



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

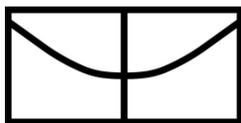
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DESENVOLVIMENTO DE NOVO AGENTE DE CONTRASTE IODADO PARA
NANO-SISTEMAS PARA IMAGEAMENTO POR RAIOS-X.**

JÚLIO CESAR ELÓI BITENCOURT

2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

JÚLIO CESAR ELÓI BITENCOURT

**DESENVOLVIMENTO DE NOVO AGENTE DE CONTRASTE IODADO PARA
NANO-SISTEMAS PARA IMAGEAMENTO POR RAIOS-X.**

Dissertação como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Biologia Animal, pelo Programa de Pós Graduação
em Biologia Animal da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof.Dr. João Paulo Longo Figueiró

BRASÍLIA
2015

Dedico este trabalho a minha esposa Cássia Bitencourt, a minha mãe Núbia Helena Ferreira Bitencourt e a minha família, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades que me tem concedido.

Como esta dissertação é resultado de uma longa caminhada, agradecer pode ser uma tarefa hercúlea. Para não ser injusto, agradeço de antemão a todos que, de alguma forma, passaram pela minha vida e contribuíram para que eu chegasse até este ponto.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

À minha esposa Cássia Martins Elói Bitencourt que é e sempre foi meu esteio. A pessoa que me dá força e sonha junto comigo. Por sua capacidade de acreditar em mim e investir em mim. Sem ela não teria chegado a este dia.

Agradeço a minha mãe, Núbia Helena Ferreira Bitencourt, heroína que abriu a porta para que eu pudesse estar hoje aqui, me deu apoio e incentivo nas horas difíceis. Ao meu pai, Jacinto Antônio Bitencourt, cuja presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

Agradeço a minha sogra Néli Martins que sempre me apoiou e contribuiu para que este sonho pudesse ser concretizado.

Agradeço também a meu professor orientador, Prof. Dr. João Paulo Longo Figueiró, pela gigantesca paciência na orientação e pelo incentivo que tornou possível a conclusão desta dissertação. Sem sua orientação e apoio não estaria aqui hoje.

Agradeço também ao professor de química, Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado, que pacientemente me auxiliou em todas as etapas químicas e tratamento de dados.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo que acreditou que este mestrado era viável e possível.

Agradeço ao aluno do Instituto de Química Nichollas Serafim que fez possível toda a produção química dos compostos e pelo tratamento dos dados coletados. Sem ele o projeto não teria ido para frente.

À Sra. Zélia Ramos, pela sua competência, dedicação e empenho em administrar o nosso laboratório e auxiliar não somente a mim, mas a todos os estudantes com seus trabalhos.

Meus agradecimentos aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia e do Laboratório de Química que fizeram parte da minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pela oportunidade de fazer o curso.

Ao Instituto de Ciências Biológicas, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram este tempo de crescimento e amadurecimento.

Aos professores doutores João Paulo Longo Figueiró, Sacha Braun Chaves e Luis Alexandre Muehlmann, que compuseram a banca examinadora dessa dissertação, pela leitura cuidadosa do meu trabalho e pelas valiosas observações e sugestões.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

“...Até aqui nos ajudou o Senhor.”

1 Samuel 7:12

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 História do raio-x.....	2
1.2 História dos agentes de contraste.....	3
1.3 Farmacocinética dos agentes de contraste.....	10
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
2.2.1 Avaliar a incorporação de iodo molecular nas Bases de Schiff.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Halogenação do óleo de girassol com iodo.....	24
3.2 Preparação de nanoemulsão iodada.....	24
3.3 Caracterização nanoscópica.....	26
3.4 Teste de liberação de iodo das nanoemulsões contendo ácidos graxos halogenados.....	26
3.5 Obtenção de imagem por raios-X pelo aparelho IVIS® LUMINA XR Series III.....	27
3.6 Preparação da Base de Schiff.....	27
4. RESULTADOS.....	30

4.1	Marcação do ácido graxo.....	32
4.2	Síntese da nanoemulsão.....	33
4.3	Identificação da capacidade ao raio-x.....	34
4.4	Síntese da Base de Schiff.....	37
4.5	Iodação da Base de Schiff.....	44
4.6	Ligação com cadeia carbônica.....	49
5.	DISCUSSÃO.....	56
6.	CONCLUSÃO.....	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (O/W)	Óleo em água
- μA	Micro ampere
- μl	Microlitro
- ^{232}Th	Tório
- 2D	Bidimensional
- 3D	Tridimensional
- C	Carbono
- C7	Cadeia de sete carbonos
- CH_2Cl_2	Diclorometano
- Cl	Cloro
- DTPA	Dietilenotriamina pento acético
- g	Gramas
- GI	Gastrointestinal
- H	Hidrogênio
- HAc	Acido acético
- HCl	Ácido clorídrico
- I	Iodo
- <i>in situ</i>	No lugar
- Kda	Kilo Dalton
- KMnO_4	Permanganato de potássio
- Kv	Quilo volt

- mg I/ml	Miligrama de iodo por mililitro
- mg	Miligrama
- mg/ml	Miligrama por mililitro
- MHz	Mega Hertz
- ml	Mililitro
- mmol	Milimol
- mol/L	Mols por litro
- mOsm/kg	Miliosmols por quilograma
- MRI	Magnetic resonance imaging (Imagem por Ressonância magnética)
- N	Nitrogênio
- NaOH	Hidróxido de sódio
- NE	Nanoemulsão
- nm	Nanômetro
- NP	Nanopartícula
- NPs	Nanopartículas
- O	Oxigênio
- OH	Hidroxila
- Osm/kg	Osmol por quilograma
- P.A.	Para análise
- PEG	Polietilenoglicol
- R1	Radical um
- RES	Sistema Retículo endotelial

- RMN	Ressonância Magnética Nuclear
- rpm ´s	Rotações por minuto
- TA	Temperatura ambiente
- UK	United kingdom (Reino Unido)
- XIX	Dezenove
- XR	X-ray (Raio-x)
- Z	Número atômico
- Zs	Zetasizer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representantes de cada classe de contraste. A) Diatrizoato (monômero iônico). B) Iohexol (monômero não-iônico). C) Ioxaglate (dímero iônico). D) Iodixanol (dímero não-iônico). Adaptado de Shi-BaoYu and Alan D. Watson.

Figura 2. Caminho de circulação utilizado no modelo cinético. Adaptado de Anshuman Jakhmola, Nicolas Anton e Thierry F. Vandamme.

Figura 3. Preparação das bases de Schiff. Adaptado de Pier Giorgio Cozzi.

Figura 4. Fórmula da nanoemulsão lipídica.

Figura 5. Organograma de desenvolvimento da formulação nanoestruturada iodada para imageamento por raio-x.

Figura 6. A) Eppendorf com solução alcoólica iodada a 10% (10 mg I/ml) e B) eppendorf com mistura de óleo de girassol e solução alcoólica iodada a 10% (10 mg I/ml).

Figura 7. Representação da distribuição por número do raio hidrodinâmico em nanômetros das nanoemulsões contendo óleo de girassol iodado. A curva representa a distribuição Gaussiana das frequências de tamanhos quantificadas pelo equipamento Zetasizer pelo método de Dispersão Dinâmica da Luz.

Figura 8. Nanoemulsão com 3 mg I/mL.

Figura 9. Reação de formação da Base de Schiff

Figura 10. Condições reacionais de redução da forma imina para amina da Base de Schiff.

Figura 11. Mecanismo de formação do ácido acético a partir do anidrido acético.

Figura 12. Espectro de RMN 1H Base de Schiff.

Figura 13. Espectro de RMN 1H Base de Schiff reduzida.

Figura 14. Mecanismo de redução da forma imina presente na Base de Schiff para amina.

Figura 15. Mecanismo de halogenação do anel aromático dissubstituído contendo sítios doadores e retiradores de elétrons.

Figura 16. Comparativo da Base de Schiff iodada com a água na absorção de raios-x.

Figura 17. Imagem de tomada radiográfica da Base de Schiff iodada. Na seção A observamos o mapa de localização das esferas representando as densidades radiográficas no modelo artificial. Em B, podemos observar a representação da densidade radiográfica estimada, artificialmente colorida, de diferentes tecidos biológicos, além de um tubo de poliestireno contendo a Base de Schiff iodada.

Figura 18. Ligação de cadeia C7 na Base de Schiff.

Figura 19. Iodação da Base de Schiff acoplada a cadeia C7.

Figura 20. A) Base de Schiff iodada com cadeias C7 possui maior absorção de raios-x que a água (B).

Figura 21. A Base de Schiff iodada – C7 demonstra maior densidade em relação ao sobrenadante (água).

Figura 22. Comparativo da mistura do óleo de girassol e solução alcoólica iodada a 10% e a Base de Schiff iodada com cadeias C7. Percebe-se uma inversão na densidade da Base de Schiff.

Figura 23. Base de Schiff iodada-C7 com alta absorção de raios-x evidenciado no aparelho Lumina em comparação com a amostra *in natura*.

Figura 24. Nanoemulsão de Base de Schiff iodada-C7 e sua absorção de raios-x comparado ao da água.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimentos diagnósticos de raio-x organizados por sistema corporal. Adaptado de Shi-BaoYu and Alan D. Watson.

RESUMO

Os agentes de contraste iodados atuais causam diversos efeitos adversos e não proporcionam imageamento por período maior que trinta minutos surgindo a necessidade pela busca por agentes de contraste que diminuam os efeitos adversos e propiciem um imageamento de longo prazo. Nesse sentido o desenvolvimento de um agente de contraste iodado nanoestruturado torna-se promissor uma vez que sua estrutura nano traz por si a diminuição dos efeitos adversos e esta permite controlar o tempo que o agente de contraste permanecerá no organismo fornecendo assim um imageamento mais prolongado. O presente estudo desenvolveu uma nova formulação nanoestruturada contendo agentes de contraste iodados para a utilização em raio-x utilizando duas vias de síntese, uma com carreadores nanoestruturado lipídicos, o que posteriormente demonstrou ser inviável, e a utilização das Bases de Schiff, que demonstrou ser promissora. Os carreadores nanoestruturados lipídicos demonstraram a impossibilidade de ligação covalente do iodo ao ácido graxo, fazendo com que o iodo se deslocasse facilmente para o meio, o que é inviável para um agente de contraste. As Bases de Schiff formadas se ligaram covalentemente ao iodo fazendo com que este não fosse para o meio fornecendo a formação de um agente de contraste seguro. Antes da iodação as base de Schiff foram acopladas a moléculas de ácido graxo de sete carbonos para conferir hidrofobicidade, o que é perfeito para formação de nanoemulsão. Logo após a Base de Schiff foi iodada. As estruturas, tanto lipídicas como a Base de Schiff com acoplamento com cadeia de sete carbonos e a estrutura iodada, tiveram suas capacidades de absorção de raio-x medidas no aparelho IVIS® LUMINA XR Series III. A base de Schiff iodada demonstrou uma capacidade de absorção de raio-x de cerca de 2,17 vezes maior que a água demonstrando ser excelente para a finalidade proposta. A base de Schiff iodada com cadeias C7 nanoemulsionada obteve a absorção de raio-x de cerca de 1,22 vezes maior que a água. O acoplamento com cadeias C7 à base de Schiff trouxe a inversão da densidade do óleo fazendo com que esta se tornasse mais pesado que a água provavelmente devido ao alto peso molecular conferido a base de Schiff com o acoplamento. A partir dos resultados obtidos foi observado que a base de Schiff iodada acoplada com cadeias C7 e nanoemulsionada é promissora como agente de contraste necessitando tão somente testes *in vivo* para completa certificação de um novo tipo de agente de contraste nanoemulsionado no mercado.

