíram a fase orgânica. A solução etanólica de quelato foi adicionada à solução acetônica de polímero (método inicial) ou ao polímero no estado seco (método inicial modificado).

3. Influência da utilização conjunta de polímeros de peso molecular díspar

A utilização conjunta de dois polímeros de peso molecular muito diferente condicionou diferencialmente a eficácia de encapsulação do quelato em nanosferas de PLGA. Como se observa na figura 52, a utilização conjunta de PLGA de baixo peso molecular (PM 6000) e PLGA de elevado peso molecular (PM 63600 ou PM 50-75000) aumentou significativamente o teor de quelato recuperado na suspensão final de nanosferas. Pensa-se que este aumento de recuperação é conseguido devido ao efeito sinérgico dos dois polímeros, aumentando a velocidade de precipitação dos polímeros, diminuindo assim o contacto do quelato com a fase aquosa externa, na qual precipita.

A produção de nanosferas de PLGA 502H (PM 6000) conduziu a uma perda elevada de quelato, recuperando-se apenas 44,6%. A utilização simultânea de PLGA 50-75 (PM 50-75000) diminuiu significativamente a perda de quelato, recuperando-se, em média, 79,5% do quelato adicionado.

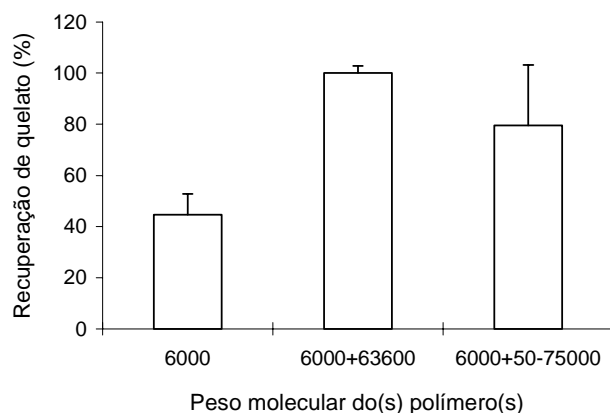


Figura 52. Influência da utilização conjunta de dois poli(ácido láctico-*co*-glicólico) de peso molecular díspar na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) na suspensão final de nanosferas de poli(ácido láctico-*co*-glicólico) 502H (PM 6000), preparadas pelo método de deslocação de solvente com alteração do método de adição dos componentes que constituíram a fase orgânica. A solução etanólica de quelato foi adicionada ao polímero no estado seco (método inicial modificado).

Embora a utilização conjunta destes dois polímeros tenha resultado num efeito positivo ao aumentar o teor de quelato disponível para encapsulação, tal não se traduziu num aumento da sua eficácia. Como se observa na figura 53, enquanto que com PLGA 502H (PM 6000) isolado se conseguiu encapsular 36,3% do quelato adicionado, a utilização simultânea de PLGA 50-75 (PM 50-75000) diminuiu essa eficácia para 24,1%. Considerando que o factor dominante na encapsulação deste quelato em nanosferas de PLGA são as interações moleculares que se desenvolvem entre os grupos amina terciários do anel morfólico e o anião carboxilato do polímero, a substituição de metade da quantidade de PLGA 502H por um polímero com grupos terminais esterificados conduziria logicamente aos resultados aqui apresentados, sobrepondo-se ao factor geralmente considerado dominante, a velocidade de precipitação do polímero (Niwa *et al.*, 1994). A larga distribuição de pesos moleculares do PLGA 50-75 também poderá ter contribuído neste sentido.

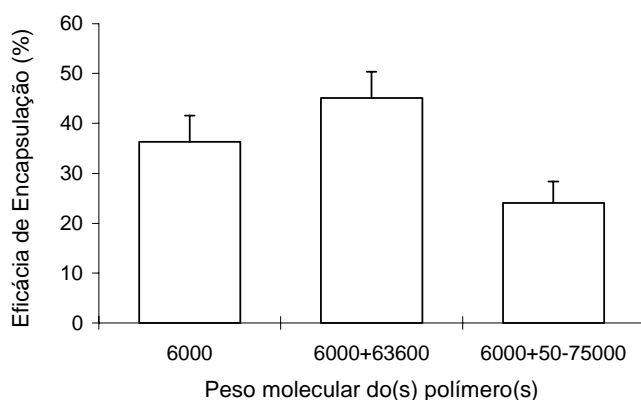


Figura 53. Influência da utilização conjunta de dois poli(ácido láctico-*co*-glicólico) de peso molecular díspar na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) em nanosferas de poli(ácido láctico-*co*-glicólico) 502H (PM 6000), preparadas pelo método de deslocação de solvente com alteração do método de adição dos componentes que constituíram a fase orgânica. A solução etanólica de quelato foi adicionada ao polímero no estado seco (método inicial modificado).

No entanto, este comportamento parece estar dependente não só do peso molecular do polímero suplementar como também de outras características. De facto, a utilização conjunta de PLGA 502H (PM 6000) com PLGA 755 (PM 63600) permitiu produzir nanosferas com Gd(DTPA-*bis*morfolinoetilamida) sem quaisquer perdas de quelato, pelo que todo o teor adicionado esteve disponível durante o processo de encapsulação, resultando num aumento da eficácia para 45,1%, cerca de 9% superior à obtida com o PLGA 502H isolado (36,3%). Os teores de quelato encapsulado estão indicados na tabela 23.

Tabela 23. Características granulométricas e teor de quelato encapsulado (%) em nanosferas preparadas pelo método inicial modificado com PLGA 502H (PM 6000) isolado ou associado (1:1, p/p) a PLGA 755 (PM 63600) ou PLGA 50-75 (PM 50-75000) recorrendo à razão volumétrica de 0,17 entre as fases orgânica e aquosa. A concentração de polímero(s) utilizada foi de 10 mg/ml. A tabela indica os diâmetros médios obtidos (nm) e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p).

<i>Peso molecular</i>	<i>Diâmetro médio (nm)/IP</i>	<i>Teor de quelato (%)</i>
6000 (PLGA 502H)	109,2 (0,1)	0,363
6000 (PLGA 502H) + 63600 (PLGA 755)	129 (0,1)	0,451
6000 (PLGA 502H) + 50-75000 (PLGA 50-75)	130 (0,08)	0,241

A observação desta tabela permite-nos ainda verificar que a utilização simultânea de PLGA 502H com qualquer um dos dois polímeros de elevado peso molecular resultou no aumento do diâmetro médio das nanosferas, dado o aumento de viscosidade da fase orgânica. O índice de polidispersão não sofreu alterações significativas.

4. Influência da adição do lípido DOTAP à fase orgânica

Têm sido várias as estratégias utilizadas para alcançar uma encapsulação significativa de moléculas hidrófilas em nanosferas de PLGA. O aumento da hidrofobicidade da molécula tem sido explorada com o objectivo de alterar a sua partição para a fase orgânica. A complexação de rádio(III) com hidroxipropil- β -ciclodextrina (Sinisterra *et al.*, 1999), a neutralização da carga com aditivos de carga contrária (Nakada *et al.*, 1996) e a modificação do pH da fase aquosa (Paul *et al.*, 1997; Allémann *et al.*, 1993a) constituem alguns exemplos.

A formação de pares iónicos tem sido pouco explorada. Evidências experimentais têm sugerido que a formação de pares iónicos aumenta efectivamente a lipofilicidade de moléculas carregadas, quer *in vitro*, quer *in vivo* (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1997a). O conceito tem sido aplicado a peptídeos de modo a obter fármacos mais lipofílicos que são estabilizados por interacções electrostáticas (Falk *et al.*, 1997; Niwa *et al.*, 1994).

A adição do lípido policationico DOTAP ao polímero seco (método inicial modificado) não favoreceu a encapsulação de quelato, provocando um ligeiro decréscimo da eficácia de encapsulação de 36,3% para 28,5%, conforme se observa na figura 54, o que se traduziu por uma diminuição do teor de quelato encapsulado de 0,363% para 0,285% (tabela XXIII). A adição deste composto à fase orgânica pretendia avaliar a possibilidade de formação de um par iónico entre as suas cargas positivas e a carga negativa terminal do PLGA 502H, aumentando a hidrofobicidade deste. No entanto, a razão DOTAP/fármaco/polímero não foi avaliada, tendo sido apenas utilizada uma combinação.

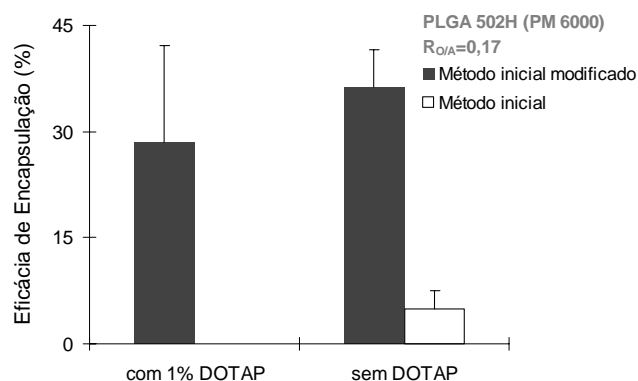


Figura 54. Influência da adição de 1% (p/p) de DOTAP, um lípido policationico, à fase orgânica (método inicial modificado) na eficácia de encapsulação (%) de Gd(DTPA-bis(morfolino)etilamida) na suspensão final de nanosferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) 502H (10 mg/ml), preparadas pelo método inicial modificado, em que a solução etanólica de quelato foi adicionada ao polímero no estado seco. No método inicial, a solução de quelato foi adicionada à solução orgânica de polímero. As nanosferas foram preparadas com uma razão volumétrica de 0,17 entre as fases orgânica e aquosa.

Esta adição, embora não tenha aumentado a polidispersão das populações de nanosferas obtidas, aumentou significativamente o seu diâmetro médio (tabela 24).

Tabela 24. Influência da adição de 1% (p/p) de DOTAP à fase orgânica (método inicial modificado) nas características granulométricas e no teor de quelato encapsulado (%) em nanosferas preparadas pelos métodos inicial e inicial modificado com PLGA 502H (10 mg/ml) recorrendo à razão volumétrica de 0,17 entre as fases orgânica e aquosa. A tabela indica os diâmetros médios obtidos (nm) e os respectivos índices de polidispersão (sob parêntesis). O teor de quelato adicionado à fase orgânica foi de 1% (p/p). Nd, não determinado.

	Método inicial		Método inicial modificado	
	<i>Diâmetro médio</i>	<i>Teor de quelato</i>	<i>Diâmetro médio</i>	<i>Teor de quelato</i>
	<i>(nm)/IP</i>	<i>(%)</i>	<i>(nm)/IP</i>	<i>(%)</i>
1% (p/p) DOTAP	Nd	Nd	153,2 (0,1)	0,285
Sem DOTAP	107,5 (0,13)	0,09	109,2 (0,1)	0,363

No entanto, esta adição parece ser benéfica no processo de encapsulação do quelato, ao prevenir a sua perda durante a deslocação de solvente. A presença de DOTAP permitiu aumentar o teor de quelato recuperado de 44,6% para 54,2%. Este parâmetro não foi avaliado nas formulações preparadas pelo método inicial, impossibilitando outras interpretações. Por outro lado, embora a utilização de DOTAP não tenha resultado numa encapsulação mais eficaz deste quelato, a sua função teria que ser avaliada por estudos mais extensos e otimizados.

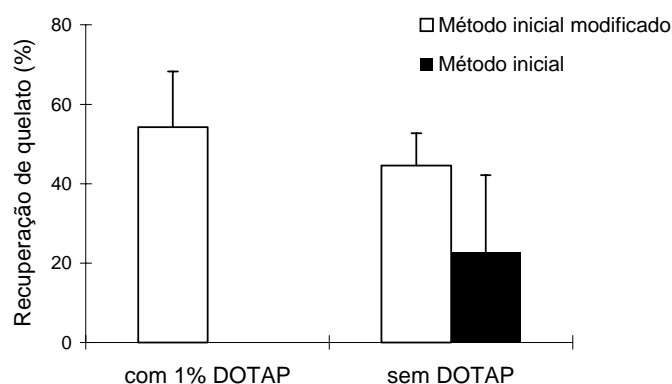


Figura 55. Influência da adição de 1% (p/p) de DOTAP, um lípido policatiônico, à fase orgânica (método inicial modificado) na recuperação (%) de Gd(DTPA-*bismorfolinoetilamida*) na suspensão final de nanosferas de poli(ácido láctico-*co*-glicólico) 502H (10 mg/ml), preparadas pelo método de deslocação de solvente em que a solução etanólica de quelato foi adicionada ao polímero no estado seco (método inicial modificado). No método inicial a solução de quelato foi adicionada à solução orgânica de polímero. As nanosferas foram preparadas com uma razão volumétrica de 0,17 entre as fases orgânica e aquosa.

Concluindo, a encapsulação de Gd-DTPA-bismorfolinoetilamida em nanopartículas de poliésteres é beneficiada pela presença de polímeros de baixo peso molecular com grupos carboxilo terminais livres em associação com polímeros de elevado peso molecular. Esta associação permitiu obter formulações com teores de Gd(III) razoáveis, eliminando simultaneamente as elevadas perdas de quelato registadas com outras formulações de poliésteres. Com base nos resultados obtidos, foi seleccionada uma formulação para análise relaxométrica (Capítulo 4), permitindo avaliar o seu potencial como meio de contraste em IRM.