ABSTRACT

The current iodinated contrast agents cause many side effects and do not provide imaging for a longer period than thirty minutes resulting in the need for search for contrast agents that reduce adverse effects and which guarantee a long-term imaging. Accordingly the development of a nanostructured iodinated contrast agent becomes promising since their nano structure in itself brings reduction of adverse effects, and this allows to control the time that contrast agent remains in the body thereby providing a longer imaging. The present study developed a new formulation containing nanostructured iodinated contrast agents for use in x-ray using two synthetic routes, one with nanostructured lipid carriers, which subsequently shown to be feasible and use of Schiff bases which demonstrated be promising. The nanostructured lipid carriers demonstrated covalent bonding of iodine to the impossibility fatty acid, causing the iodine is readily displaced into the medium, which is not feasible for a contrast agent. The Schiff bases formed covalently iodine bound causing it go not to the medium providing formation of a safe contrast agent. Before the iodination, the Schiff base were coupled to fatty acid molecules of seven carbons to confer hydrophobicity, which is perfect for assembling nanoemulsion. Soon after the Schiff base was iodized. The structures of both lipid and the Schiff base with coupling to seven carbon chain and iodinated structure had their capabilities X-ray absorption measured on IVIS® LUMINA Series III XR device. The Schiff base iodinated x-ray showed an absorption capacity of about 2.17 times greater than the water proving to be excellent for the proposed purpose. The nanoemulsioned iodinated C7 chain Schiff base obtained X-ray absorption of about 1.22 times greater than water. Coupling with C7 chains brought Schiff base density inversion of the oil causing it to become heavier than water probably due to the high molecular weight given to Schiff base with the coupling. From the results obtained it was observed that nanoemulsioned iodinated C7 chain Schiff base is promising as a contrast agent requiring solely in vivo tests for full certification of a new type of nanoemulsioned contrast agent in the market.

1. INTRODUÇÃO

1.1 História do raio-x

A descoberta do raio-X ocorreu no final do século XIX, tendo sido descrita pelo físico alemão Wilhelm Roentgen. Pela primeira vez na história foi possível fotografar e identificar as estruturas do esqueleto humano utilizando técnicas não invasivas. Roentgen estava explorando o caminho dos raios elétricos que passam de uma bobina de indução através de um tubo de vidro parcialmente evacuado. Embora o tubo estivesse coberto de papel preto e o quarto estivesse completamente escuro, ele notou que uma tela coberta de material fluorescente foi iluminada pelos raios. Logo ele percebeu que os objetos poderiam ser penetrados por estes raios e que a imagem de sua própria mão diferenciou os ossos dos tecidos moles. Intuitivamente ele usou uma chapa fotográfica ao invés de uma tela e capturou a primeira imagem de raio-x que foi a da mão de sua esposa com o anel de casamento.(1-2)

Nos primeiros vinte anos seguintes depois da descoberta de Roentgen o raio-x foi usado para diagnosticar soldados feridos que lutaram na Primeira Guerra Mundial encontrando fraturas ósseas e balas incrustadas o que levou a técnica a notoriedade fazendo com que fossem produzidos muitos instrumentos de raios-x. Foi somente no início da década de 1900 que foi observado que o efeito nocivo dos raios-x poderiam ser poderosos instrumentos na luta contra o câncer e doenças de pele. Em uma trágica história, o próprio Roentgen foi vítima de câncer, provavelmente relacionado à alta exposição de fontes de raio-x. (1-2)

1.2 História dos agentes de contraste

Com base na descoberta de Roentgen, surgiu uma área da medicina diagnóstica conhecida por imageologia médica. As tomadas radiográficas revolucionaram o potencial diagnóstico com técnicas não invasivas, sendo muito útil para a observação dos tecidos mineralizados do corpo, como ossos e dentes. (3)

O princípio de formação das imagens radiográficas se baseia no fato de que algumas regiões anatômicas, estruturas mineralizadas, possuem a capacidade de absorver parte dos raios-x incididos, enquanto outras, tecidos moles, absorvem em pouca quantidade. Nesse contexto, uma imagem anatômica com regiões radio-densas, que absorvem raio-x, e radio-lúcidas, que permitem a passagem do raio-x, é formada. (3)

Uma evolução da técnica foi alcançada pelo desenvolvimento de agentes de contraste de raio-x que possibilitaram a identificação diagnóstica não só de tecidos mineralizados, mas também de tecidos moles. Os agentes de contraste de raio-x são substâncias de alto peso molecular que possuem a capacidade de absorver feixes de raio-x. Se administrados aos pacientes para a obtenção das imagens radiográficas, os agentes de contraste podem se acumular em determinadas regiões anatômicas e criar novas áreas radio-densas nas imagens radiográficas. Essas novas imagens radio-densas “artificiais” permitiram a observação não

invasiva de estruturas anatômicas antes indetectáveis nas tomadas radiográficas tradicionais.

(4)

Historicamente os primeiros agentes de contraste desenvolvidos foram o sulfato de bário (administrado via oral) e formulações iodadas (administradas por injeção intravenosa, intra-arterial) que foram descritos na década de 1910. Até hoje o sulfato de bário é utilizado nos Estados Unidos em milhões de procedimentos de raio-x como avaliação radiológica do tubo digestivo. O seu desenvolvimento não evoluiu com o passar do tempo e ao longo dos anos não houve uma melhora significativa nas formulações dos diversos agentes de contraste que permitissem uma redução dos efeitos adversos e uma estrutura molecular que permitisse uma biodistribuição diferenciada. Somente os agentes iodados conseguiram uma evolução um pouco mais diferenciada. Em 1923 Osborne e colegas, na Clínica Mayo, perceberam que a solução de iodeto de sódio quando administrada via oral ou intravenosa produzia opacificação da bexiga o que levou estes compostos a serem usados em estudos radiológicos de excreção renal. (7)

Em 1954 surgiu uma forma iônica de agente de contraste iodado, o 1,3,5-triiodobenzeno que é considerado a primeira geração de agentes de contraste de raios-X desenvolvido para uso intravascular geral que recebeu o nome de ácido diatrizóico ou diatrizoato. Mas havia um

problema, a alta osmolaridade deste produto ($1,57 \text{ osm kg}^{-1}$ para 300 mg de solução de iodo ml^{-1}) gerava quimiotoxicidade. A partir desta descoberta quatro classes distintas de moléculas ativas, com base nesta plataforma aromática, surgiram. Os representantes de cada classe de agentes de contraste estão representados na Figura 1.(5)

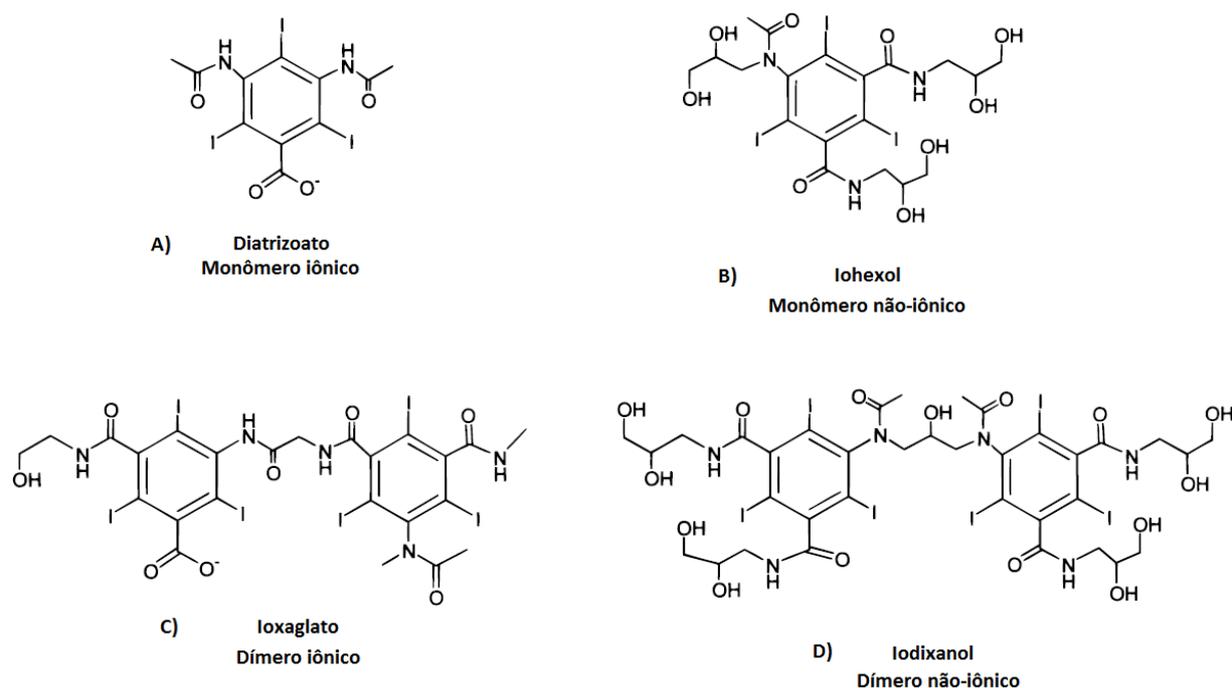


Figura 1. Representantes de cada classe de contraste. A) Diatrizoato (monômero iônico). B) Iohexol (monômero não-iônico). C) Ioxaglato (dímero iônico). D) Iodixanol (dímero não-iônico). Adaptado de Shi-BaoYu and Alan D. Watson. (5)

Foi em 1960 que houve um grande desenvolvimento dos agentes de contraste para raios-x trazido por Torsten Almén, radiologista sueco. Este hipotetizou que os efeitos adversos se davam devido a uma sobrecarga da homeostase do organismo pela adição rápida de grandes quantidades de agente de contraste de alta osmolaridade.(4)

Devido à descoberta de Almén, foi desenvolvido em 1970 a segunda geração de contrastes iodados que possuem como característica serem de baixa osmolaridade ($0,67 \text{ osm kg}^{-1}$), solúveis em água e não iônicos como o iohexol. Ainda hoje são muito utilizados sob os nomes comerciais Omnipaque e Exypaque. Uma das grandes vantagens da osmolaridade ser um pouco reduzida é que houve diminuição das reações adversas graves e o grau de dor após a injeção foi muito reduzido. Mais tarde, uma forma dimérica foi introduzida, uma nova classe de meios de contraste com osmolalidade significativamente menor do que os monómeros não iônicos começou a ganhar força, dímeros não iônicos como o iodixanol (nome comercial: Acupaque e Visipaque, $0,29 \text{ osm kg}^{-1}$) formulados para ser isotônicos ao sangue. (6)

Ao longo dos anos a preocupação em se ter agentes de contraste com baixa osmolaridade e que tivessem reações adversas mínimas resultou em modificação de alguns agentes de contraste. Houve a esterificação com meglumina dos análogos do ácido triiodobenzóico ou a sua conversão ao sal de sódio que trouxe uma grande melhoria da solubilidade destes compostos que em solução produzem tanto cátions como ânions, mas somente a forma aniônica é rádio opacificante porque possui o iodo. Portanto, esta nova geração de agentes de contraste rádio-opacificante como o iopamidol, iohexol, ioxaglato, iotrol e iopromida trouxeram o benefício de reduzir significativamente os efeitos fisiológicos

produzidos em angiografia e em raio-x convencional com as concentrações de iodo que se aproximavam de 3 mol/L (380,7 mg/mL). Na grande maioria dos exames radiográficos os agentes de contraste são injetados em altas concentrações. Após o advento da angiografia digital é possível se conseguir um bom contraste com uma concentração de iodo inferior pelo aumento da sensibilidade dos equipamentos utilizados nas tomadas radiográficas. Estes tem o benefício de produzirem efeitos adversos mínimos em curto prazo e são bem mais fáceis de usar. (7)

Devido a estes agentes de contraste iodados possuem estruturas dimensionais pequenas, apesar dos pesos moleculares altos (diatrizoato, 613; Iohexol, 821; iodixanol, 1550), estes possuem uma excreção renal rápida o que muitas vezes dificulta a tomada radiográfica. Uma alternativa no exame é a realização de uma infusão de agentes de contraste para manter os níveis de agentes iodados sempre elevados, e assim permitir a tomada radiográfica de maneira adequada. (6)

Tendo em vista esta limitação farmacocinética dos agentes de contraste, algumas formulações iodadas para exames radiográficos foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos com o intuito de aumentar o tempo de circulação destes agentes na corrente sanguínea. Entre estas, podemos citar os agentes de iodo padrão encapsulados em lipossomas, o polímero

disprósio-DTPA-dextrano, micelas poliméricas à base de PEG contendo iodo, brometo de perfluorooctyl, polilisina derivada ligada ao iodo, e iodo ligado a um núcleo de policarboxilato, entre outras. (6). Estas formulações têm por objetivo principal permitir que as tomadas radiográficas sejam realizadas sem a necessidade da realização de um processo de infusão contínuo dos agentes contrastantes.

Além da questão farmacocinética, aonde os agentes são rapidamente excretados, outras questões toxicológicas são importantes de se observar nos agentes de contraste. Sua toxicidade está vinculada a três aspectos importantes como coeficiente de partição, capacidade de ligação a proteína e densidade π -eletrônica no sistema de anel benzênico aonde qualquer aumento na densidade π -eletrônica aumenta a hidrofobicidade, enquanto qualquer redução na densidade π -eletrônica diminui a hidrofobicidade. As moléculas mais hidrofóbicas têm uma osmolaridade inferior. Para o desenvolvimento de novas moléculas de contraste iodado é importante observar a estabilidade, solubilidade, hidrofobicidade, osmolaridade e viscosidade. A viscosidade é o principal critério que se opõe aos outros porque todos os critérios que contribuem para melhoria da solubilidade, da pressão osmótica e da hidrofobicidade são inversamente proporcionais com a viscosidade. (8)

Pensando num maior desenvolvimento do aspecto farmacocinético e toxicológico surge a terceira geração de agentes de contraste que veio da fusão de agentes iônicos com não iônicos produzidos através do aumento do comprimento dos grupos secundários substituídos a fim de aumentar o peso molecular e reduzir a osmolaridade sem alterar a concentração de iodo. Os novos agentes têm osmolaridades de cerca de 0,60 Osm/kg H₂O, metade desta proveniente dos agentes de contraste iônicos monoméricos (concentração de iodo de 300 mg/ml). Estes agentes de contraste não iônicos são bem tolerados porque não necessitam de um contra-íon, e possuem baixa osmolaridade. Além disso, por conta da sua maior hidrofília, devido ao mascaramento do núcleo hidrofóbico por cadeias laterais hidrofílicas, e a sua falta de carga, estes agentes de contraste não iônicos têm um reduzido potencial para interações, tornando-se mais inertes e menos tóxicos do que os agentes iônicos de baixa osmolaridade. (9)

1.3 Farmacocinética dos agentes de contraste

Quando os agentes de contraste são administrados para geração de imagens em raio-x o espaço de tempo ideal para obtenção destas imagens depende do comportamento farmacocinético do perfil do bolus (substância aplicada de uma só vez) do agente de contraste administrado ou calculado com base em modelos da circulação sanguínea. O agente de contraste deve estar em alta concentração na área alvo e deve coincidir com o tempo de geração de imagem e este é um dos problemas a superar com os atuais agentes de contraste tradicionais devido a sua rápida eliminação do organismo levando a uma pequena janela para obtenção de imagem. Este problema é superado com a formulação de nanoagentes de contraste que permitem um tempo de circulação maior possibilitando todo tipo de imageologia.

(10)

Um diagrama de fluxo do modelo cinético é apresentado na Figura 2 abaixo.

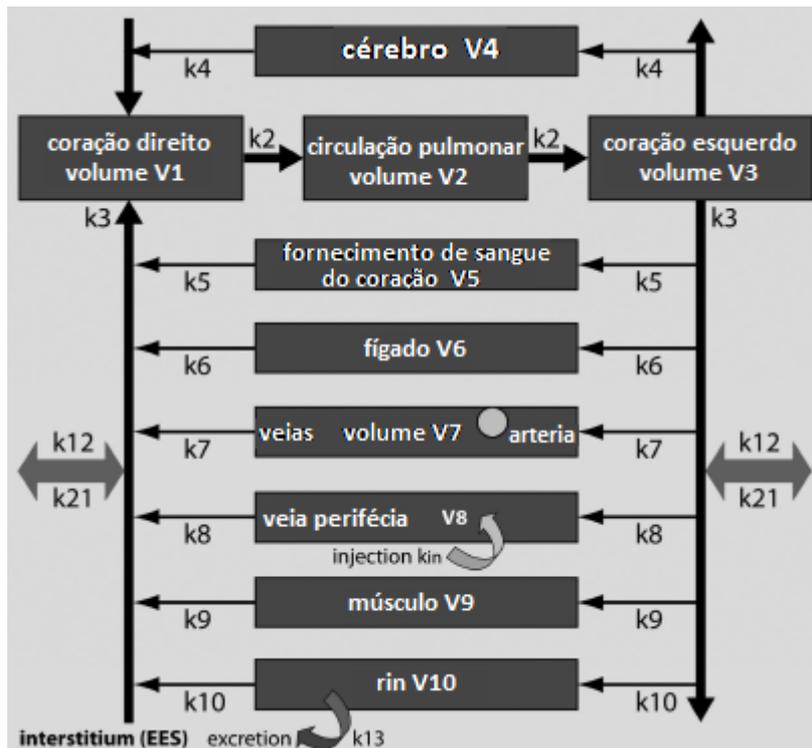


Figura 2. Caminho de circulação utilizado no modelo cinético. Adaptado de Anshuman Jakhmola, Nicolas Anton e Thierry F. Vandamme. (11)

Para se entender a farmacocinética dos agentes de contraste os volumes totais dos órgãos devem ser divididos em uma série de fragmentos menores, que são conectados em série, para atingir recirculação. Isso produz fluxos paralelos em vários órgãos, que são divididos em compartimentos menores, com conexões seriais. O agente de contraste é administrado numa veia periférica, conduzindo à veia cava, o coração direito, a circulação pulmonar, o coração esquerdo, e, finalmente, para a periferia. (11)

A farmacocinética destes agentes pode ser representada por um modelo de dois compartimentos. (12) Os picos de concentrações plasmáticas sempre ocorrem rapidamente, em boa concordância com o aumento de contraste do sangue, fígado, baço e outros órgãos. (13)

As maiores concentrações são obtidos com agentes de contraste de baixa osmolaridade em comparação com os agentes de alta osmolaridade. Esta observação leva a um melhor contraste dos tecidos. (14)

Hoje em dia, os agentes de contraste de raios-X iodados são usados em cerca de 20 milhões de procedimentos anualmente nos Estados Unidos, principalmente em raio-x e aplicações angiográficas. Devida a grande importância destes agentes e a gama de exames em que estes são utilizados a comunidade científica não mede esforços para o desenvolvimento de uma categoria completamente inovadora de agentes de contraste de raios-X como agentes nanoparticulados que tem sua farmacocinética completamente diferenciada possibilitando maior tempo na circulação. A tabela abaixo enumera uma série de procedimentos diagnósticos de raios X mais comuns que atualmente utilizam meios de contraste organizados de acordo com o sistema orgânico e via de administração. A frequência relativa dos procedimentos também é indicada e mostra que os procedimentos de administração intravascular gerais, que incluem imagens de órgãos e angiografia, são os mais significativos em termos de utilização de agente de contraste. (5)