Capítulo 4

Avaliação do potencial das nanopartículas poliméricas coloidais desenvolvidas como agentes de contraste para IRM:

Estudos de relaxometria

4.1. Introdução

O desenvolvimento de meios de contraste simultaneamente mais eficazes, menos tóxicos, biocompatíveis e passíveis de aprovação para uso clínico pelas entidades reguladoras é um objectivo de extrema importância em Imageologia por Ressonância Magnética (IRM) (Tilcock, 1999; Caravan *et al.*, 1999). Nos últimos anos foram publicados vários trabalhos nesta área, baseados em quelatos de Gd(III) (Sherry *et al.*, 1988; Caravan *et al.*, 1999), nitróxidos (Winalski *et al.*, 2002), quelatos de disprósio (Fossheim *et al.*, 1999), Gd(III) associado a perfluorcarbonatos (Anderson *et al.*, 2000), de entre outros.

As estratégias mais utilizadas com quelatos de Gd(III) incluem nanopartículas não poliméricas (Morel *et al.*, 1998; Gløgaard *et al.*, 2003), nanopartículas vectorizadas (Anderson *et al.*, 2000), lipossomas convencionais (Schwendener *et al.*, 1989; Gløgaard *et al.*, 2002; Fossheim, Fahlvik *et al.*, 1999), lipossomas sensíveis ao pH (Løkling *et al.*, 2001), macromoléculas de síntese (Elst *et al.*, 2003), proteínas (Sherry *et al.*, 1988; Aime, Frullano *et al.*, 2002) e micropartículas de amido (Fossheim *et al.*, 1999).

A sua importância advém do facto deste tipo de sistemas, tais como nanopartículas poliméricas e lipossomas, serem não só passíveis de vectorização para tecidos específicos ou para determinadas populações celulares, como também potenciais amplificadores da relaxividade do quelato encapsulado (Aime, Cabella *et al.*, 2002). Esta dualidade é extremamente importante para o desenvolvimento de novos meios de contraste com efeitos secundários reduzidos e características imageológicas superiores àqueles utilizados actualmente na prática clínica (Shellock e Kanal., 1999).

Em IRM o efeito do meio de contraste não é observado directamente, contrariamente ao que acontece noutras modalidades de imagiologia médica. Neste caso, é o efeito que o meio de contraste exerce na relaxação dos prótons de moléculas de água circundantes que é observado. Este efeito é denominado por relaxividade e indicia a eficácia do meio de contraste como potencial agente em IRM. A relaxividade é geralmente medida *in vitro* utilizando forças de campo magnético pertinentes em IRM clínico, *i.e.*, 10-100 MHz e representa o aumento de relaxação dos prótons da água produzida por 1 mM de quelato paramagnético.

Neste capítulo estão sumariados os resultados preliminares obtidos *in vitro* referentes à relaxividade de duas das formulações desenvolvidas com Gd-DTPA-*bismorfolinoetilamida*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material

As suspensões aquosas de nanosferas foram preparadas conforme descrito no Capítulo II. Foram avaliadas duas formulações de nanosferas com Gd-DTPA-bismorfolinoetilamida, nomeadamente de PLGA 502H (0.17 v/v) e [PLGA 502H+PLGA 755 (0.17 v/v)]. A água utilizada era de grau ultrapuro (Elgastat).

4.2.2. Métodos

Os tempos de relaxação longitudinal ($T1$) foram obtidos a 20°C por decaimento livre induzido (FID) utilizando o espectrómetro de RMN MS4 (Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Eslovénia). A força de campo magnético utilizada foi de 0.21T, correspondendo a uma frequência de Larmor protónica de 9 MHz.

As suspensões aquosas de nanosferas foram utilizadas após preparação sem separação do quelato livre, o que permitiu obter $R_{I_{obs}}$. O quelato livre foi separado do quelato encapsulado por ultracentrifugação (146000×g/4°C/1h). O sobrenadante obtido foi filtrado (0.22 µm) para remover eventuais resíduos de nanosferas. As fracções de quelato livre $f(L)$ e encapsulado $f(e)$ foram obtidas por doseamento²⁶ do teor de GdL presente na suspensão total de nanosferas ($Gd(T)$) e nas águas de lavagem ($Gd(L)$), sendo que $f(e)=1-f(L)$ e $f(L)=[Gd(L)]/[Gd(T)]$.

A velocidade de relaxação longitudinal do quelato encapsulado ($RI(e)$) foi obtida por subtração da velocidade de relaxação do quelato livre ($RI(L)$) à velocidade de relaxação observada com a suspensão de nanosferas (RI_{obs}), de acordo com a relação:

$$RI_{obs} = RI(e) \times f(e) + RI(L) \times f(L)$$

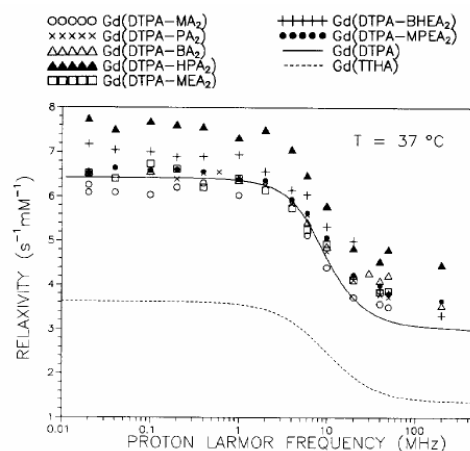
A relaxividade do quelato encapsulado $rl(e)$ foi obtida através da relação $RI(e)=GdL(e) \times rl(e)$.

²⁶ O doseamento de Gd(III) foi efectuado por Espectroscopia de Absorção Atómica conforme descrito no Capítulo II (secção 2.2.3.C1).

4.3. Resultados e Discussão

Encontram-se publicados diversos estudos de relaxividade dos quelatos de Gd(III) baseados no DTPA (Gerald *et al.*, 1995; Adzaml *et al.*, 1999; Bligh *et al.*, 1995), através dos quais se têm definido certas tendências. A relaxividade deste tipo de quelatos na presença de campos magnéticos elevados (10-50 MHz) é principalmente controlada pelo tempo de correlação rotacional τ_R , o qual é directamente proporcional ao volume molecular, tendo uma contribuição de cerca de 50% do mecanismo da esfera externa. Perante campos magnéticos baixos a relaxividade é significativamente controlada por τ_S , cujo valor depende da simetria em torno do ião metálico e da natureza química do grupo de coordenação (Sherry *et al.*, 1989; Caravan *et al.*, 1999). No caso dos derivados *bisamídicos* e especificamente do Gd-DTPA-*bismorfolinoetilamida*, com forças de campo magnético inferiores a 10 MHz e a 37°C, os valores de relaxividade do quelato livre não diferem dos do protótipo Gd-DTPA (fig. 56).

Figura 56. Perfis de relaxividade em campo variável para vários Gd-DTPA-*bisamidas* a 37°C comparados com os de Gd-DTPA e Gd-TTHA. O quelato Gd-DTPA-*bismorfolinoetilamida* está representado por Gd(DTPA-MPEA₂). Adaptado de Gerald *et al.*, 1995.



Na presença de campos magnéticos baixos, a contribuição paramagnética do quelato para a relaxação protónica é limitada simultaneamente pela rápida relaxação electrónica e pela troca lenta da molécula de água presente na esfera de coordenação interna do quelato (Gerald *et al.*, 1995). Quando submetido a uma força de campo de 10 MHz e a 37°C, o quelato apresenta uma relaxividade de $5.2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, a qual decresce com o aumento da força de campo.

A estratégia usual para melhorar a relaxividade dos quelatos de Gd(III) perante forças de campo usuais em IRM (10 a 100 MHz) consiste em aumentar a contribuição da esfera interna. Este objectivo é geralmente alcançado pela associação do quelato a um vector

macromolecular ou particular, resultando num alongamento de τ_R . Perante forças de campo inferiores a 1 MHz, τ_S é muito menor que τ_R . À medida que a força do campo aumenta, τ_S aumenta embora se mantenha inferior a τ_R . Como consequência, τ_c e, logo r_1 , aumentam com o aumento da força do campo. Assim, r_1 continuará a aumentar até que τ_S seja superior a τ_R . Este irá então modular τ_c . O resultado típico é um pico em r_1 que ocorre com forças de campo moderadas cuja amplitude, comparativamente ao baixo valor de campo, depende de τ_R (fig. 57).

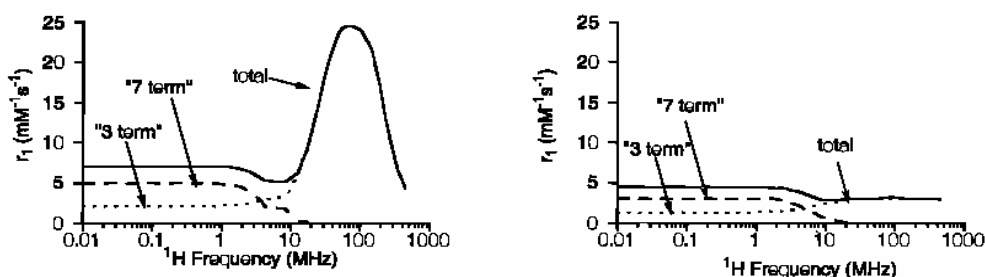


Figura 57. Relaxividades da esfera interna simuladas para $\tau_R=1$ ns (esquerda) e $\tau_R=0.1$ ns (direita). *Adaptado de Caravan et al., 1999.*

O aumento de τ_R pode ser alcançado através da redução do movimento molecular do quelato (Caravan *et al.*, 1999). Este desaceleramento pode ser conseguido através da formação de conjugados covalentes ou não covalentes entre o quelato paramagnético e vectores de movimento lento, tais como proteínas (Aime *et al.*, 1997; Aime *et al.*, 2002), polissacáridos (Helbich *et al.*, 2000), dendrímeros (Winalski *et al.*, 2002), lipossomas (Gløggård *et al.*, 2002; Løkling *et al.*, 2001), ciclodextrinas (Aime *et al.*, 2002), partículas de colesterol (Gløggård *et al.*, 2003), nanopartículas de lípidos sólidos (Morel *et al.*, 1998), de entre outros.

No caso de meios de contraste nanoparticulares com Gd(III), o aumento da relaxação pode ser descrito pela soma das contribuições da esfera interna (R_1^{EI}), esfera externa (R_1^{EE}), esfera secundária (R_1^{ES}) e contribuição diamagnética da matriz polimérica (R_1^M), de acordo com a equação [4-1]:

$$R_1^{obs} = R_1^{EI} + R_1^{EE} + R_1^{ES} + R_1^M \quad [4-1]$$

em que R_1^{obs} representa o valor da velocidade de relaxação T_1 (s^{-1}) medido experimentalmente (Gløggård *et al.*, 2002). Quando uma ou mais moléculas de água se encontram coordenadas como o ião Gd(III), como no caso do quelato Gd-DTPA-bismorfolinoetilamida ($q=1$), o factor mais significativo para a velocidade de relaxação é originado pela contribuição da esfera interna (equação [4-2]):

$$R_1^{EI} = \frac{q \times C}{55.6} \times \frac{1}{T_{1M} + \tau_M} \quad [4-2]$$

sendo q , ou número de hidratação, o número de moléculas de água coordenadas com a esfera interna, C a concentração molar de Gd(III) presente, T_{1M} o tempo de relaxação longitudinal dos prótons das moléculas de água presentes na esfera interna, e τ_{1M} o tempo de residência dos prótons na esfera interna. Conforme demonstrado pela equação [4-2], o tempo de residência da(s) molécula(s) de água na esfera interna tem de ser muito reduzido para que esta possa produzir um aumento da velocidade de relaxação ($1/T_{1M}$) das moléculas de água do meio circundante, *i.e.*, a velocidade de troca de moléculas de água tem que ser rápida o suficiente para que $\tau_M \ll T_{1M}$ (Caravan *et al.*, 1999).

A velocidade de relaxação da molécula de água da esfera interna pode ser calculada através da teoria de Solomon-Bloembergen-Morgan, simplisticamente traduzida pela seguinte equação (Caravan *et al.*, 1999):

$$\frac{1}{T_{1M}} \propto \left[\frac{3\tau_{C1}}{1 + \omega_H^2 \tau_{C1}^2} + \frac{7\tau_{C2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{C2}^2} \right] \quad [4-3]$$

em que ω_H e ω_S são as frequências de Larmor protónica e electrónica, respectivamente; o termo τ_{Ci} ($i=1, 2$) traduz os tempos de correlação da modulação de acoplamento dipolar electrão-protão e é constituído por três contribuições aditivas:

$$\frac{1}{\tau_{Ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_{Si}} \quad [4-4]$$

em que τ_R é o tempo de correlação rotacional do quelato de Gd(III) e τ_S é o tempo de relaxação electrónica do ião gadolínio. A incorporação do quelato de Gd(III) em nanopartículas poliméricas poderá permitir aumentar τ_R através da redução da rotação

molecular do vector. Este efeito poderá assim originar um aumento da velocidade de relaxação, desde que as condições de troca rápida ($\tau_M \ll T_{1M}$) sejam mantidas (Parker e Williams, 1996; Aime *et al.*, 2002).