Procedimentos diagnósticos de raio-x por sistema corporal

Sistema corporal	Procedimentos de diagnóstico	Técnicas	cota ^a
vasculatura	angiografia, arteriografia (arterias), venografia (veias), ventriculografia (câmaras do coração) e angiografia intervencional	administração IV ou IA de meio de contraste solúvel durante aquisição de imagem. Paciente é cateterizado para permitir administração de agente perto da região de interesse. Procedimento intervencional inclui procedimentos de remodelamento dos vasos como angioplastia, colocação de estente e arteriotomia, todos os quais são conduzidos usando visualização angiográfica. Procedimentos angiográficos tendem a usar largas quantidades de agente de contraste altamente concentrados. Administração IV geralmente incluídas de agentes de contraste antes da aquisição da imagem. Agentes frequentemente administrados como infusões. Atraso permite o agente acumular em tecidos específicos como tumores. frequentemente antes e depois das imagens de contraste serem adquiridas.	17%
órgãos	TC cerebral, TC abdominal, TC do fígado, hetsesplenografia (raio-x fígado e baço), pielografia IV (rin) e colecistografia (vesícula biliar)	Injeção direta de agente de contraste no canal espinhal ou espaço subaracnóide. Pode ser um procedimento muito dolorido e usa pequenos volumes de agentes não iônicos de baixa concentração. Administração de contraste através de cateter colocado na bexiga. Administração de agentes insolúveis no trato GI superior (oral ou via cateter) ou inferior (enema). Ar pode ser administrado para inflar órgãos.	54%
canal espinhal	mielografia (coluna) e cisternografia (cérebro)	Injeção direta de agente de contraste no canal espinhal ou espaço subaracnóide. Pode ser um procedimento muito dolorido e usa pequenos volumes de agentes não iônicos de baixa concentração.	2%
trato urinário e bexiga	pielografia retrograda e uretografia	Administração de contraste através de cateter colocado na bexiga.	3%
gastrointestinal	GI superior e inferior	Administração de agentes insolúveis no trato GI superior (oral ou via cateter) ou inferior (enema). Ar pode ser administrado para inflar órgãos.	22%
articulações cavidade uterina e trompas de falópio	arteriografia e discografia isterosalpingografia	Injeção de agente de contraste diretamente na articulação. Agente de contraste introduzido no útero e/ou nas trompas de falópio.	1% 1%

^aPorcentagem nos U.S.A de todos os aumentos de procedimentos padrões de raios-x por contraste (inclui raio-x, TC e fluoroscopia em 1998).

Tabela 1. Procedimentos diagnósticos de raios-x organizados por sistema corporal. Adaptado de Shi-Bao Yu and Alan D. Watson. (5)

Para que os agentes de contraste evoluam ainda mais e tragam maior benefício a imageologia médica é necessário o desenvolvimento de agentes que possuam propriedades e características otimizadas e que podem ser resumidas em cinco pontos: (I) Estes devem ser eliminados pelos rins e podem ser formulados sob a forma de sistemas nanoparticulados como lipossomas, nanoemulsões, ou dendrímeros de nanopartículas poliméricas com um tamanho mínimo de cerca de 100 nm (15-17). (II) A fim de conferir-lhe propriedade furtiva a suspensão de NP deve ter sua superfície controlada ou funcionalizada por polímeros hidrófilos, tais como polietilenoglicol (PEG) (18-22). A circulação prolongada na corrente sanguínea desta suspensão de NP está relacionada com o tamanho nanométrico destes agentes, juntamente com a funcionalização da superfície, impedindo a opsonização rápida pelo sistema reticulo-endotelial (RES) (19). (III) Os carreadores nano precisam conter uma grande quantidade de material de contraste para raios-X (normalmente iodo), de preferência cerca de 100 mg (ou mais) de iodo por mililitro de suspensão a ser administrado (23)(16-17). (IV) As suspensões de NP devem ser estáveis durante o armazenamento e ter uma elevada estabilidade *in vivo*, o que também afeta as propriedades furtivas e o tempo de permanência na corrente sanguínea. (V) Apesar da elevada carga de agentes de contraste, a suspensão de NP deve permanecer atóxica e neutra para o metabolismo biológico. (21)

Apesar do grande avanço obtido na imageologia de raios-x pouca atividade foi direcionada para o desenvolvimento de novos nanomateriais como agentes de contraste de raios-X até a última década, quando o número de publicações envolvendo nanomateriais como agentes de contraste de raios-X mais do que quadruplicou. O primeiro uso clínico generalizado de nanopartículas como agentes de contraste de raios-X em humanos ocorreu em 1930, quando o Thorotrast, uma suspensão de 3 a 10 nm de nanopartículas de dióxido de tório foi aplicado como um agente de contraste radiográfico; por causa dos efeitos da radiação em longo prazo e da carcinogenicidade significativa do ^{232}Th (tório), a aplicação clínica de Thorotrast foi abandonada depois de 20 anos. Devido à biocompatibilidade questionável de muitos elementos de número atômico elevado (Z), o número de materiais explorados para aplicações *in vivo* tem sido limitado. Hoje moléculas iodadas hidrofílicas mais seguras são universalmente utilizadas como agentes de contraste radiográfico. No entanto, um interesse renovado em agentes baseados em NP surgiu com a promessa de uma imagem mais detalhada e quantitativa e um maior potencial para aplicações terapêuticas. (24)

Devido a este interesse renovado nos compostos nanoparticulados há um grande estímulo no desenvolvimento de nanomateriais iodados. Há muita pesquisa sobre a incorporação de compostos orgânicos iodados em uma NP, com projetos que vão desde

emulsões (25-26), lipossomas (27), e lipoproteínas (28) para nanocompostos insolúveis (29-32) e NPs poliméricas (33-34), muitas das quais têm sido aplicados com sucesso in vivo (27-28)(30-34). O princípio do design para muitos desses nanomateriais tem sido simplesmente em aumentar as concentrações de iodo localizadas, resultando em maior contraste local em comparação com os compostos convencionais solúveis em água. Além de modificar as partículas para alterar o destino fisiológico e transporte, a dopagem com um composto iodado é usado para melhorar o contraste de raios-X para a finalidade de criar partículas multifuncionais (26,28,35). Apesar de o iodo ter um número atômico menor que o ouro e o bismuto, este tem um coeficiente de atenuação de massa elementar superior e energias de raios-X incidentes que são relevantes para imageologia radiográfica projecional. Uma comparação recente do desempenho de NPs de ouro com a de agentes de contraste iodados demonstrou que, sob condições utilizadas para a angiografia coronária, ambos os materiais trabalharam equivalentemente (36).

O designer racional dos agentes de contraste iodados nanoparticulados para raio-x com uma farmacocinética e taxas de excreção controladas é fundamental para solucionar as deficiências dos agentes moleculares de contraste iodados convencionais para raio-x e os agentes de contraste nanométricos. (37) Estes novos agentes de contraste vão ter prolongado a sua circulação sanguínea e o extravasamento vascular será limitado para produzir uma forte

melhoria nas amostras sanguíneas a doses substancialmente reduzidas. A degradação progressiva dos agentes de contraste iodados nanoemulsionados pode retardar significativamente a taxa de excreção renal, reduzir a concentração dos agentes iodados nos rins e minimizar o ataque agudo nestes, evita múltiplas injeções e também proporciona efeitos colaterais tóxicos substancialmente menores para os rins o que é muitas vezes causada por agentes de contraste iodados convencionais. (7,38,39)

Como alternativa viável a uma nova classe de contrastes iodados nanoemulsionados está as Bases de Schiff, também conhecida como “Salen”. Embora o termo Salen fosse usado originalmente apenas para descrever as bases de Schiff tetradentada derivadas da etilenodiamina, mais termos gerais do tipo Salen são usados na literatura para descrever a classe de [O, N, N, O] ligantes da base Schiff bis tetradentado. (40) A condensação de uma amina com um aldeído forma a base de Schiff que é uma das mais antigas reações em química. Os ligantes da base de Schiff coordenam com metal através do nitrogênio da imina e outro grupo, usualmente oxigênio, situado no aldeído original. Quando uma diamina é primeiramente combinada com 2 equivalentes de salicilaldeído, as bases de Schiff são formadas. Os ligantes apresentam dois sítios covalentes e dois sítios covalentes coordenados situados num arranjo planar (Figura 3). (41)

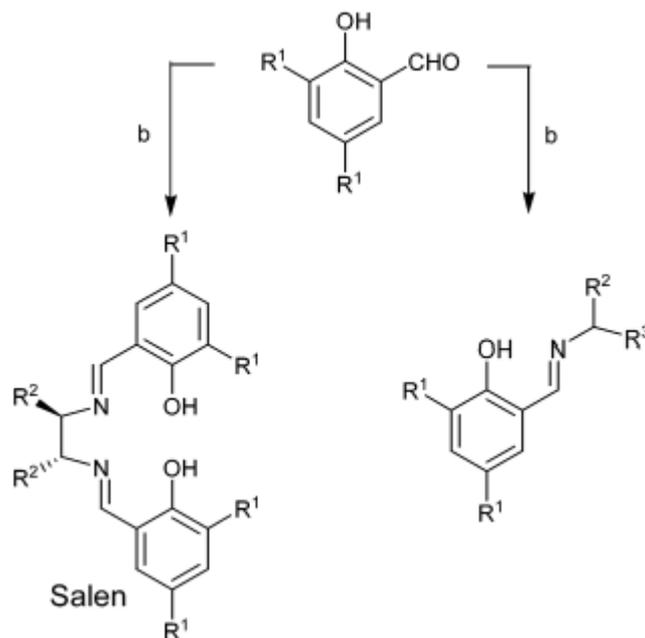


Figura 3. Preparação das bases de Schiff. Adaptado de Pier Giorgio Cozzi. (40)

Diferentes complexos da base de Schiff podem estar presentes em diferentes concentrações, como uma função da constante de equilíbrio. No entanto, a introdução de um grupo volumoso nas bases de Schiff pode controlar a identidade e homogeneidade do complexo, deslocando o equilíbrio para a formação de uma única espécie. A estabilidade dos complexos é regulada pela constante de equilíbrio. Com base nisso o presente trabalho tem por finalidade criar uma Base de Schiff tetraiodada nos radicais R1 da figura 3 e acoplar cadeias de 7 carbonos nos nitrogênios para controlar a homogeneidade do complexo e conferir a este característica hidrofóbica nos radicais R2 para que posteriormente possa ser nanoemulsionado para utilização em imageologia médica. (40) Por ser um processo de síntese de baixo custo,

essa estratégia de desenvolvimento foi planejado com o intuito de produzir um novo contraste de raios-X iodado hidrofóbico para serem incorporados a nanocarreadores lipídicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver uma formulação nanoestruturada contendo agentes de contraste iodados para a utilização em raio-x.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a incorporação de iodo molecular nas bases de Schiff;

- o Determinar a melhor formulação para as bases de Schiff;
- o Avaliar a iodação das bases de Schiff;
- o Avaliar o acoplamento de cadeias carbônicas para conferir caráter hidrofóbico às bases de Schiff.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Halogenação do óleo de girassol com iodo

Para reação de halogenação do óleo de girassol foi preparado uma solução alcoólica de iodo P.A. Para a preparação da solução alcoólica a 10% foi pesado 10g de iodo P.A. e adicionado em proveta de 100ml e logo após adicionado quantidade suficiente de etanol absoluto para 100ml. (resultando em uma concentração final de 100mg I/ml).

Para a reação de halogenação, 5g de óleo de girassol foram pesados em um béquer (50ml). Para a condução da reação, 500µl de solução alcoólica de iodo a 10% foram acrescentados e o conjunto foi mantido em agitação magnética por 15 minutos a 30⁰ Celsius em sistema de fluxo laminar para a completa evaporação do álcool da solução iodada. A reação de halogenação de ácidos graxos é verificada pela alteração da cor da solução iodada, indicando o consumo do iodo pelas insaturações dos ácidos graxos.

3.2 Preparação de nanoemulsão iodada

A nanoemulsão (NE) lipídica foi sintetizada pelo método de auto-emulsificação de óleos e tensoativos. A fase oleosa da nanoemulsão foi composta por óleo de girassol (60 mg), óleo de rícino (240 mg), solução alcoólica de iodo a 10% (300 mg) (previamente descrita), surfactante - cremophor (600 mg).

Fase oleosa (1)	}	240 mg	óleo de rícino
		60 mg	óleo de girassol
		300 mg	solução alcoólica de iodo 10%
		600 mg	cremophor
+			
Fase aquosa (2)	}	10 ml	tampão fosfato pH 7,4

Figura 4. Fórmula da nanoemulsão lipídica.

A reação de halogenação do óleo de girassol foi realizada *in situ* durante a preparação da fase oleosa. A fase aquosa foi composta de tampão fosfato pH 7,4. Para síntese da nanoemulsão a fase oleosa foi agitada durante quinze minutos a trinta graus Celsius para completa evaporação do álcool (mistura da fase oleosa e halogenação *in situ*). A confirmação da reação *in situ* foi realizada pela observação da alteração da cor da amostra. Após este período a solução aquosa foi vertida na mistura auto-emulsificante. A nanoemulsão é formada imediatamente após a adição da fase aquosa ao sistema. A concentração final obtida de iodo foi de 30 mg I/ml. A razão molar entre óleo de girassol/iodo foi igual a 1,2.

3.3 Caracterização nanoscópica

A caracterização nanoscópica das nanoemulsões produzidas foi realizada pelo método de espalhamento dinâmico da luz utilizando o equipamento Zetasizer (Nano Zs, Malvern Instruments, UK). Para tanto, 50 µL da solução de nanoemulsão foram diluídos em 950 µL de água destilada. Esse conjunto foi transferido para um cubeta de poliestireno e o diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões em suspensão foi determinado no equipamento Zetasizer, em software próprio. (42)

3.4 Teste de liberação de iodo das nanoemulsões contendo ácidos graxos halogenados

Para o teste de liberação de iodo 200 µl da nanoemulsão iodada previamente preparada, foram adicionados a 800 µl de solução tampão e mantidos sob agitação por 4h. Após este período 500 µl desta solução foram centrifugados em filtro Amicon (poro 50 Kda). Foram centrifugados a 14.000 rpm's por 15 minutos. Para quantificação da quantidade de iodo o filtrado e o retido no filtro Amicon foram avaliados pela absorção de raios-x das amostras iodadas no aparelho IVIS® LUMINA XR Series III. Como controle da reação, a mesma proporção de uma solução aquosa de iodo (30 mg I/ml-10% Etanol) foi preparada e centrifugada nas mesmas condições para a verificação da passagem do iodo molecular pelo filtro Amicon.

3.5- Obtenção de imagem por raios-X pelo aparelho IVIS® LUMINA XR Series III

A quantificação da densidade radiológica foi mensurada no aparelho IVIS® LUMINA XR Series III. A unidade de medida, absorvância de raio-X, se refere à quantidade de energia incidida e transmitida sobre as amostras ($\text{absorção} = \log_{10}$) (energia incidida/energia transmitida). Para padronização da terminologia utilizada ao longo do texto iremos utilizar os termos radio-opaco (alta densidade radiológica) e radio-lúcido (baixa densidade radiológica) para a classificação das imagens radiológicas. Foi utilizada uma fonte de incidência com energia padrão de Raio-X (28 Kv 100 μ A) para todos os espécimes analisados. As imagens foram obtidas e coloridas artificialmente para a melhor evidência das áreas de alta radiopacidade das imagens. As escalas de absorção de raio-x estão apresentadas em todas as tomadas radiográficas.

3.6 Preparação da Base de Schiff

O processo de obtenção da Base de Schiff se deu através da redução das iminas presentes na Base de Schiff onde em um balão volumétrico de 100ml foram adicionados 10 gramas da Base de Schiff (37mmol) que foi solubilizado em 40ml de dicloro metano previamente seco com hidreto de cálcio e refluxo durante 2 horas.

Sob agitação magnética até a solubilização total da Base de Schiff, foram adicionados 8,0 gramas de triacetoxiborohidreto de sódio (agente redutor) (75mmol) em 4 porções de 2 gramas pausados de 30 em 30 minutos em banho térmico a temperatura ambiente. A reação prosseguiu durante 4 horas, então em um funil de separação foi feita uma separação por fases lavando o produto obtido inicialmente com 20ml de água por lavagem, a fase contendo dicloro metano foi secada e recristalizada utilizando acetona, os cristais foram lavados com acetona fria e então o produto limpo e purificado com aparência esbranquiçada foi pesado obtendo-se 72% de rendimento e para comprovar a formação do produto esperado uma análise de RMN foi realizada em metanol deuterado utilizando um equipamento de 600MHz

Para iodar a Base de Schiff pesou-se 1,015g de iodo molecular (4mmol) para 0,27g de Base de Schiff (1mmol) que foram agitados em 5ml de diclorometano durante 10 minutos até a total dissolução dos produtos. Logo após 0,2g de hidróxido de sódio foi adicionada a reação que imediatamente voltou a coloração amarelada, indicando o término da reação. O produto final foi lavado com uma solução 15% de bicarbonato de sódio.

Tendo a confirmação do produto obtido por ressonância, a etapa seguinte foi a utilização de um ácido graxo contendo uma cadeia com sete carbonos para a formação de um cloreto ácido. Em um balão volumétrico de 50ml foi adicionado 10ml do ácido heptanóico (70mmol) em 10ml de dicloro metano previamente seco, como todo o ácido foi solubilizado

foram adicionados 14,6 gramas de pentacloreto de fósforo em 4 porções de 3,64 gramas pausadas de 10 em 10 minutos devido a forte liberação de gás que ocorreu, a reação prosseguiu sobre agitação magnética e refluxo durante 4 horas e então o produto foi destilado utilizando um sistema de micro destilação, o produto obtido foi um líquido incolor não oleoso.

Com os dois produtos sintetizados, a etapa final foi o acoplamentos das cadeias carbonicas a Base de Schiff reduzida em um balão volumétrico de 25ml. Foi colocado 0,24 gramas da Base de Schiff (1mmol) que foi solubilizada em 5ml de dicloro metano e então 4mmol do cloreto de heptanoíla foi adicionado gota a gota à solução e a reação prosseguiu durante 4 horas. A reação foi acompanhada utilizando placas cromatográficas com eluente 80% Hexano – Acetato, foi observado a formação de diversos produtos que foram eliminados ao término da reação com lavagem no funil de separação utilizando pequenas porções de água e após isso foi utilizado um coluna cromatográfica de sílica com eluição de 85% Hexano – Acetato para a completa purificação do produto obtido.

4. RESULTADOS

Com base em todo o desenvolvimento de uma nova formulação nanoestruturada iodada para imageamento em raio-x foi realizado um organograma de procedimentos para que se pudesse alcançar a consecução do objetivo pretendido.



Figura 5. Organograma de desenvolvimento da formulação nanoestruturada iodada para imageamento por raio-x.

4.1- Marcação do ácido graxo:

A primeira hipótese do projeto foi a iodação do óleo de girassol para a sua posterior incorporação na nanoemulsão lipídica. Como observado na Figura 6, houve uma clara alteração de cor comparando a solução alcoólica de iodo (Figura 6A) com o óleo de girassol após o procedimento de halogenação (Figura 6B). Importante notar que as duas imagens foram obtidas com soluções com a mesma concentração de iodo (10 mg I/ml).

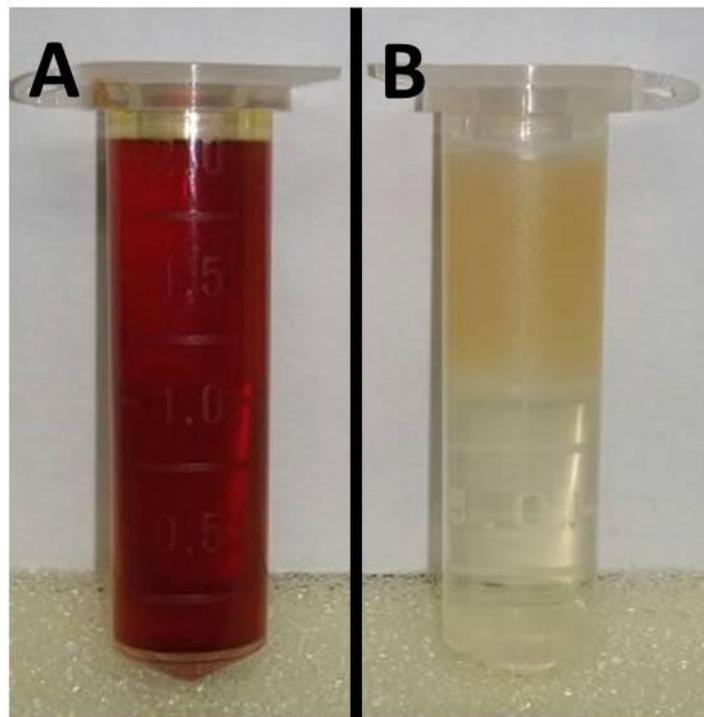


Figura 6. A) Eppendorf com solução alcoólica iodada a 10% (10 mg I/ml) e B) eppendorf com mistura de óleo de girassol e solução alcoólica iodada a 10% (10 mg I/ml)

4.2 Síntese da nanoemulsão:

Após a iodação do óleo de girassol foi produzido a nanoemulsão deste. Podemos observar na Figura 7 que a nanoemulsão contendo óleo de girassol iodado apresentou uma dispersão de óleo em água com gotículas de óleo em tamanho nanométrico. A distribuição gaussiana de tamanho de partículas quantificadas pelo método de dispersão dinâmica da luz demonstra que a nanoemulsão possui distribuição de tamanho unimodal, com pico em torno de 22,9 nm de raio.