No entanto, no caso de meios de contraste nanoparticulares, não só o tempo de correlação rotacional é importante para que se obtenha uma relaxividade elevada. A natureza do vector associado ao quelato de Gd(III) poderá ter um papel importante na amplificação da relaxividade. A presença de um vector com elevada área de superfície hidratada poderá contribuir significativamente para esse aumento. De facto, a presença de grupos funcionais capazes de estabelecer ligações de hidrogénio com moléculas de água do meio circundante, permitindo uma troca dinâmica com o meio aquoso poderá actuar como amplificador da relaxividade do meio de contraste. Além desta hipótese, a existência de canais na estrutura do vector (diâmetro de 3-4 Å) que permitam a troca de moléculas de água entre o meio circundante e a esfera interna do quelato poderá amplificar ainda mais a relaxividade (Aime *et al.*, 2002). Na sua globalidade, estes 3 factores constituem a base para a utilização de nanopartículas poliméricas coloidais como meios de contraste em Imagiologia por Ressonância magnética.

Na tabela 25 estão descritos os resultados referentes à formulação de PLGA 502H (0.17 v/v). Cada linha da tabela representa uma diluição proveniente do mesmo lote de nanopartículas preparado por *pooling* de 5 lotes preparados em série. Deste lote foram retiradas 3 alíquotas de 1.0 ml para estudo relaxométrico independente. No entanto, estatisticamente os resultados referem-se a uma única amostra.

Tabela 25. Resultados relaxométricos referentes à formulação de Gd-DTPA-*bis*morfolinoetilamida encapsulado em nanopartículas de PLGA 502H (0.17 v/v). Diâmetro médio 109.2 nm.

R1 _{obs}	R1(L)	R1(e)	[Gd(T)] (mM)	Gd(L) (mM)	Gd(e) (mM)	r1(e) (s ⁻¹ mM ⁻¹)
2.65	1.94	3.79	0.12	0.08	0.0477	79.5*
1.30	1.05	1.71	0.06	0.04	0.0238	71.7*
0.89	0.71	1.19	0.04	0.03	0.0159	75.1*
0.87	0.70	1.16	0.03	0.02	0.0060	194.1*
1.66	0.87	12.02	0.06	0.06	0.0044	2712.1*
1.35	0.65	10.57	0.04	0.04	0.0030	3578.0*
0.96	0.81	2.99	0.03	0.03	0.0011	2696.5*

*f(e)=0.38; *f(e)=0.07; n=1.

Os resultados preliminares obtidos com esta formulação são muito variáveis. O facto da concentração de quelato encapsulado ser muito reduzida (1.1-47.7 nM) poderá estar na base desta variabilidade conduzindo a valores muito díspares de relaxividade T1. Os valores de relaxividade descritos na tabela 25 não são pois confiáveis, pelo que a validade desta formulação como meio de contraste em IRM carece de futura e ampla avaliação.

A tabela 26 tem descritos os resultados obtidos com a formulação Gd-DTPA-*bismorfolinoetilamida* encapsulado em nanopartículas de PLGA 502H+PLGA 755 (1:1 m/m; 0.17 v/v). Os valores apresentados foram obtidos conforme descrito para a tabela 25.

Tabela 26. Resultados relaxométricos (20°C, 9 MHz) referentes à formulação de Gd-DTPA-*bismorfolinoetilamida* encapsulado em nanopartículas de PLGA 502H +PLGA 755 (1:1 p/p; 0.17 v/v). Diâmetro médio 129 nm.

R1obs	R1(L)	R1(e)	Gd(T) (mM)	⁽¹⁾ Gd(e) (mM)	r1(e) (s ⁻¹ mM ⁻¹)
2.64±0.14	1.22±0.11	3.96±0.18	0.223	0.116	34.2±1.6
1.95±0.23	0.95±0.04	2.88±0.44	0.148	0.077	37.3±5.7
1.58±0.12	0.81±0.01	2.29±0.24	0.111	0.058	39.6±4.1
1.27±0.05	0.71±0.02	1.69±0.09	0.089	0.046	36.5±2.0
1.13±0.01	0.70±0.05	1.52±0.04	0.074	0.039	39.5±1.2
<i>Média±SD</i>	-	-	-	-	37.1±3.57

⁽¹⁾f(e)=0.52

A encapsulação de quelato em nanopartículas de PLGA 502H/755 aumentou consideravelmente a relaxividade T1 a 20°C face ao quelato livre. Perante uma força de campo de 10 MHz e a 37°C, o quelato livre apresentou uma relaxividade r1 de 5.2 s⁻¹mM⁻¹ (Gerald *et al.*, 1995). No entanto, a sua encapsulação em nanopartículas de PLGA 502H/755 permitiu obter valores de relaxividade 7 vezes superiores (tabela 26).

A separação de quelato não encapsulado por ultracentrifugação tripla e a presença residual de quelato no sobrenadante da última centrifugação²⁷ assegurou que a relaxividade obtida se deve exclusivamente ao quelato associado à matriz polimérica. Esta formulação permitiu obter os resultados preliminares mais promissores.

Conforme apresentado na tabela 26, os valores obtidos são pouco variáveis e o valor de relaxividade médio obtido é substancialmente mais elevado do que o obtido com outros vectores particulares (Fossheim *et al.*, 1999; Morel *et al.*, 1998) e macromoleculares até à data publicados. Na tabela 27 estão sumariados alguns exemplos.

²⁷ Resultados não mostrados.

Tabela 27. Exemplos de formulações de quelatos de Gd(III) com relaxividade T1 melhorada por associação com vectores macromoleculares ou particulares.

Agente de contraste	Vector	Condições	$r1$ ($s^{-1} mM^{-1}$)	Referência
Gd-DOTA (q=1)	Derivado hidrofílico, PM [§] =5.6 kDa	20 MHz, 37°C	24.7	Elst VL <i>et al.</i> (2003)
Gd-DTPA (q=1)	-	1.5T, 20°C	4.76	
(Gd-DO3A) ₃₅	Carboximetil-hidroxietyl-amido, PM [§] =72 kDa	20 MHz, 39°C	14.1	Helbich <i>et al.</i> , 2000
Gd-HHD-DO3A (q=1)**	Lipossomas DMPC/DMPG, Diâmetro [§] =65 nm	20 MHz, 39°C	45	Gløgård <i>et al.</i> , 2002
Gd-DTPA-bismetilamida	Lipossomas DOPE/PA, Diâmetro [§] =121 nm	37°C, 10 MHz	4-6 (dependente de pH)	Løkling <i>et al.</i> , 2001
Gd-DTPA	Micropartículas de amido, Diâmetro [§] =2.4 μ m	37°C, 20 MHz, 0.8% gel de agar	7.2	Fossheim <i>et al.</i> (1999)
Derivado lipofílico de Gd-DTPA/ ¹⁹ F	Nanopartículas vectorizadas (α - α v β 3), Diâmetro [§] =200 nm	¥	12	Anderson <i>et al.</i> , 2000
Gd-HHD-DO3A (q=1)**	Nanopartículas de colesterol, Diâmetro [§] =100 nm	20 MHz, 37°C	11.5-23.8	Gløgård <i>et al.</i> , 2003
Gd-HP-DO3A (q=2)	Apoferitina, Diâmetro=12.5 nm	20 MHz, 20°C	80	Aime <i>et al.</i> , 2002

*Dendrímero à base de pirrolidiniloxil; **Gd-1,4,7-tris(carboximetil)-10-(2-hidroxi-hexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano; § valores médios; ¥ não descrito;

Como consequência da interacção do quelato com o vector coloidal pode-se antecipar um aumento da relaxividade, sendo provavelmente a consequência do aumento de τ_R , da troca rápida de moléculas de água entre a esfera de coordenação e o meio aquoso circundante, ou a uma combinação de ambos os factores. No entanto, os resultados obtidos não permitem testar esta hipótese. A medição de relaxividades com uma única força de campo magnético não é adequada para avaliar amplamente a eficácia de um agente de contraste, nomeadamente se a relaxividade obtida resultar de um único tempo de correlação (Caravan *et al.*, 1999). Conforme demonstrado na equação [4-4], se as medições forem efectuadas numa única força de campo, a contribuição individual de cada frequência de correlação (o recíproco do tempo de correlação) para a frequência total de correlação ($1/\tau_c$) não pode ser desconvoluída. Como tal, não é possível, face ao tipo de resultados obtidos, retirar quaisquer conclusões de âmbito mecanístico e molecular. Os resultados obtidos são no entanto muito promissores para o futuro desenvolvimento de meios de contraste mais eficazes e vectorizáveis para tecidos alvo, uma funcionalidade ainda inexistente com os meios de contraste actualmente disponíveis a nível clínico.

Capítulo 5

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

O desenvolvimento de sistemas coloidais em imageologia de diagnóstico, particularmente lipossomas e nanopartículas, adveio principalmente da necessidade de obter meios de contraste com especificidade tecidual. Embora já esteja comercializada uma formulação de lipossomas para ultrassonografia cardiovascular, a estabilidade lipossômica que a encapsulação de gases requer permanece um problema comum no desenvolvimento farmacêutico de lipossomas para ultrassonografia.

Atendendo à bibliografia disponível, a aplicação de nanopartículas em imageologia de diagnóstico restringe-se à IRM. As formulações estudadas baseiam-se principalmente em partículas de óxido de Fe, revestidas por dextranos, diferindo basicamente nas suas dimensões. Embora os meios de contraste reticulo-endotelial (Endorem®, Sinerem®, Resovist®) permitam aumentar o número de lesões hepáticas detectadas, os resultados obtidos a nível de caracterização lesional ainda estão longe de uma situação óptima, o que também se verifica em imageologia renal e do sistema nervoso, central e periférico.

A maioria dos meios de contraste utilizados em Imageologia por Ressonância Magnética são quelatos paramagnéticos de Gadolínio. Os quelatos hidrossolúveis de Gd utilizados actualmente na prática clínica têm semi-vidas de 1.5h (Shellock e Kanal, 1989). O facto destes meios de contraste apresentarem velocidades elevadas de depuração da circulação sanguínea e dos diversos órgãos restringe o seu uso em estudos de perfusão, de integridade capilar, e do espaço extracelular.

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas coloidais como meios de contraste tem o potencial necessário para ultrapassar estas limitações, ao aumentar o tempo de residência vascular e poder permitir a vectorização do meio de contraste para um órgão ou população tecidual específica. Além destas vantagens, a incorporação do quelato de Gd(III) num vector macromolecular poderá aumentar a velocidade de relaxação devido ao aumento do tempo de correlação rotacional τ_R . Outros vectores coloidais têm sido desenvolvidos nos últimos 15 anos. Os trabalhos incipientes de Kabalka *et al.* (1987 e 1991) com quelatos de Gd(III) em lipossomas demonstraram as potencialidades dos vectores coloidais como meios de contraste.

No entanto, os trabalhos publicados ao nível do desenvolvimento de meios de contraste para IRM com nanopartículas poliméricas tem sido escasso. O trabalho publicado

nesta tese demonstra as potencialidades deste tipo de sistema polimérico como vector de quelatos de Gd(III), indiciando a sua validade como meio de contraste eficaz.

No capítulo 1 encontra-se sumariada a teoria base inerente ao desenvolvimento de meios de contraste para IRM.

No capítulo 2 encontra-se descrito todo o trabalho que conduziu à síntese, identificação e caracterização de 3 quelatos de Gd(III) de hidrofobicidade crescente. Os resultados de análise elementar e de espectroscopia de ressonância magnética nuclear demonstraram a obtenção dos quelatos pretendidos bem como o seu grau de pureza, suficiente para a sua posterior associação com os polímeros de poliésteres seleccionados.

Este trabalho de síntese foi efectuado com base na hipótese de que o aumento da hidrofobicidade destes quelatos promoveria uma interacção hidrofóbica crescente entre estes e os polímeros utilizados. Esta hipótese foi testada no capítulo 3, onde se encontra exposto todo o trabalho de encapsulação dos quelatos de Gd(III) em nanopartículas poliméricas coloidais. Para além dos quelatos de Gd(III) sintetizados, os trabalhos de encapsulação incluíram dois quelatos adicionais.

Os resultados obtidos não nos permitiram validar a hipótese de que o aumento de hidrofobicidade dos quelatos se traduziria em eficácias de encapsulação mais elevadas com os polímeros utilizados. No entanto, os resultados obtidos com o quelato GdDTPA-*bis*estearilamída indiciam alguma potencialidade, a ser explorada com mais atenção.

Os resultados mais promissores desta tese referem-se à encapsulação e relaxividade do quelato GdDTPA-*bis*morfolinoetilamída. De facto, o trabalho efectuado com este quelato e exposto nos capítulos 3 e 4 permite-nos concluir que a sua encapsulação em nanopartículas de poliésteres é beneficiada pela presença de polímeros de baixo peso molecular com grupos carboxilo terminais livres em associação com polímeros de elevado peso molecular. Esta associação permitiu obter formulações com teores de Gd(III) razoáveis, eliminando simultaneamente as elevadas perdas de quelato registadas com outras formulações de poliésteres. Com base nestes resultados foi seleccionada uma formulação para análise relaxométrica (Capítulo 4), o que permitiu avaliar o seu potencial como meio de contraste em IRM.

A eficácia dos meios de contraste de Gd(III), expressa pela sua relaxividade, $r1$, depende da cinética de troca de moléculas de água, da relaxação electrónica, e da rotação molecular, bem como do número de moléculas de água presentes na esfera de coordenação interna do ião Gd(III) (q). Conforme exposto no capítulo 4 desta tese, a

encapsulação de GdDTPA-*bis*morfolinoetilamida em nanopartículas de PLGA 502H/755 aumentou significativamente a relaxividade do quelato a 20°C, constituindo um dado muito promissor para o desenvolvimento de um meio de contraste muito superior aos actualmente existentes.

A relaxividade T1 obtida ($r_1=37.1\pm 3.57 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) poder-se-á dever ao aumento do tempo de correlação rotacional, τ_R . No entanto, o esclarecimento do mecanismo responsável por este aumento não foi efectuado, aguardando futuro desenvolvimento deste trabalho.

Os desenvolvimentos recentes em biologia celular e molecular, em sinergia com o conhecimento crescente dos aspectos físico-químicos e biológicos inerentes à superfície dos vectores, oferecem-nos um vasto leque de oportunidades na concepção de agentes de contraste coloidais. Os resultados apresentados nesta tese, embora incipientes, indiciam que é possível produzir meios de contraste nanoparticulares biodegradáveis para IRM, utilizando sistemas nanoparticulares passíveis de vectorização cito-específica e fácil manipulação.

Bibliografia

- Adler-Moore JP e Proffitt RT (1993) Development, characterization, efficacy and mode of action of AmBisome®, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B, *J Lipos Res* **3**(3), 429-450.
- Adzamli K, Dorshow RB, Hynes MR *et al.* (1997) Characterization of polyethyleneglycol-stabilized, manganese-substituted hydroxylapatite (MnHA-PEG). *Acta Radiol* **38**, Supl. 412, 73-78.
- Adzamli K, Periasamy MP, Spiller M *et al.* (1999) NMRD assessment of Gd-DTPA-bis(methoxyethylamide), (Gd-DTPA-BMEA), a nonionic MRI agent. *Invest Radiol* **34**(6), 410-414.
- Afione SA, Conrad CK e Flotte TR (1995) Gene therapy as drug delivery systems. *Clin Pharmacokinet* **28**(3) 181-189.
- Aime S, Botta M, Crich SG *et al.* (1997) Towards MRI contrast agents of improved efficacy. NMR relaxometric investigations of the binding interaction to HSA of a novel heptadentate macrocyclic triphosphonate Gd(III)-complex. *JBIC* **2**, 470-479.
- Aime S, Cabella C, Colombatto S *et al.* (2002) Insights into the use of paramagnetic Gd(III) complexes in MR-molecular imaging investigations. *J Magn Reson Imag* **16**: 394-406.
- Alexander A, Gmitro A e Unger EC (1996) Gas-filled microbubbles as novel pressure-sensitive contrast agents for magnetic resonance imaging. *Acad Radiol* **3**, S370-S372.
- Alexander A, McCreery TT, Barrette TR *et al.* (1996a) Microbubbles as novel pressure-bioactive formulation of vasoactive intestinal peptide in sterically stabilized liposomes. *Pharm Res* **14**(3), 362-365.
- Alkan-Onyuksel H, Demos SM, Lanza GM *et al.* (1996) Development of inherently echogenic liposomes as an ultrasonic contrast agent. *J Pharm Sci* **85**(5), 486-490.
- Allémann E, Gurny R e Doelker E (1993) Drug-loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm* **39**(5), 173-191.
- Allémann E, Gurny R e Leroux JC. Biodegradable nanoparticles of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, vol. 3, 2^aed., Lieberman HÁ, Rieger MM e Banker GS, eds, Marcel Dekker NY 1998, p163-193.
- Allémann E, Leroux JC, Gurny R e Doelker E (1993a) *In vitro* extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm Res* **10**(12) 1732-1737.
- Allen TM (1994) Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *TiPS* **15**, 215-220.
- Allen TM, Hansen CB, Lopes de Menezes DE (1995) Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Adv Drug Del Rev* **16**, 267-284.
- Alyautdin RN, Petrov VE, Langer K *et al.* (1997) Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm Res* **14**(3), 325-328.
- Ammar HO, El-Ridy MS, Ghorab M e Ghorab MM (1994) Evaluation of the antischistosomal effect of praziquantel in a liposomal delivery system in mice. *Int J Pharm* **103**, 237-241.
- Anderson SA, Rader RK, Westlin WF *et al.* (2000) Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with $\alpha_v\beta_3$ -targeted nanoparticles. *Magn Reson Med* **44**: 433-39.

- Anzai Y e Prince MR (1997) Iron oxide-enhanced MR lymphography: the evaluation of cervical lymph node metastases in head and neck cancer. *JMRI* **7**, 75-81.
- Aukrust A, Engebretsen T, Sydnes LK *et al.* (2001) Hydrates of gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid bis(methylamide) as studied by X-ray diffraction. *Org Proc Res Develp* **5**: 361-367.
- Bach-Gansmo T, Fahlvik AK, Ericsson A *et al.* (1994) Superparamagnetic iron oxide for liver imaging. *Invest Radiol* **29**(3), 339-344.
- Bačić G, Niesman MR, Bennett HF *et al.* (1988) Modulation of water proton relaxation rates by liposome containing paramagnetic materials. *MRM* **6**, 445-458.
- Banerjee G, Nandi G, Mahatos SB, Pakrashi A e Basu MK (1996) Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. *J Antimicrob Chemother* **38**, 145-150.
- Bangham AD (1968) Membrane models with phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol* **18**: 29-95.
- Bangham AD e Hayton DA (1968) Ultrastructure of membranes: biomolecular organization. *Br Med Bull* **24**: 124-6.
- Barenholz Y e Crommelin DJA (1994) Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, vol. IX. Swarbrick J e Boylan JC (eds), NY 1994, Marcel Dekker Inc.
- Barrat G (1999) Characterization of colloidal drug carrier systems with zeta potential measurements. *Pharm Technol Eur* **1**, 25-32.
- Barsky D, Putz B, Schulten K e Magin RL (1992) Theory of paramagnetic contrast agents in liposome systems. *MRM* **21**, 1-13.
- Bellin MF, Zaim S, Auberton E *et al.* (1994) Liver metastases: safety and efficacy of detection with superparamagnetic iron oxide in MR Imaging. *Radiol* **193**, 657-663.
- Berton M, Allémann E, Stein CA e Gurny R (1999) Highly loaded nanoparticulate carrier using an hydrophobic antisense oligonucleotide complex. *Eur J Pharm Sci* **9**, 163-170.
- Blanco MD e Alonso MJ (1997) Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm* **43**, 287-294.
- Bligh SWA, Chowdhury AHMS, McPartlin M e Scowen IJ (1995) Neutral Gadolinium(III) complexes of bulky octadentate dtpa derivatives as potential contrast agents for magnetic resonance imaging. *Polyhedron* **14**(4), 567-569.
- Blomley MJK, Cooke JC, Unger EC *et al.* (2001) Microbubble contrast agents: a new era in the ultrasound. *BMJ* **322**(7296): 1222-1225.
- Bloembergen N (1957) *J Chem Phys* **27**: 572-3.
- Bocca C, Caputo O, Cavalli R *et al.* (1998) Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *Int J Pharmac* **175**, 185-193.
- Bodmeier R e Maincent P. Polymeric dispersions as drug carriers. *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, vol. 3, 2^aed., Lieberman HÁ, Rieger MM e Banker GS, eds, Marcel Dekker NY 1998, p87-127.

- Boerman OC, Laverman P, Oyen WJ *et al.* (2000) Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Progress in Lipid Res* **39**(5): 461-75.
- Bogdanov AA, Lewin M e Weissleder R (1999) Approaches and agents for imaging the vascular system. *Adv Drug Del Rev* **37**, 279-293.
- Bradley WG, Yuh WTC e Bydder GM (1993) Use of MR imaging contrast agents in the brain. *JMRI* **3**, 199-218.
- Brannon-Peppas L (1995) Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int J Pharm* **116**, 1-9.
- Brasch C e Bennett HF (1990) Mechanisms of contrast enhancement for MRI *in* Bydder G, Felix R, Bucheler E *et al.* Eds. Contrast media in MRI. International Workshop. Berlin. Fev 1-3. Bussum. Holanda: Medicom Europe. 1990: 9-14.
- Brasch RC (1992) New directions in the development of MR Imaging contrast media. *Radiol* **183**, 1-11.
- Brigger I, Chaminade P, Marsaud V *et al.* (2001) Tamoxifen encapsulation with polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *Int J Pharm* **214**(1-2): 37-42.
- Brophy MR e Deasy PB, Biodegradable polyester polymers as drug carriers *in* Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker Inc., 1990, James Swarbrick e James C. Boylan (eds), vol. II, 1-25.
- Buděšínský B (1968) Structure of metal chelates of Arsenazo III, phosphonazo III and sulphonazo III. *Talanta* **15**, 1063-1064.
- Bulte JWM, de Cuyper M, Despres D e Frank JA (1999) Short-vs. long-circulating magnetoliposomes as bone marrow-seeking MR contrast agents. *JMRI* **9**, 329-335.
- Cacheris WP, Quay SC e Rocklage SM (1990), The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *MRI* **8**(4): 467-81.
- Calvo P, Alonso MJ, Vila-Jato JL e Robinson JR (1996) Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *J. Pharm Pharmacol* **48**, 1147-1152.
- Calvo P, Vila-Jato JL e Alonso M (1996a) Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems: nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J Pharm Sci* **85**, 530-536.
- Cannon JB (1993) Pharmaceutics and drug delivery aspects of heme and porphyrin therapy, *J Pharm Sci* **83**(5), 435-446.
- Cannon JB, Gupta PK e Hui H Monoclonal antibodies for drug delivery *in* Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker Inc., 1994, James Swarbrick e James C. Boylan (eds), vol. X, 83-120.
- Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ e Lauffer RB (1999), Gadolinium(III) chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications, *Chem Rev* **99**(9), 2293-2352.
- Carino GP, Jacob JS e Mathiowitz E (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. *J Control Rel* **65**: 261-269.
- Carstensen H, Müller BW e Müller RH (1991) Adsorption of ethoxylated surfactants on nanoparticles. I. Characterization by hydrophobic interaction chromatography. *Int J Pharm* **67**, 29-37.

- Cassidy RM, Elchuk S, Elliot NL *et al.* (1986) Dynamic ion exchange chromatography for the determination of number of fissions in uranium dioxide fuels. *Anal Chem* **58**, 1181-1186.
- Cavalli R, Caputo O, Carlotti ME *et al.* (1997) Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* **148**, 45-54.
- Chacón M, Berges L, Molpeceres J *et al.* (1996) Optimized preparation of poly D,L (lactic-glycolic) microspheres and nanoparticles for oral administration. *Int J Pharm* **141**, 81-91.
- Chan TW, Eley C, Liberti P *et al.* (1992) Magnetic resonance imaging of abscesses using lipid-coated iron oxide particles. *Invest Radiol* **27**, 443-449.
- Chang CA (1993) Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. Design and physicochemical properties of gadodiamide. *Invest Radiol* **28**(suppl. 1), S21-S27.
- Chouly C, Pouliquen D, Lucet I *et al.* (1996) Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface area on biodistribution. *J Microencap* **13**(3), 245-255.
- Clément O, Kerviler E, Cuenod C *et al.* (1995) Agents de contraste en IRM. *Feuillets de Radiologie* **35**(5) 366-380.
- Clément O, Siauve N, Cuenod CA e Frija G (1998) Liver imaging with ferumoxides (Feridex): fundamentals, controversies, and practical aspects. *Top Magn Reson Imaging* **9**(3), 167-182.
- Coffin MD e McGinity JW (1992) Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly(D,L-lactide) and poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in aqueous media. *Pharm Res* **9**(2) 200-205.
- Cohen H, Chen W, Cui XM *et al.* (1998) DNA nanoparticle for gene transfer. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* **25**, Controlled Release Society, Inc.
- Corvo ML, Boerman OC, Oyen WJ *et al.* (2000) Subcutaneous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes: *in vivo* fate and therapeutic activity in an inflammation model. *Pharm Res* **17**(5): 600-6.
- Corvo ML, Martins MB, Francisco AP *et al.* (1997) Liposomal formulations of Cu, Zn-superoxide dismutase: physico-chemical characterization and activity assessment in an inflammation model. *J Control Rel* **43**, 1-8.
- Couvreur P, Couarraze G, Devissaguet JP e Puisieux F *in* Microencapsulation: Methods and industrial applications. Drugs and the Pharmaceutical Sciences **73**, Benita S (ed.) Marcel Dekker Inc., 1996.
- Couvreur P, Dubernet C e Puisieux F (1995) Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm* **41**(1) 2-13.
- Couvreur P, Fattal E e Andremont A (1991) Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharm Res* **8**(9) 1079-1086.
- Couvreur P, Fattal E, Alphandary H *et al.* (1992) Intracellular targeting of antibiotics by means of biodegradable nanoparticles. *J Control Rel* **19**, 259-268.
- Crommelin DJA e Schreier H Liposomes *in* Colloidal Drug Delivery Systems. Kreuter J. (ed.) Marcel Dekker, Inc., NY, 1994, 73-190.