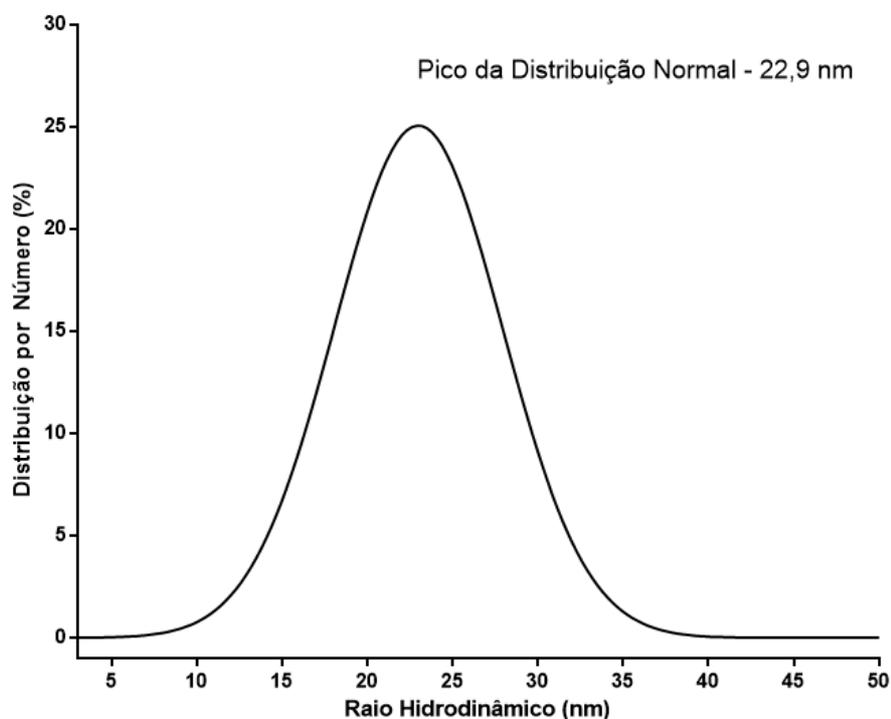


Figura 7: Representação da distribuição por número do raio hidrodinâmico em nanômetros das nanoemulsões contendo óleo de girassol iodado. A curva representa a distribuição Gaussiana das frequências de tamanhos quantificadas pelo equipamento Zetasizer pelo método de Dispersão Dinâmica da Luz.(43)

4.3- Identificação da absorbância de raio-x:

Após a nanoemulsão iodada ter sido preparada, 500µl desta foi colocada em filtro Amicon (poro 50 Kda) . Em outro filtro Amicon foi feito um controle da reação aonde foi colocado 500µl de solução alcoólica de iodo 3mg I/ml (10% Etanol) para centrifugar a 14.000 rpm's por 15 minutos. A centrifugação se deu nas mesmas condições para as duas amostras para verificação da passagem do iodo molecular pelo filtro Amicon. Ao final as amostras foram quantificadas quanto a absorção de raios-x no aparelho IVIS® LUMINA XR Series III (28 Kv 100 µA). O resultado demonstrou que a solução alcoólica de iodo teve o iodo totalmente filtrado não restando nenhum iodo no filtro Amicon. Já na nanoemulsão uma parte do iodo foi retido no filtro e outra parte passou pelo filtro o que indica que a parte retida no filtro estava nanoemulsionada e a parte que foi filtrada era o iodo livre que não estava nanoemulsionado.

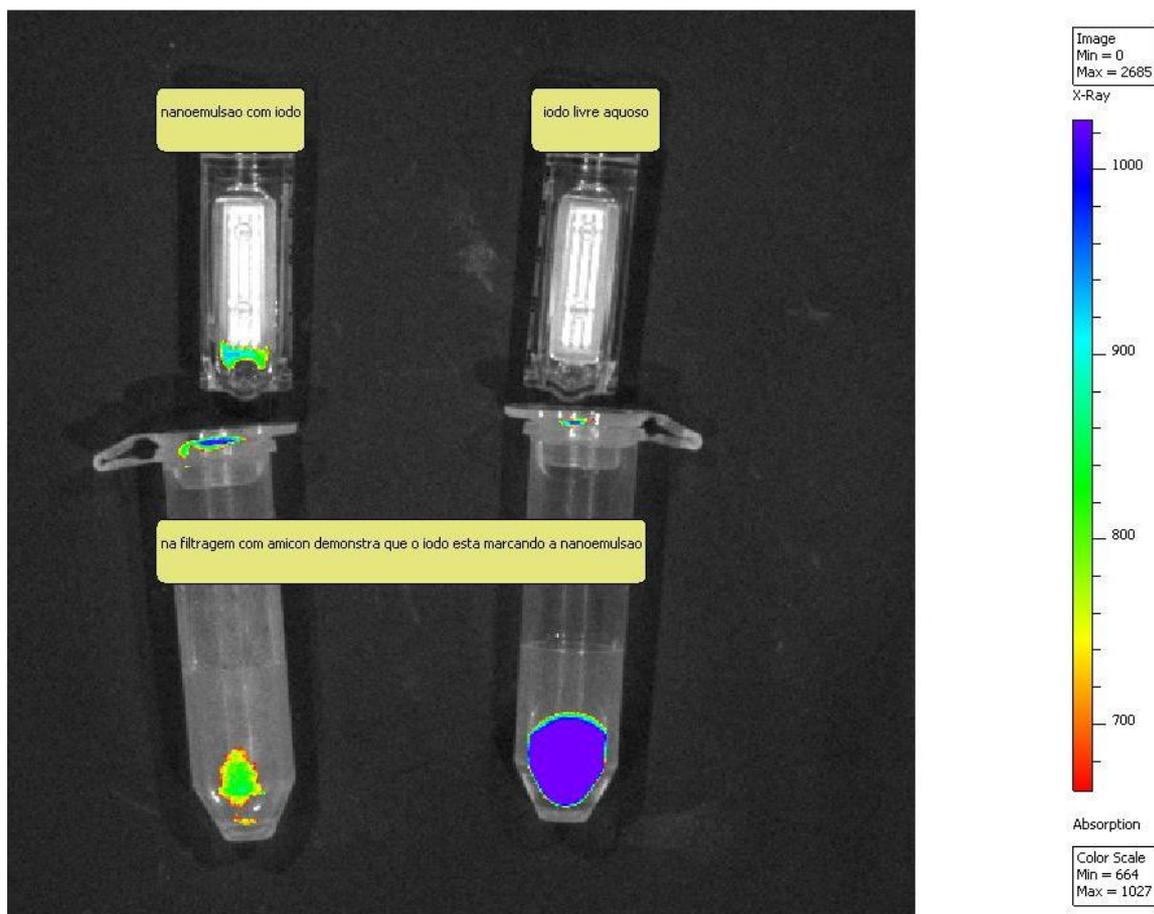


Figura 8. Nanoemulsão com 3 mg I/mL

Logo após a formação da nanoemulsão iodada com o óleo de girassol percebeu-se que a resposta obtida não foi satisfatória devido à termodinâmica desfavorável da adição de dois iodos em uma dupla ligação. Como a ligação ficou instável um agente de contraste baseado nesta hipótese seria perigoso de utilizar devido a possibilidade de ocorrência de reações posteriores. Portanto, surgiu a idéia de controlar esta ligação do iodo fazendo com que este não se dispusesse para o ambiente fora da nanoemulsão surgindo a idéia de indisponibilizar quimicamente o iodo bloqueando qualquer possibilidade de reação. Devido a esta necessidade

passamos para a segunda hipótese aonde utilizamos as Bases de Schiff para controlar as ligações do iodo.

4.4- Síntese da Base de Schiff:

Para desenvolver a Base de Schiff inicialmente houve a necessidade de reduzi-la com o intuito de fazer uma acilação alterando a polaridade do composto de interesse. Primeiramente foi necessário a secagem do ácido acético, que pela necessidade da redução, a água é um empecilho causando reações paralelas com o triacetóxi-boro hidreto de sódio ($\text{NaBH}_4(\text{Oac})_3$) liberando assim hidrogênio com o consumo de redutor que deveria ser utilizado na transformação da imina presente na Base de Schiff em uma amina. A secagem do ácido acético glacial se deu pela adição de 5% (w/w) de anidrido acético e 5% de KMnO_4 . O ácido acético glacial que posteriormente será utilizado no processo de redução de uma imina a uma amina (Figura 9) foi tratado aumentando a pureza do ácido.

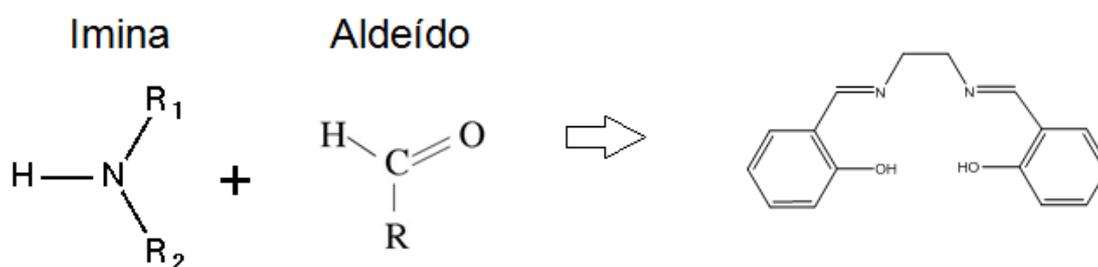


Figura 9. Reação de formação da Base de Schiff

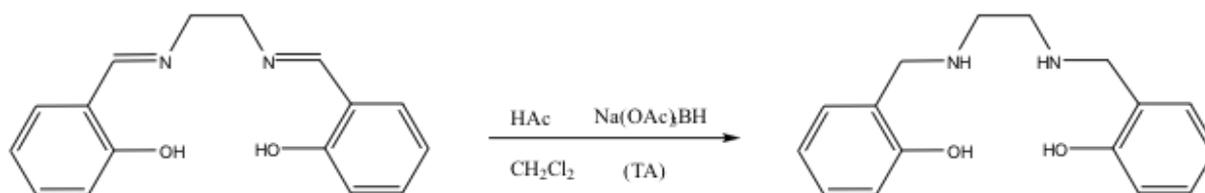


Figura 10. Condições reacionais de redução da forma imina para amina da Base de Schiff

Com o intuito de garantir uma reação do anidrido acético com água formando ácido acético, o permanganato de potássio, por ser um oxidante forte, remove a possibilidade de haver a formação de subprodutos em estados de oxidação intermediários, como álcool. Sob agitação magnética e refluxo, durante 4 horas, o produto obtido foi destilado a aproximadamente 118°C utilizando um sistema de micro destilação, assim, o ácido purificado foi reservado em um recipiente vedado com o intuito de evitar o seu contato com o ar, pois é sabido que o ácido acético glacial (por ser higroscópico) tem como forma mais estável a forma dissociada, formando um íon hidrônio e o carboxílate que por efeito de ressonância forma uma nova ligação dupla causado pelo par de elétrons livres que estavam contidos no oxigênio desprotonado. Com a quebra da dupla ligação já existente no oxigênio vizinho, o carboxílate é estabilizado, diminuindo assim a basicidade dos elétrons livres e então deslocando o equilíbrio dessa reação de dissociação para o lado dos produtos, explicando a higroscopicidade do ácido. O uso do anidrido acético é feito para consumir a água e formar mais ácido carboxílico.