- Crommelin DJA, Nässander UK, Peeters PAM *et al.* (1990) Drug-laden liposomes in antitumor therapy and the treatment of parasitic diseases. *J Control Rel* **11**, 233-243.
- Cruz T, Gaspar R, Donato A e Lopes C (1997) Interaction between polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and peritoneal macrophages: MTT metabolism, NBT reduction, and NO production. *Pharm Res* **14**(1), 73-79.
- Curtet C, Maton F, Havet T *et al.* (1998) Polylysine-Gd-DTPA_n e polylysine-Gd-DOTA_n coupled to anti-CEA F(ab')₂ fragments as potential immunocontrast agents. *Invest Radiol* **33**(10), 752-761.
- Damgé C, Vonderscher J, Marbach P e Pinget M (1997) Poly(alkyl cyanoacrylate) nanocapsules as a delivery system in the rat for octreotide, a long-acting somatostatin analogue. *J Pharm Pharmacol* **49**, 949-954.
- Danzaki Y, Takada K, Wagatsuma K e Oku M (1999) Mutual interference coefficients obtained for 639 emission lines of 68 elements in routine analysis by ICP-AES. *Fresen J Anal Chem* **364**, 549-550.
- Dass CR, Walker TL, Burton MA e Decruz EE (1997) Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes. *J Pharm Pharmacol* **49**, 972-975.
- Davis SS, Ilum L, Moghimi SM *et al.* (1993) Microspheres for targeting drugs to specific body sites. *J Control Release* **24**, 157-163.
- De Campos AM, Sánchez A e Alonso MJ (2001) Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int J Pharm* **224**: 159-168.
- Denys A, Arrive L, Servois V *et al.* (1994) Hepatic tumors: detection and characterization at 1-T MR Imaging enhanced with AMI-25. *Radiol* **193**, 665-669.
- Donahue KM, Weisskoff RM e Burstein D (1997) Water diffusion and exchange as they influence contrast enhancement. *JMRI* **7**: 102-10.
- Dunn SE, Coombes AGA, Garnett MC *et al.* (1997) *In vitro* cell interaction and *in vivo* biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *J Control Rel* **44**, 65-76.
- Duro R, Souto C, Gómez-Amoza JL *et al.* (1999) Interfacial adsorption of polymers and surfactants: implications for the properties of disperse systems of pharmaceutical interest. *Drug Dev Ind Pharm* **25**(7), 817-829.
- Eckelman WC, Karesh SM e Reba R (1975) New compounds: fatty acid and long chain hydrocarbon derivatives containing a strong chelating agent. *J Pharm Sci* **64**(4), 704-706.
- Elst LV, Port M, Raynal I *et al.* (2003) Physicochemical characterization of P760, a new macromolecular contrast agent with high relaxivity. *Eur J Inorg Chem* 2495-501.
- Espuelas S, Legrand P, Chéron M *et al.* (1998) Importance of poloxamer 188 in the behaviour of amphotericin B associated with polymeric carriers. Proc 2nd world meeting APGI/APV, Paris, 569-570.
- Eubank WB, Schmiedl UP, Yuan C *et al.* (1998) Black bool magnetic resonance angiography with Dy-DTPA polymer: effect on arterial intraluminal signal intensity, lumen diameter, and wall thickness. *JMRI* **8**, 1051-1059.

- Fahlvik AK, Artursson P e Edman P (1990) Magnetic starch microspheres: interaction of a microsphere MR contrast medium with macrophages *in vitro*. *Int J Pharm* **65**, 249-259.
- Fahlvik AK, Klaveness J e Stark DD (1993) Iron oxides as MR imaging contrast agents. *JMRI* **3**, 187-194.
- Falk R, Randolph TW, Meyer JD *et al.* (1997) Controlled release of ionic compounds from poly(L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent. *J Control Rel* **44**, 77-85.
- Fallis S, Beaty-Nosco J, Dorshow R e Adzamli K (1998) Polyethyleneglycol-stabilized manganese-substituted hydroxylapatite as a potential contrast agent for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* **33**(12), 847-852.
- Fassel VA e Kniseley RN (1974) Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy. *Anal Chem* **46**(13), 1110A-1120A.
- Fattal E, Vauthier C, Aynie I *et al.* (1998) Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J Control Rel* **53**, 137-143.
- Federle M, Chezmar J, Rubin DL *et al.* (2000) Efficacy and safety of mangafodipir trisodium (MnDPDP) injection for hepatic MRI in adults: Results of the U.S. Multicenter phase III clinical trials. Efficacy of early imaging. *JMRI* **12**(5): 689-701.
- Feng S and Huang G (2001) Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Rel* **71**: 53-69.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP *et al.* (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* **55**, R1-R4.
- Fidler IJ, Incorporation of immunomodulators in liposomes for systemic activation of macrophages and therapy of cancer metastasis. *Liposome Technology*, vol. II, Gregoriadis G, CRC Press 1993, 45-63.
- Fielding RM (1991) Liposomal Drug Delivery. Advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic and therapeutic perspective. *Clin Pharmacokinet* **21**(3) 155-164.
- Florence AT (1997) The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res* **14**(3), 259-266.
- Fonseca C, Simões S e Gaspar R (2002) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* anti-tumoral activity. *J Control Rel* **83**: 273-86.
- Forssen EA, Malé-Brune R, Adler-Moore JP *et al.* (1996) Fluorescence imaging studies for the disposition of daunorubicin liposomes (DaunoXome) within tumor tissue. *Cancer Res* **56**, 2066-2075.
- Fossheim S, Colet JM, Muller RN *et al.* (1997) Influence of size on the uptake kinetics and contrast efficacy of paramagnetic liposomes in the perfused rat liver model. Sixth COST D1 European Workshop on MRI Contrast Agents, Bergen, Noruega, Commission of the European Communities 9-10 Sept.
- Fossheim SL, Fahlvik AK, Klaveness J e Muller RN (1999) Paramagnetic liposomes as MRI contrast agents: influence of liposomal physicochemical properties on the *in vitro* relaxivity. *MRI* **17**(1), 83-89.
- Frame SEM e Uzgiris EE (1998) Gadolinium determination in tissue samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in evaluation of the action of magnetic resonance imaging contrast agents. *Analyst* **123**: 675-679.

- Freed JH (1978) *J Chem Phys* **68**: 4034-7.
- Fritz T, Shen D, Unger E *et al.* (1993) Clearance and biodistribution studies on Mn-EDTA-DDP liposomes (memsomes): a new class of liver MR contrast agents. *SMRI annual meeting*, San Francisco, Abstract.
- Gabizon AA (1995) Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy. *Adv Drug Del Ver* **16**, 285-294.
- Gallez B, Bacic G e Swartz HM (1996) Evidence for the dissociation of the hepatobiliary MRI contrast agent Mn-DPDP. *MRM* **35**, 14-19.
- Gallez B, Baudelet C e Geurts M (1998) Regional distribution of manganese found in the brain after injection of a single dose of manganese-based contrast agents. *MRI* **16**(10), 1211-1215.
- Gasco MR (1997) Solid lipid nanoparticles from warm micro-emulsions. *Pharm Technol Eur* **12**, 52-58.
- Gaspar MM, Blanco D, Cruz MEM e Alonso MJ (1998) Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and *in vitro* release. *J Control Rel* **52**, 53-62.
- Gaspar R, Pr at V e Roland M (1991) Nanoparticles of polyisohexylcyanoacrylate (PIHCA) as carriers of primaquine: formulation, physico-chemical characterization and acute toxicity. *Int J Pharm* **68**, 111-119.
- Gay B, Cardot JM, Schnell C *et al.* (1993) Comparative pharmacokinetics of free muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (MTP-PE) and liposomal MTP-PE, *J Pharm Sci* **82**(10), 997-1001.
- Gellissen J, Axmann Ch, Presher A *et al.* (1999) Extra- and intracellular accumulation of ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIO) in experimentally induced abscesses of the peripheral soft tissues and their effects on magnetic resonance imaging. *MRI* **17**(4), 557-567.
- Geraldes CFGC, Urbano AM, Alpoim MC *et al.* (1995) Preparation, physico-chemical characterization, and relaxometry studies of various gadolinium (III)-DTPA-bis(amide) derivatives as potential magnetic resonance contrast agents. *MRI* **13**(3) 401-420.
- Geraldes FGCC (1999) Paramagnetic NMR effects of lanthanide ions as structural reporters of supramolecular complexes. M Pons (ed.), *NMR in Supramolecular Chemistry*, p133-154, Klumer Academic Publishers, Netherlands.
- Gil VMS e Geraldes CFGC, Ressonância Magnética Nuclear, Funda o Calouste Gulbenkian, Lisboa 1987.
- Gløgård C, Stensrud G, Hovland R *et al.* (2002) Liposomes as carriers of amphiphilic gadolinium chelates: the effect of membrane composition on incorporation efficacy and *in vitro* relaxivity. *Int J Pharm* **233**: 131-40.
- Gløgård C, Stensrud G e Klaveness J (2003) Novel high relaxivity colloidal particles based on the specific phase organization of amphiphilic gadolinium chelates with cholesterol. *Int J Pharm* **253**: 39-48.
- Goins B, Klipper R, Rudolph AS e Phillips WT (1994) Use of Technetium-99m-liposomes in tumor imaging. *J Nucl Med* **35**, 1491-1498.
- Goins B, Phillips WT e Klipper R (1996) Blood-pool imaging using Technetium-99m-labelled liposomes. *J Nucl Med* **37**, 1374-1379.

- Göpferich A (1996) Polymer degradation and erosion: mechanisms and applications. *Eur J Pharm Biopharm* **42**(1) 1-11.
- Govender T, Stolnik S, Garnett MC *et al.* (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Rel* **57**, 171-185.
- Grandin C, van Beers BE, Demeure R *et al.* (1995) Comparison of gadolinium-DTPA and polylysine-gadolinium-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging of hepatocarcinoma in the rat. *Invest Radiol* **30**(10), 572-581.
- Grangier JL, Puygrenier M, Gautier JC e Couvreur P (1991) Nanoparticles as carriers for growth hormone releasing factor. *J Control Rel* **15**, 3-13.
- Greenwald RB (2001) PEG drugs: an overview. *J Control Rel* **74**: 159-171.
- Gref R, Domb A, Quellec P *et al.* (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv Drug Del Rev* **16**, 215-233.
- Gregoriadis G (1991) Overview of liposomes. *J Antimicrob Chemother* **28**, Suppl. B, 39-48.
- Gregoriadis G e Florence AT (1993) Liposomes in drug delivery: clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs* **45**(1), 15-28.
- Gründer W, Biesold M, Wagner M *et al.* (1998) Improved nuclear magnetic resonance microscopic visualization of joint cartilage using liposome entrapped contrast agents. *Invest Radiol* **33**(4), 193-202.
- Guimarães R, Clément O, Bittoun J *et al.* (1994) MR lymphography with superparamagnetic iron nanoparticles in rats: pathologic basis for contrast enhancement. *AJR* **162**, 201-207.
- Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN *et al.* (1999) Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm Res* **16**(10): 1564-9.
- Hagan JJ, Taylor SC e Tweedle MF (1988) Fluorescence detection of gadolinium chelates separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **60**, 514-516.
- Hagspiel KD, Neidl KFW, Eichenberger AC *et al.* (1995) Detection of liver metastases: comparison of superparamagnetic iron oxide-enhanced and unenhanced MR Imaging at 1.5T with dynamic CT, intraoperative US, and percutaneous US. *Radiol* **196**, 471-478.
- Hahn PF (1991) Gastrointestinal contrast agents. *AJR* **156**, 252-254.
- Hamm B (1994) Contrast-enhanced MR Imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *JMRI* **4**, 659-668.
- Hamm B, Laniado M e Saini S (1990) Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of the abdomen and pelvis. *Magn Reson Q* **6**(2) 108-135.
- Harika L, Weissleder R, Poss K *et al.* (1995) MR lymphography with a lymphotropic T1-type MR contrast agent: Gd-DTPA-PGM. *MRM* **33**, 88-92.
- Harisinghani MG, Saini S, Slater GJ *et al.* (1997a) MR imaging of pelvic lymph nodes in primary pelvic carcinoma with ultrasmall superparamagnetic iron oxide (Combidex): preliminary observations. *JMRI* **7**, 161-163.