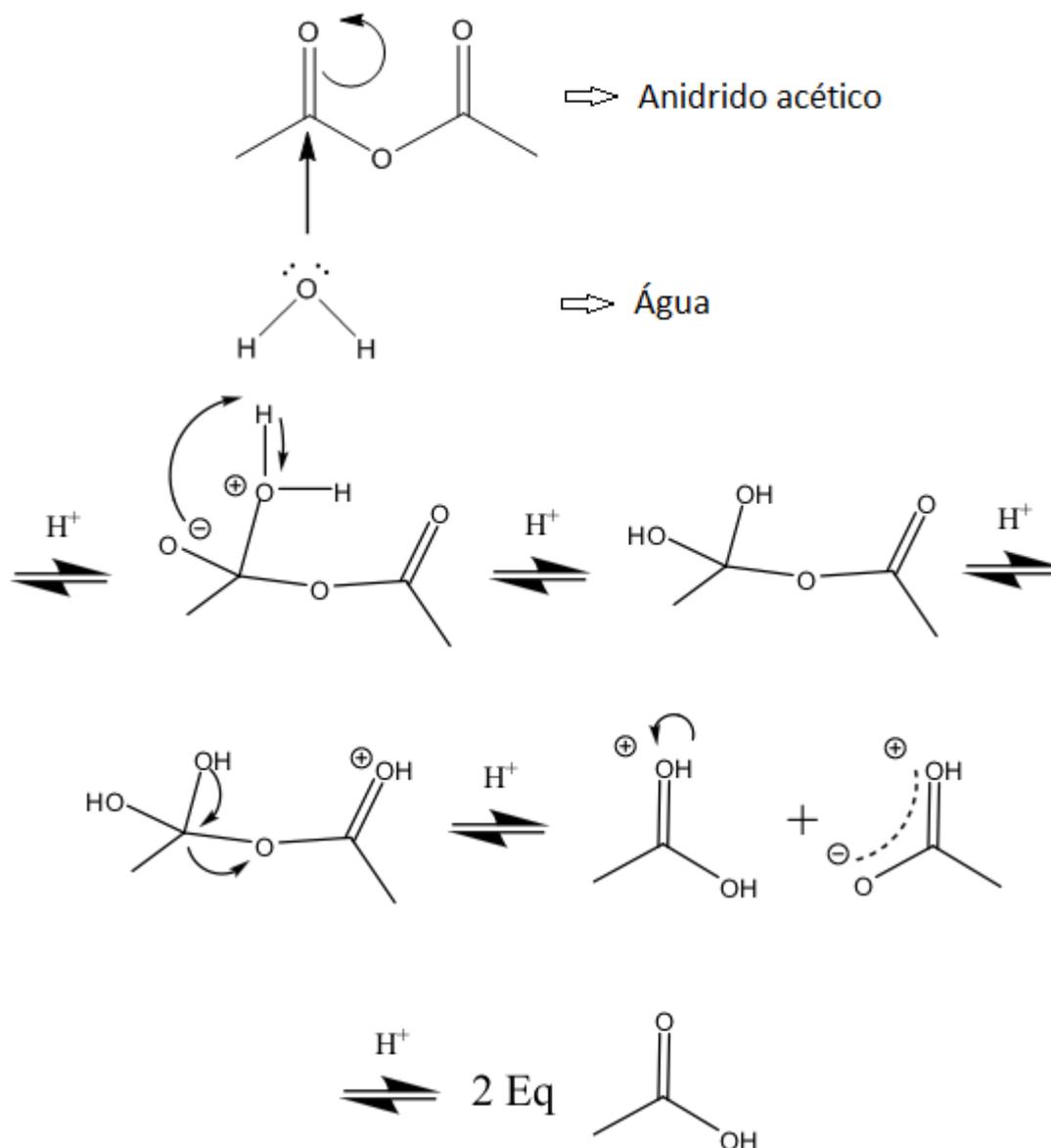


Figura 11. Mecanismo de formação do ácido acético a partir do anidrido acético.

Para se produzir a base Schiff foi solubilizado diclorometano (CH_2Cl_2) e o mesmo foi acidificado com ácido acético glacial previamente seco, e sob agitação magnética foi adicionado quatro porções do triacetoxiboridreto de sódio (reduzidor) a temperatura ambiente que foi mantida por banho térmico (a reação durou três horas).

Foi feito a base de Schiff e logo após a produção foi realizado um RMN para identificar se a reação estava indo na ordem correta.

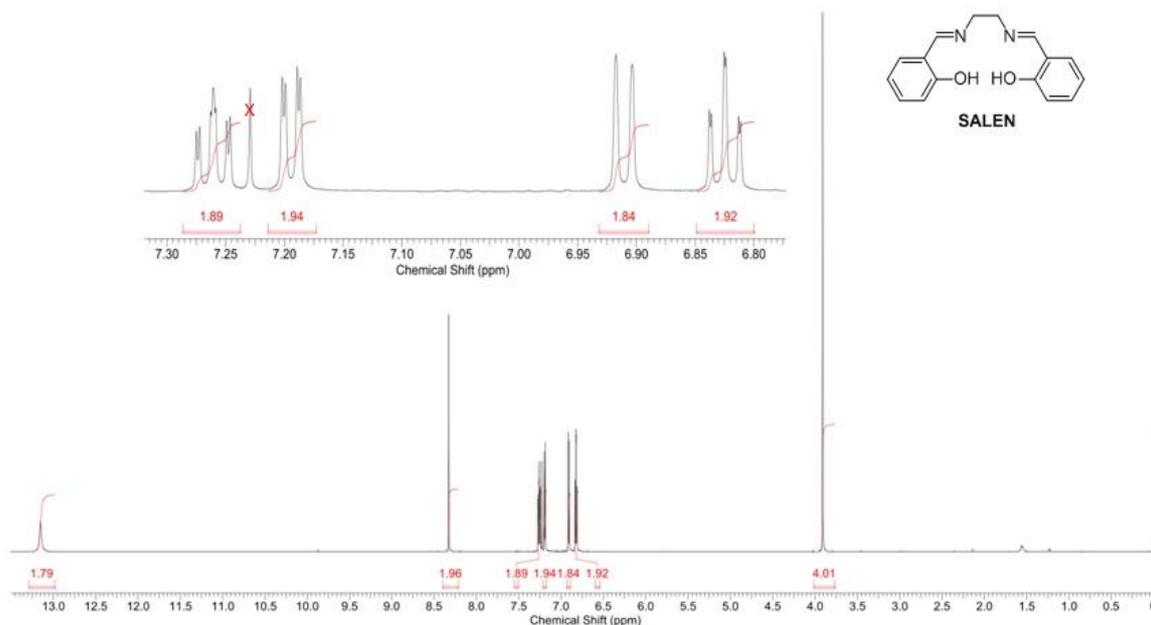


Figura 12. Espectro de RMN ¹H Base de Schiff.

O espectro de RMN¹H da BASE DE SCHIFF apresenta todos os sinais esperados. O simpleto em δ 13,18 integra para 2 hidrogênios e foi atribuído aos hidrogênios da hidroxila fenólica. Foi observado um simpleto em δ 8,35, integrando para 2 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono sp^2 da imina (C=N). Os hidrogênios do anel aromático apresentaram ressonância entre $7,29 < \delta < 6,93$ e se mostraram com multiplicidade diferente de simpleto em virtude dos acoplamentos do tipo J^3 e J^4 entre estes hidrogênios. Os hidrogênios da ponte etilênica, $-CH_2-CH_2-$ que liga os átomos de nitrogênio, apresentam-se como um

simpleto em δ 3,94, integrando para 4 hidrogênios. O sinal marcado com “X” corresponde ao sinal de clorofórmio residual presente no clorofórmio deuterado.

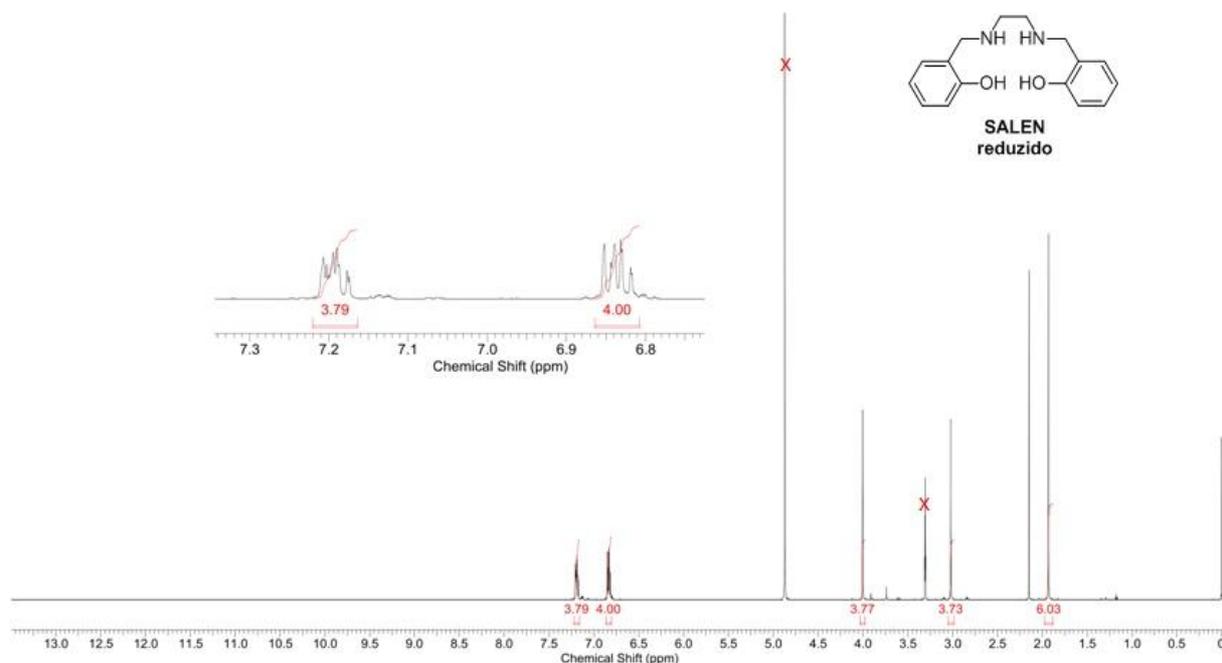


Figura 13 Espectro de RMN ¹H Base de Schiff reduzida.