- Harpur ES, Worah D, Hals PA *et al.* (1993) Preclinical safety assessment and pharmacokinetics of gadodiamide injection, a new magnetic resonance imaging contrast agent. *Invest Radiol* **28**(supl. 1), S28-S43.
- Hawley AE, Illum L e Davis SS (1997) Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. *Pharm Res* **14**(5), 657-661.
- Haynes BF in *Principles of Internal Medicine*, vol. I, 323-329, McGraw-Hill, 13th ed. (1995), eds: Isselbacher KJ, Braunwald AB, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS e Kasper, DL.
- Helbich TH, Gossman A, Mareski PA *et al.* (2000) A new polysaccharide macromolecular contrast agent for MR imaging: biodistribution and imaging characteristics. *JMRI* **11**: 694-701.
- Hendrick RE e Haacke EM (1993) Basic physics of MR contrast agents and maximization of image contrast. *JMRI* **3**, 137-148.
- Herrmann J e Stricker H (1995) Interferon- γ liposomes: drug binding properties and antiviral *in vitro* activity. *Eur J Pharm Biopharm* **41**(6), 361-368.
- Hirohashi S, Hirohashi R, Uchida H *et al.* (1998) Optimal dose of hepatobiliary contrast agent for MR cholangiography: experimental study in rats. *JMRI* **8**, 847-852.
- Hirosue S, Müller BG, Mulligan RC e Langer R (2001) Plasmid DNA encapsulation and release from solvent diffusion nanospheres. *J Control Rel* **70**: 231-242.
- Hofmann B, Bogdanov A, Marecos E *et al.* (1999) Mechanism of gadophrin-2 accumulation in tumor necrosis. *JMRI* **9**, 336-341.
- Hunter DG e Frisken BJ (1998) Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophys J* **74**: 2996-3002.
- Hvattum E, Normann PT, Jamieson GC *et al.* (1995) Detection and quantification of gadolinium chelates in human serum and urine by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization of gadolinium with Arsenazo III. *J Pharm Biomed Anal* **13**, 927-932.
- Isele U, Schieweck K, Kessler R *et al.* (1995) Pharmacokinetics and body distribution of liposomal zinc phthalocyanine in tumor bearing mice: influence of aggregation state, particle size and composition, *J Pharm Sci* **84**(2), 166-72.
- Iwanaga K, Ono S, Narioka K *et al.* (1997) Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes. Improvement of stability of insulin in GI tract. *Int J Pharm* **157**, 73-80.
- Jain R, Shah NH, Malick AW e Rhodes CT (1998) Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. *Drug Dev Ind Pharm* **24**(8) 703-727.
- Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A *et al.* (2001) Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J Control Rel* **73**: 255-267.
- Jasanada F e Nepveu F (1992) Synthesis of amphiphilic chelating agents: bis(hexadecylamide) and bis(octadecylamide) of diethylenetriaminepentaacetic acid. *Tetrahedron Lett* **33**(39), 5745-5748.
- Jasanada F, Urizzi P, Souchard JP *et al.* (1996) Indium-111 labeling of low density lipoproteins with the DTPA-bis(stearylamide): evaluation as a potential radiopharmaceutical for tumor localization. *Bioconj Chem* **7**(1) 72-81.

- Jenning V, Gohla S e Müller RH (1998) Solid lipid nanoparticles (SLN), effect of homogenization parameters on drug stability. *Proc 2nd World Meeting APGI/APV*, Paris, 25/28 Maio, 619-620.
- Johansen P, Men Y, Audran R *et al.* (1998) Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives. *Pharm Res* 15(7) 1103-1110.
- Johansen P, Tamber H, Merkle HP e Gander B (1999) Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA/PLGAs. *Eur J Pharm Biopharm* 47, 193-201.
- Judd RM, Reeder SB e May-Newman K (1999) Effects of water exchange on the measurement of myocardial perfusion using paramagnetic contrast agents. *MRM* 41, 334-342.
- Julienne MC, Alonso MJ, Amoza JLG e Benoit JP (1992) Preparation of poly(D,L-lactide/glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribution: application of experimental designs. *Drug Dev Ind Pharm* 18(10) 1063-1077.
- Jung G, Krahe T, Kugel H *et al.* (1998) Effects of superparamagnetic iron oxide (AMI-25) on magnetic resonance imaging of the liver using T2-weighted fast spin-echo sequences and gradient-and-spin-echo sequences at 1.0 tesla. *Invest Radiol* 33(2), 61-67.
- Kabalka G., Buonocore E., Hubner K. *et al.* (1987) Gadolinium-labeled liposomes: targeted MR contrast agents for the liver and spleen. *Radiol* 163, 255-258
- Kabalka GW, Davis MA, Moss TH *et al.* (1991) Gadolinium-labeled liposomes containing various amphiphilic Gd-DTPA derivatives: targeted MRI contrast enhancement agents for the liver. *Magn Reson Med* 19, 406-415.
- Kantipuly CJ e Westland AD (1988) Review of methods for the determination of lanthanides in geological samples. *Talanta* 35(1), 1-13.
- Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H e Kuno Y (1998) Mucoadhesive DL-Lactide/Glycolide copolymer nanospheres to improve oral delivery of elcatonin. *Proc 2nd World Meeting APGI/APV*, Paris, 25/28 Maio.
- Khanna C, Waldrep JC, Anderson PM *et al.* (1997) Nebulized Interleukin 2 Liposomes: aerosol characteristics and biodistribution. *J Pharm Pharmacol* 49: 960-971.
- Kim CK e Jeong EJ (1997) Enhanced lymph node delivery and immunogenicity of hepatitis B surface antigen entrapped in galactosylated liposomes. *Int J Pharm* 147, 143-151.
- Kim I-S e Kim S-H (2001) Evaluation of polymeric nanoparticles composed of cholic acid and methoxy poly(ethylene glycol). *Int J Pharm* 226: 23-29.
- Knollmann FD, Bock JC, Teltenkötter S *et al.* (1997) Evaluation of portal MR angiography using superparamagnetic iron oxide. *JMRI* 7, 191-196.
- Knopp MV, Tengg-Koblick H, Floemer F e Schoenberg SO (1999) Contrast agents for MRA: future directions. *JMRI* 10, 314-316.
- Kobayashi H, Sato N, Kawamoto S *et al.* (2001) Novel intravascular macromolecular MRI contrast agent with generation-4 polyamidoamine dendrimer core: accelerated renal excretion with coinjection of lysine. *Magn Reson Med* 46: 457-464.
- Koenig SH e Brown III RD (1994) Relaxometry and the source of contrast in MRI. *NMR in Physiology and Biomedicine* 57-73.

- Konings Ms, Dow WC, Love DB *et al.* (1990) Gadolinium complexation by a new DTPA-amide ligand. Amide oxygen coordination. *Inorg Chem* **29**, 1488-1491.
- Kouwenhoven M (1997) Contrast-enhanced MR angiography. *Acta Radiol* 38, Supl. 412, 57-67.
- Krause W, Leike J, Sachse A e Schuhmann G (1993) Characterization of iopromide liposomes. *Invest Radiol* **28**(11) 1028-1032.
- Kresse M, Kito K, Wagner S *et al.* (1998) Contrast-enhanced MR lymphography in rabbits: pilot experiments with up-scaled USPIO contrast media. *Proc 2nd World Meeting APGI/APV*, Paris, 25-28 Maio.
- Kresse M, Pfefferer D, Semmler W e Lawaczek R (1998a) Pharmacokinetics of chondroitin-4-sulfate coated iron oxide particles in rats. *Proc 2nd World Meeting APGI/APV*, Paris, 25-28 Maio.
- Kreuter J (1991) Nanoparticle-based drug delivery systems. *J Control Rel* 16, 169-176.
- Kreuter J (1994) Nanoparticles *in* Colloidal Drug Delivery Systems. Kreuter J. (ed.) Marcel Dekker, Inc., NY, 1994, 219-342.
- Kreuter J (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Del Rev* **47**(1): 65-81.
- Kristl J, Allémann E e Gurny R (1996) Formulation and evaluation of zinc-phthalocyanine loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles. *Acta Pharm* **46**, 1-12.
- Kroft LJM e de Roos A (1999) Blood pool contrast agents for cardiovascular MR imaging. *JMRI* **10**, 395-403.
- Kroft LJM, Doornbos J, Benderbous S *et al.* (1999) Equilibrium phase MR angiography for the aortic arch and abdominal vasculature with the blood pool contrast agent CMD-A2-Gd-DOTA in pigs. *JMRI* **9**, 777-785.
- Kroft LJM, Doornbos J, van der Geest RJ *et al.* (1998) Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (USPIO) MR imaging of infarcted myocardium in pigs. *MRI* **16**(7), 755-763.
- Kubo A, Nakamura K, Sammiya T *et al.* (1993) Indium-111-labeled liposomes: dosimetry and tumor detection in patients with cancer. *Eur J Nucl Med* **20**, 107-113.
- Kumar M (2000) Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharmaceut Sci* **3**(2): 234-258.
- Kumar S, Singh T, Khar RK *et al.* (1993) Evaluation of sterically stabilized liposomes as a vehicle for targeting technetium-99m labelled radiopharmaceuticals. *Pharmazie* **48**, 613-616.
- Kunimasa J, Inui K, Hori R *et al.* (1992) Mannan-coated liposome delivery of gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid, a contrast agent for use in magnetic resonance imaging. *Chem Pharm Bull* **40**(9) 2565-2567.
- Kuwatsuru R, Brasch R, Muhler A *et al.* (1997) Definition of liver tumors in the presence of diffuse liver disease: comparison of findings at MR imaging with positive and negative contrast agents. *Radiol* **202**, 131-138.
- Labhassetwar V, Song C, Humphrey W *et al.* (1998) Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications. *J Pharm Sci* **87**(10), 1229-1234.

- Laing ADP e Gibson RN (1998) MRI of the liver. *JMRI* 8, 337-345.
- Laissy JP, Banderbous S, Idée JM *et al.* (1996) MR assessment of iodinated contrast-medium-induced nephropathy in rats using ultrasmall particles of iron oxide. *JMRI* 7, 164-170.
- Lambert G, Fattal E e Couvreur P (2001) Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Del Rev* 47(1): 99-112.
- Langer K, Coester C, Weber C *et al.* (2000) Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acids. *Eur J Pharmac & Biopharmac* 49(3): 303-307.
- Langer R (1998) Drug delivery and targeting. *Nature* 392 suppl: 5-10.
- Langer R (1999) Selected advances in drug delivery and tissue engineering. *J Control Rel* 62, 7-11.
- Langer R (2001) Drug delivery. Drugs on target. *Science* 293(5527): 58-60.
- Lasic DD *in* Liposomes: from physics to applications, Elsevier 1993.
- Legrand P, Barrat G, Mosqueira V, Fessi H e Devissaguet JP (1999) Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. *STP Pharm Sci* 9(5), 411-418.
- Lenaerts V, Labib A, Chouinard F *et al.* (1995) Nanocapsules with a reduced liver uptake: targeting of phthalocyanines to EMT-6 mouse mammary tumor *in vivo*. *Eur J Pharm Biopharm* 41(1), 38-43.
- Leroux JC, Allémann E, Doelker E e Gurny R (1995) New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur J Pharm Biopharm* 41(1) 14-18.
- Leroux JC, Cozens R, Roesel JL *et al.* (1996) pH-sensitive nanoparticles: a new vehicle to improve the oral delivery of HIV-1 protease inhibitors. *Proc Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 23, Controlled Release Society, Inc.
- Li JK, Wang N e Wu XS (1998) Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery. *J Control Rel* 56, 117-126.
- Li X, Deng X, Yuan M *et al.* (1999) Investigation on process parameters involved in preparation of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing *Leptospira Interrogans* antigens. *Int J Pharm* 178, 245-255.
- Li YP, Pei YY, Zhang XY *et al.* (2001) PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Rel* 71: 203-11.
- Løkling KE, Fossheim SL, Skurtveit R *et al.* (2001) pH-sensitive paramagnetic liposomes as MRI contrast agents: *in vitro* feasibility studies. *Magn Reson Imag* 19: 731-38.
- Lourenço C, Teixeira M, Simões S e Gaspar R (1996) Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. *Int J Pharm* 138, 1-12.
- Low RN (1997) Contrast agents for MR imaging of the liver. *JMRI* 7, 56-67.
- Maaßen S, Fattal E, Müller RH e Couvreur P (1993) Cell cultures for the assessment of toxicity and uptake of polymeric particulate drug carriers. *STP Pharm Sci* 3(1), 11-22.
- Mann, J. S. (1993) Stability of gadolinium complexes *in vitro* and *in vivo*. *J Comput Assist Tomogr* 17 **Suppl 1**: S19-23.

- Mandal TK (1998) Evaluation of a novel phase separation technique for the encapsulation of water-soluble drugs in biodegradable polymer. *Drug Dev Ind Pharm* **24**(7) 623-629.
- Marchal-Heussler L, Thouvenot P, Hoffman M e Maincent P (1999) Comparison of the biodistribution in mice of ¹¹¹Indium oxine encapsulated into poly(lactic-co-glycolic)-D,L-85/15 and poly(epsilon caprolactone) nanocapsules. *J Pharm Sci* **88**(4), 450-453.
- Martin A. Physical Pharmacy 4th ed. Lippincott Williams&Wilkins, NY 1993.
- Martins MBF, Simões SID, Supico A *et al.* (1996) Enzyme-loaded PIBCA nanoparticles (SOD and L-ASNase): optimization and characterization. *Int J Pharm* **142**, 75-84.
- Marty JJ, Oppenheim RC e Speiser P (1978) Nanoparticles – a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv* **53**(1) 17-23.
- Mastrobattista E, Kapel RH, Eggenhuisen MH *et al.* (2001) Lipid-coated polyplexes for targeted gene delivery to ovarian carcinoma cells. *Cancer Gene Therapy* **8**(6): 405-13.
- Mathur-De Vré R e Lemort M (1995) Biophysical properties and clinical applications of magnetic resonance imaging contrast agents. *Br J Radiol* **68**, 225-247.
- Mauduit J e Vert M (1993) Les polymères à base d'acides lactiques et glycolique et la délivrance contrôlée des principes actifs. *S.T.P. Pharma Sci* **3**(3) 197-212.
- Mayo-Smith WW, Saini S, Slater G *et al.* (1996) MR contrast material for vascular enhancement: value of superparamagnetic iron oxide. *AJR* **166**, 73-77.
- Mazzucotelli A, Bavastello V, Magi E, Rivaro P e Tomba C (1995) Analysis of gadolinium polyaminopolycarboxylic complexes by HPLC-ultrasonic nebulizer-ICP-AES hyphenated technique. *Anal Proc Inc Anal Comm* **32**, 165-167.
- Mehnert W e Mäder K (2001) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Del Rev* **47**(2-3): 165-196.
- Meijer DKF e Molema G (1995) Targeting of drugs to the liver in *Seminars in Liver Disease* **15**(3), 202-256.
- Mendelsohn J, Principles of neoplasia in *Principles of Internal Medicine*, vol. II, 1814-1826, McGraw-Hill, 13th ed. (1995), eds: Isselbacher KJ, Braunwald AB, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS e Kasper DL.
- Mergo PJ, Engelken JD, Helmberger T e Ros PR (1998) MRI in focal liver disease: a comparison of small and ultra-small superparamagnetic iron oxide as hepatic contrast agents. *JMRI* **8**, 1073-1078.
- Mergo PJ, Helmberger T, Nicolas AI e Ros PR (1996) Ring enhancement in ultrasmall superparamagnetic iron oxide MR Imaging: a potential new sign for characterization of liver lesions. *AJR* **166**, 379-384.
- Merkli A, Tabatabay C e Gurny R (1995) Use of insoluble biodegradable polymers in ophthalmic systems for the sustained release of drugs. *Eur J Pharm Biopharm* **41**(5) 271-83.
- Misselwitz B e Sachse A (1997) Interstitial MR lymphography using Gd-carrying liposomes. *Acta Radiol* **38**, 51-55.

- Mitchell DG (1997) MR imaging contrast agents - what's in a name? *JMRI* 7, 1-4.
- Mitchell DG, *MRI Principles*, WB Saunders Company, Philadelphia 1999.
- Mitchell DG, Outwater EK, Matteucci T *et al.* (1995) Adrenal gland enhancement at MR imaging with Mn-DPDP. *Radiol* **194**, 783-787.
- Moghimi SM e Bonnemain B (1999) Subcutaneous and intravenous delivery of diagnostic agents to the lymphatic system: applications in lymphoscintigraphy and indirect lymphography. *Adv Drug Del Rev* **37**, 295-312.
- Moore GL. *Introduction to Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*. Elsevier NY 1989.
- Moreira JN, Gaspar R e Allen TM (2001) Targeting stealth liposomes in a murine model of human small cell lung cancer. *BBA* **1515**: 167-76.
- Morel S, Terreno E, Ugazio E *et al.* (1998) NMR relaxometric investigations of solid lipid nanoparticles (SLN) containing gadolinium(III) complexes. *Eur J Pharm Biopharm* **45**, 157-163.
- Morrison R, e Boyd R, *Química Orgânica*, 13^a ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa 1996, p856-862.
- Müller RH, Maaßen S, Weyhers H e Mehnert W (1996) Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. *J Drug Targeting* **4(3)** 161-178.
- Müller RH, Maaßen S, Weyhers H *et al.* (1996a) Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* **138**, 85-94.
- Müller RH, Maassen S, Schwarz C e Mehnert W (1997) Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. *J Control Rel* **47**, 261-269.
- Müller RH, Rühl D, Runge S *et al.* (1997a) Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm Res* **14(4)**, 458-462.
- Nakada Y, Fattal E, Foulquier M e Couvreur P (1996) Pharmacokinetics and biodistribution of oligonucleotide adsorbed onto poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration in mice. *Pharm Res* **13(1)** 38-43.
- Nakada Y, Matsumoto J, Sakurai K *et al.* (1998) Preparation of nanoparticles consisted of PLA-PEG-PLA and its evaluation *in vitro*. Proc 2nd world meeting APGI/APV, Paris, 595-596.
- Neal JC, Stolnik S, Schacht E *et al.* (1998) *In vitro* displacement by rat serum of adsorbed radiolabeled poloxamer and poloxamine copolymers from model and biodegradable nanospheres. *J Pharm Sci* **87(10)** 1242-1248.
- Niesman MR, Bacic GG, Wright SM *et al.* (1990) Liposome encapsulated MnCl₂ as a liver specific contrast agent for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* **25**, 545-551.
- Niwa T, Takeuchi H, Hino T *et al.* (1993) Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J Control Rel* **25**, 89-98.

- Niwa T, Takeuchi H, Hino T *et al.* (1994) *In vitro* drug release behavior of D,L-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method. *J Pharm Sci* **83**(5) 727-732.
- Ogihara-Umeda I, Sasaki T, Toyama H *et al.* (1994) Rapid tumor imaging by active background reduction using biotin-bearing liposomes and avidin. *Cancer Res* **54**, 463-467.
- Øksendal AN e Hals PA (1993) Biodistribution and toxicity of MR Imaging contrast media. *JMRI* **3**, 157-165.
- Omelczuk MO e McGinity JW (1993) The influence of thermal treatment on the physical-mechanical and dissolution properties of tablets containing poly-(DL-lactic acid). *Pharm Res* **10**(4) 542-548.
- Omri A, Ravaoarino M e Poisson M (1995) Incorporation, release and *in vitro* antibacterial activity of liposomal aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **36**, 631-639.
- Ostrowitzki S, Fick J, Roberts TPL *et al.* (1998) Comparison of Gadopentetate dimeglumine and albumine-(Gd-DTPA)₃₀ for microvessel characterization in an intracranial glioma model. *JMRI* **8**, 799-806.
- Oudkerk M, Sijens PE, van Beek E e Kuijpers T (1995) Safety and efficacy of Dotarem (Gd-DOTA) versus Magnevist (Gd-DTPA) in Magnetic Resonance Imaging of the central nervous system. *Invest Radiol* **30**(2) 75-78.
- Panagi Z, Beletsi A, Evangelatos G *et al.* (2001) Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* **221**: 143-152.
- Panico AM, Pignatello R, Puglisi G *et al.* (1992) Use of liposomes as carriers for immunomodulatory polypeptides: studies on thymostimulin encapsulation and retention. *Int J Pharm* **80**, 93-100.
- Papisov MI (1995) Modeling *in vivo* transfer of long-circulating polymers (two classes of long circulating polymers and factors affecting their transfer *in vivo*). *Adv Drug Del Rev* **16**, 127-139.
- Park JW, Kirpotin DB, Hong K *et al.* (2001) Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J Control Rel* **74**: 95-113.
- Parker D e Williams JA (1996) Getting excited about lanthanide complexation chemistry. *J Chem Soc Dalton Trans* 3613-28.
- Pastorino F, Stuart D, Ponzoni M *et al.* (2001) Targeted delivery of antisense oligonucleotides in cancer. *J Control Rel* **74**: 69-75.
- Paul M, Fessi H, Laataris A *et al.* (1997) Pentamidine-loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: physicochemical properties and stability work. *Int J Pharm* **159**, 223-232.
- Päuser S, Reszka R, Wagner S *et al.* (1997) Liposome-encapsulated superparamagnetic iron oxide particles as markers in an MRI-guided search for tumor-specific drug carriers. *Anti-Cancer Drug Design* **12**, 125-135.
- Perez C, Sanchez A, Putnam D *et al.* (2001) Poly(lactic acid) – poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Control Rel* **75**: 211-224.
- Petersen EA, Grayson JB, Hersh EM *et al.* (1996) Liposomal amikacin: improved treatment of *Mycobacterium avium* complex infection in the beige mouse model. *J Antimicrob Chemother* **38**, 819-828.

- Pochon S, Hyacinthe R, Terrettaz J *et al.* (1997) Long circulating superparamagnetic particles with high T2 relaxivity. *Acta Radiol* **38**, Supl. 412, 69-72.
- Poekler-Schoeniger C, Koepke J, Gueckel F *et al.* (1999) MRI with superparamagnetic iron oxide: efficacy in the detection and characterization of focal hepatic lesions. *MRI* **17**(3), 383-392.
- Prokop A, Kozlov E *et al.* (2002) Water-based nanoparticulate polymeric system for protein delivery: permeability control and vaccine application. *Biotechnol Bioeng* **78**(4) 459-66.
- Putz B, Barsky D e Schulten K (1994) Mechanisms of liposomal contrast agents in magnetic resonance imaging. *J Liposome Res* **4**, 771-808.
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E e Fessi H (1997) A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Colloid Polym Sci* **275**, 640-647.
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H e Doelker E (1998) Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* **24**(12), 1113-28.
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H e Doelker E (1996) Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* **143**, 133-141.
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E e Fessi H (1998a) Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res* **15**(7) 1056-62.
- Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H e Doelker E (1997a) Applications of the ion-pair concept to hydrophilic substances with special emphasis on peptides. *Pharm Res* **14**(2), 119-127.
- Radomska A, Dobrucki R e Müller RH (1999) Chemical stability of the lipid matrices of solid lipid nanoparticles (SLN)-development of an analytical method and determination of long-term stability. *Pharmazie* **54**, 903-909.
- Rajendran D, Senthil Kumar S, Dhanaraj SA, Dube R, e Suresh B (1997) Comparative evaluation of targeting efficiency of charged and neutral liposomes of 5-fluorouracil. *Drug Dev Ind Pharm* **23**(11) 1099-1104.
- Reimer P, Rummeny EJ, Daldrup HE *et al.* (1995) Clinical results with Resovist: A phase 2 clinical trial. *Radiol* **195**, 489-496.
- Réty F, Clément O, Siauve N *et al.* (2000) MR lymphography using iron oxide nanoparticles in rats: pharmacokinetics in the lymphatic system after intravenous injection. *JMRI* **12**(5): 734-739.
- Ringdén O, Tollemar J e Tydén G (1992) Liposomal amphotericin B, *The Lancet* **339**, 374-375.
- Roberts HC, Saeed M, Roberts TPL *et al.* (1997) Comparison of albumin-(Gd-DTPA)₃₀ and Gd-DTPA-24-cascade-polymer for measurements of normal and abnormal microvascular permeability. *JMRI* **7**, 331-338.
- Rocklage SM e Watson AD (1993) Chelates of gadolinium and dysprosium as contrast agents for MR imaging. *JMRI* **3**, 167-178.

- Rocklage SM, Watson AD e Carvlin MJ, Contrast agents in magnetic resonance imaging, Mosby Year Book, Inc., Boston 1992.
- Roy C, Bellin MF, Kinkel K (1997) MR lymphography with ultrasmall iron oxide particles in patients with urologic and pelvic cancer. *Eur Radiol* **7**(suppl.), S197.
- Roy C, Bellin MF, Zaim S *et al.* (1995) Detection en IRM des metastases ganglionnaires de cancers urologiques et pelviens: tolerance et apport du Sinerem-AMI 227. *J Radiol* **76**(10), 752.
- Roy C, Zaim S, Bellin MF *et al.* (1995a) MR lymphography with superparamagnetic iron oxide in patients with urologic and pelvic tumors: initial clinical experience. *Proc Soc Magn Reson 3rd sci meeting & Eur Soc Magn Reson Med Biol 12th annual meeting*, Nice, França 19-25 Agosto.
- Rubin DL, Desser TS, Semelka R *et al.* (1999) A multicenter, randomized, double-blind study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of OptiMARK (gadoversetamide injection) compared with Magnevist (gadopentetate dimeglumine) in patients with liver pathology: results of a phase III clinical trial. *JMRI* **9**, 240-250.
- Runge VM, Wells JW e Williams NM (1996) Evaluation of gadolinium 2,5-BPA-DO3A, a new macrocyclic hepatobiliary chelate, in normal and metastatic disease on high field magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* **31**(1), 11-16.
- Runge, VM (2000) Safety of approved MR contrast media for intravenous injection. *JMRI* **12**(2): 205-13.
- Saab-Ismail NH, Simor T, Gaszner B *et al.* (1999) Synthesis and *in vivo* evaluation of new contrast agents for cardiac MRI. *J Med Chem* **42**(15), 2852-61.
- Sachse A, Leike JU, Roßling GL *et al.* (1993) Preparation and evaluation of lyophilized iopromide-carrying liposomes for liver tumor detection. *Invest Radiol* **28**(9) 838-844.
- Sagrado FG, Guzman M, Molpeceres J e Aberturas MR (1994) Pluronic copolymers – characteristics, properties, and pharmaceutical applications: Part I. *Pharm Technol Eur* **5**, 46-56.
- Saini S, Edelman RR, Sharma P *et al.* (1995) Blood-pool MR contrast material for detection and characterization of focal hepatic lesions: initial clinical experience with ultrasmall superparamagnetic iron oxide (AMI-227). *AJR* **164**, 1147-1152.
- Saini S, Modic MT, Hamm B e Hahn PF (1991) Advances in contrast-enhanced MR Imaging. *AJR* **156**, 235-254.
- Schmitt-Willich H, Brehm M, Ewers CLJ (1999) Synthesis and physicochemical characterization of a new gadolinium chelate: the liver-specific magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA. *Inorg Chem* **38**, 1134-1144.
- Schuhmann-Giampieri G, Schitt-Willich H e Frenzel T (1993) Biliary excretion and pharmacokinetics of a gadolinium chelate used as a liver-specific contrast agent for magnetic resonance imaging in the rat. *J Pharm Sci* **82** (8), 799-803.
- Schwendener RA, Wüthrich R, Duewell *et al.* (1989) Small unilamellar liposomes as magnetic resonance contrast agents loaded with paramagnetic Mn-, Gd- and Fe-DTPA-stearate complexes. *Int J Pharm* **49**: 249-59.
- Seijo B, Fattal E, Roblot-Treupel L e Couvreur P (1990) Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *Int J Pharm* **62**, 1-7.

- Séjourné F, Rubinstein I, Suzuki H e Alkan-Önyüksel H (1997) Development of a novel sensitive MR contrast agents. *Magn Reson Med* **35**, 801-806.
- Sharma US, Sharma A, Chau RI e Straubinger RM (1997) Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model. *Pharm Res* **14**(8): 992-998.
- Shellock FG e Kanal E (1999) Safety of magnetic resonance imaging contrast agents. *J Magn Reson Imag* **10**: 477-484.
- Sherry AD, Brown RD, Geraldes CFGC *et al.* (1989) Synthesis and characterization of the gadolinium (3+) complex of DOTA-propylamide: a model DOTA-protein conjugate. *Inorg Chem* **28**: 620-22.
- Sherry AD, Cacheris WP e Kuan KT (1988) Stability constants for Gd³⁺ binding to model DTPA-conjugates and DTPA-proteins: implications for their use as magnetic resonance agents. *Magn Reson Med* **8**: 180-90.
- Shuter B, Wang SC, Roche J *et al.* (1998) Relaxivity of Gd-EOB-DTPA in the normal and biliary obstructed guinea pig. *JMRI* **8**: 853-861.
- Silva MF, Fernandez LP e Olsina RA (1998) Monitoring the elimination of gadolinium-based pharmaceuticals. Cloud point preconcentration and spectrophotometric determination of Gd(III)-2-(3,5-dichloro-2-pyridylazo)-5-dimethylaminophenol in urine. *Analyst* **123**, 1803-1807.
- Sinha VR e Kumria R (2001) Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int J Pharm* **224**: 19-38.
- Sinisterra RD, Shastri VP, Najjar R e Langer R (1999) Encapsulation and release of Rhodium(II) citrate and its association with hydroxypropyl- β -cyclodextrin from biodegradable polymer microspheres. *J Pharm Sci* **88**(5), 574-576.
- Sintzel MB, Bernatchez SF, Tabatabay C e Gurny R (1996) Biomaterials in ophthalmic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* **42**(6) 358-374.
- Skiba M, Duchêne D, Puisieux F e Wouessidjewe D (1996) Development of a new colloidal drug carrier from chemically-modified cyclodextrins: nanospheres and influence of physicochemical and technological factors on particle size, *Int J Pharm* **129**, 113-121.
- Skiba M, Wouessidjewe D, Puisieux F *et al.* (1996a) Characterization of amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres. *Int J Pharm* **142**, 121-124.
- Slepuskin VA, Simões S, Dazin P *et al.* (1997) Sterically stabilized pH-sensitive liposomes: intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation *in vivo*. *J Biol Chem* **272**, 2382-2388.
- Smith RC e Lange RC, *Understanding Magnetic Resonance Imaging*, CRC Press, Nova Iorque 1998.
- Solomon I (1955) Relaxation processes in a system of two spins. *Phys Rev* **99**(2) 559-65.
- Soma CE, Dubernet C, Barrat G *et al.* (1999) Ability of doxorubicin-loaded nanoparticles to overcome multidrug resistance of tumor cells after their capture by macrophages. *Pharm Res* **16**(11), 1710-1716.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR *et al.* (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Rel* **70**: 1-20.
- Stark DD e Bradley WG, *Magnetic Resonance Imaging*, 3^a ed., Mosby, Inc., Nova Iorque 1999.

- Stillman AE, Wilke N, Li D *et al.* (1996) Ultrasmall superparamagnetic iron oxide to enhance MRA of the renal and coronary arteries: studies in human patients. *J Comp Ass Tomog* **20**(1) 51-55.
- Stolnik S, Illum L e Davis SS (1995) Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv Drug Del Rev* **16**, 195-214.
- Storm G, Koppenhagen F, Heeremans A *et al.* (1995) Novel developments in liposomal delivery of peptides and proteins. *J Control Rel* **36**, 19-24.
- Storrs RW, Tropper FD, Li HY *et al.* (1995) Paramagnetic polymerized liposomes as new recirculating MR contrast agents. *JMRI* **5**, 719-724.
- Tacke J, Adam G, Claben H *et al.* (1997) Dynamic MRI of a hypovascularized liver tumor model: comparison of a new blood pool contrast agent (24-gadolinium-DTPA-cascade-polymer) with gadopentetate dimeglumine. *JMRI* **7**, 678-682.
- Takeuchi H, Kojima H, Yamamoto H *et al.* (2001) Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats. *J Control Rel* **75**: 83-91.
- Tanimoto A, Yuasa Y e Hiramatsu K (1998) Enhancement of phase-contrast MR angiography with superparamagnetic iron oxide. *JMRI* **8**, 446-450.
- Thompson M e Walsh JN *in* A Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry, Blackie & Son Ltd, Glasgow 1983.
- Tian G, Shen J, Su S *et al.* (1997) Evaluation of hydroxyethyl-starch-ferrioxamine as intravascular MR contrast agent for assessment of myocardial perfusion. *Acta Radiol* **38**, Supl. 412, 85-90.
- Tilcock C (1993) Liposomal paramagnetic magnetic resonance contrast agents *in Liposome Technology*, vol. II, Gregoriadis G., CRC Press 1993, 65-87.
- Tilcock C (1999) Delivery of contrast agents for magnetic resonance imaging, computed tomography, nuclear medicine and ultrasound. *Adv Drug Del Rev* **37**, 33-51.
- Tilcock C, Ahkong KQ, Koenig SH *et al.* (1992) Nuclear magnetic relaxation dispersion and ³¹P-NMR studies of the effect of covalent modification of membrane surfaces with poly(ethylene glycol). *BBA* **1110**(2): 193-8.
- Tilcock C, MacDougall P, Unger E *et al.* (1990) The effect of lipid composition on the relaxivity of Gd-DTPA entrapped in lipid vesicles of defined size. *BBA* **1022**, 181-186.
- Tokumitsu H, Ichikawa H e Fukumori Y (1999a) Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutro-capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharm Res* **16**(12), 1830-1835.
- Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y e Block LH (1999) Preparation of Gadopentetic acid-loaded chitosan microparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer by a novel emulsion-droplet coalescence technique. *Chem Pharm Bull* **47**(6), 838-842.
- Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y *et al.* (1998) Preparation of gadopentetate-loaded chitosan nanoparticle for gadolinium neutron capture therapy of cancer using a novel umulsion droplet coalescence technique. *Proc 2nd World meeting APGI/APV*, Paris, 25/28 Maio.
- Tomlinson E e Rolland AP (1996) Controllable gene therapy: Pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems. *J Control Rel* **39**, 357-372.

- Torchilin VP (1994) Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use for targeted delivery of imaging agents. *Immunomethods* **4**, 244-258.
- Torchilin VP (1996) Liposomes as delivery agents for medical imaging. *Mol Med Today* **6**, 242-249.
- Torchilin VP (1997) Surface-modified liposomes in gamma- and MR-imaging. *Adv Drug Del Rev* **24**, 301-313.
- Torchilin VP (2000) Polymeric contrast agents for medical imaging. *Curr Pharmac Biotechnol* **1(2)**: 183-215.
- Torchilin VP e Trubetskoy VS (1995) Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Adv Drug Del Rev* **16**, 141-155.
- Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer R e Shakesheff KM (1999) Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev* **99**, 3181-3198.
- Umbrain V, Alafandy M, Bourgeois P *et al.* (1995) Biodistribution of liposomes after extradural administration in rodents. *Br J Anaesth* **75**, 311-318.
- Unger E, Fritz T, Shen D-K, *et al.* (1994) Gas filled lipid bilayers as imaging contrast agents. *J Liposome Res* **4(2)**, 861-874.
- Unger E, Fritz T, Wu G *et al.* (1994a) Liposomal MR contrast agents. *J Lip Res* **4(2)** 811-834.
- Unger E, Shen D, Fritz T *et al.* (1994b) Gas-filled bilayers as ultrasound contrast agents. *Invest Radiol* **29** (suppl. II), S134-S136.
- Unger EC, Fritz T, Shen D, e Wu G (1996) Manganese-based liposomes: comparative approaches. *Invest Radiol* **28(10)** 933-938.
- Unger EC, Fritz TA, Palestrant D *et al.* (1993) Preliminary evaluation of iron phytate (inositol hexaphosphate) as a gastrointestinal MR contrast agent. *JMRI* **3**, 119-124.
- Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH *et al.* (1998) Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: a new therapeutic ultrasound contrast agent. *Invest Radiol* **33(12)**: 886-92.
- Unger EC, Shen DK e Fritz TA (1993b) Status of liposomes as MR contrast agents. *JMRI* **3**, 195-198.
- Unger EC, Ugurbil K e Latchaw RE (1994d) Contrast agents for cerebral perfusion MR Imaging. *JMRI* **4**, 235-242.
- Venier-Julienne MC e Benoît JP (1996) Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm Acta Helvet* **71**, 121-128.
- Verdun, Claudette, *Developpment industriel de nanoparticules de polyalkylcyanoacrylates: application à la doxorubicine*, Université Catholique de Louvain, 1990.
- Verrecchia T, Spenlehauer G, Bazile DV *et al.* (1995) Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *J Control Rel* **36**, 49-61.
- Vert M, Li S e Garreau H (1991) More about the degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. *J Control Rel* **16**, 15-26.

- Vogel AI. Vogel's textbook of practical organic chemistry 5th ed. Wiley, NY 1989.
- Vogl TJ, Bartjes M e Marzec K (1997) Contrast-enhanced lymphography. CT or MR imaging? *Acta Radiol* **38**, Supl. 412, 47-50.
- Volhardt KPC e Schore NE, Organic Chemistry, 2nd ed., Freeman and Company, NY 1994.
- Walter E, Moelling K, Pavlovic J e Merkle HP (1999) Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics. *J Control Rel* **61**, 361-374.
- Wang D, Robinson DR, Kwon GS e Samuel J (1999) Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery. *J Control Rel* **57**, 9-18.
- Wehrle P, Magenheim B e Benita S (1995) The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. *Eur J Pharm Biopharm* **41**(1) 19-26.
- Weissleder R (1994) Liver MR Imaging with iron oxides: toward consensus and clinical practice. *Radiol* **193**, 593-595.
- Weissleder R, Bogdanov A e Papisov M (1992) Drug targeting in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Q* **8**(1), 55-63.
- Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J *et al.* (1990) Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR Imaging. *Radiol* **175**, 489-493.
- Winalski CS, Shortkroff S, Mulkern RV *et al.* (2002) Magnetic resonance imaging of dendrimer-linked nitroxides. *Magn Reson Med* **48**: 965-72.
- Witschi C e Doelker E (1998) Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during *in vitro* testing. *J Control Rel* **51**, 327-341.
- Wolf GL (1990) Contrast media in MRI, International Workshop, Berlin, 15-18.
- Wood ML e Hardy PA (1993) Proton Relaxation Enhancement. *JMRI* **3**, 149-156.
- Woodle MC (1993) ⁶⁷Gallium-labelled liposomes with prolonged circulation: preparation and potential as nuclear imaging agents. *Nucl Med Biol* **20**(2) 149-155.
- Yoo HS, Oh JE, Lee KH e Park TG (1999) Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharm Res* **16**(7), 1114-1118.
- Yu O, Namer IJ, Steibel J *et al.* (1995) Susceptibility-based MRI contrast of the CSF by intravascular superparamagnetic nanoparticles. *Magma* **3**, 169-172.
- Zalipsky S, Hansen CB, Menezes DEL e Allen TM (1996) Long-circulating, polyethylene glycol-grafted immunoliposomes. *J Control Rel* **39**, 153-161.
- Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R *et al.* (1998) Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Rel* **50**, 31-40.
- Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R *et al.* (1999) Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *J Control Rel* **60**, 179-188.

Zelphati O e Szoka FC (1996) Liposomes as a carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotides: a real or magic bullet? *J Control Rel* **41**, 99-119.

Zhang S, Wu K e Sherry AD (2001) Gd^{3+} complexes with slowly exchanging bound-water molecules may offer advantages in the design of responsive MR agents. *Invest Radiol* **36**(2) 82-6.

Zimmer C, Weissleder R, Poss K *et al.* (1995) MR Imaging of phagocytosis in experimental gliomas. *Radiol* **197**, 533-538.