O espectro de RMN¹H da BASE DE SCHIFF reduzida apresenta todos os sinais esperados. Os hidrogênios do anel aromático apresentaram ressonância entre $7,23 < \delta < 6,80$ e se mostraram com dois multipletos, cada integrando para 4 hidrogênios. Estes sinais diferem daqueles observados para a BASE DE SCHIFF em virtude da mudança do acentuado caráter eletroretirador, anteriormente presente no grupo imina (-C=N-), para o caráter fracamente retirador do grupo amino metila (-CH₂-NH-). Esta redução no caráter retirador de elétron diminui a blindagem eletrônica dos núcleos de hidrogênio dos anéis aromáticos e faz com que haja a coalescência de sinais anteriormente em δ 7,29 e δ 7,22, resultando no multipletos em δ

7,23-7,15, bem como aqueles em δ 6,93 e δ 6,85, resultando no multiplete em δ 6,87-6,80. Um simpleto em δ 4,00, integrando para 4 hidrogênios, foi atribuído ao metileno que liga o anel aromático ao átomo de nitrogênio, Ar-CH₂-NHR. O sinal dos 4 hidrogênios da ponte etilênica, -CH₂-CH₂- que liga os átomos de nitrogênio, que na BASE DE SCHIFF apresentaram ressonância em δ 3,94 se mostraram, ainda com simpleto, mas com redução no valor do deslocamento químico para δ 3,02. Esta deblindagem dos sinais foi atribuída ao menor efeito indutivo de retirada de densidade eletrônica que o grupo amina tem quando comparado ao grupo imina. Os hidrogênios das hidroxilas fenólicas e das aminas apresentaram-se como simpletos em δ 2,15 e δ 1,93, contudo, apenas com este experimento, não foi possível atribuir a que função química pertence cada sinal. Os sinais marcados com “X” correspondem aos sinais de metanol residual presente no metanol deuterado.

BASE DE SCHIFF - ¹H NMR (600MHz, CLOROFÓRMIO-d) δ = 13,18 (s, 2H), 8,35 (s, 2H), 7,29 (ddd; 8,9, 7,3 e 1,6 Hz; 2H), 7,22 (dd; 7,7 e 1,6 Hz, 2H), 6,93 (d, 8,2 Hz, 2H), 6,85 (td, 7,5 e 1,1 Hz; 2H), 3,94 (s, 2H).

BASE DE SHICFF reduzida - ¹H NMR (600MHz, METANOL-d₄) δ = 7,23-7,15 (m, 4H), 6,87-6,80 (m, 4H), 4,00 (s, 4H), 3,02 (s, 4H), 2,15 (s, 2H) e 1,93 (s, 2H)

O mecanismo de redução da Base de Schiff se dá da seguinte maneira:

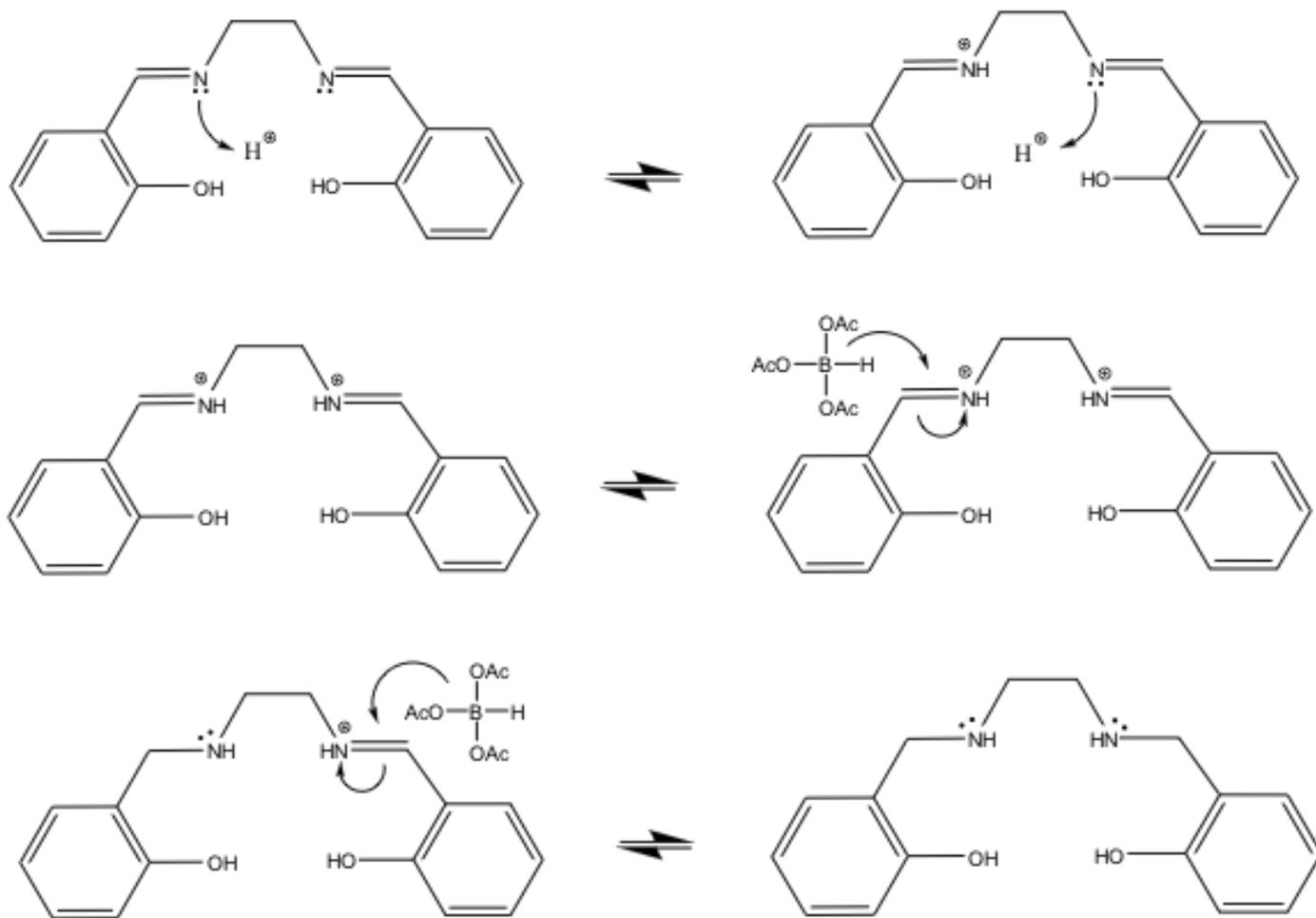
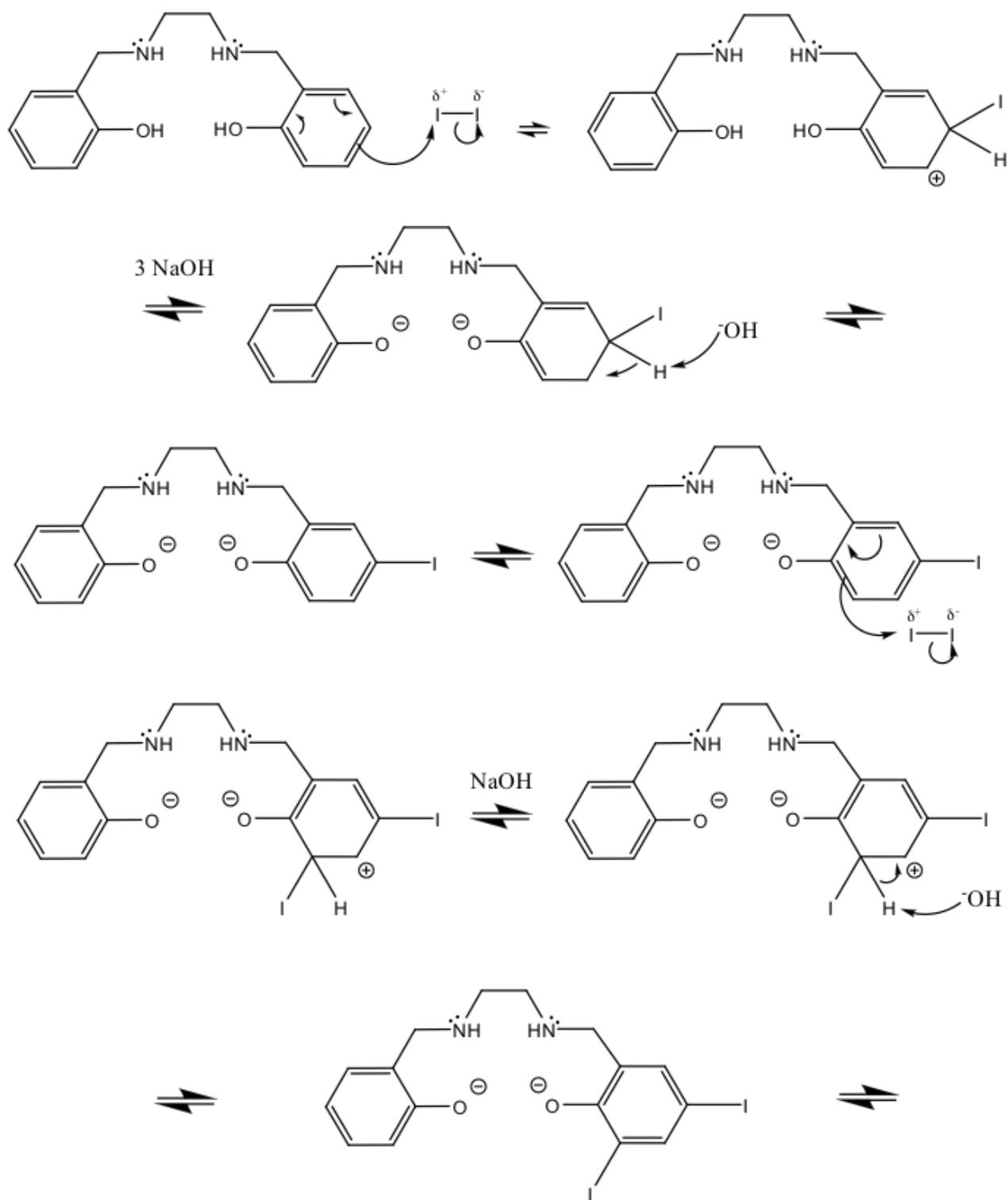


Figura 14. Mecanismo de redução da forma imina presente na Base de Schiff para amina.

4.5- Iodação da Base de Schiff:

Logo após foi realizado a iodação da base de Schiff que se deu da seguinte forma:



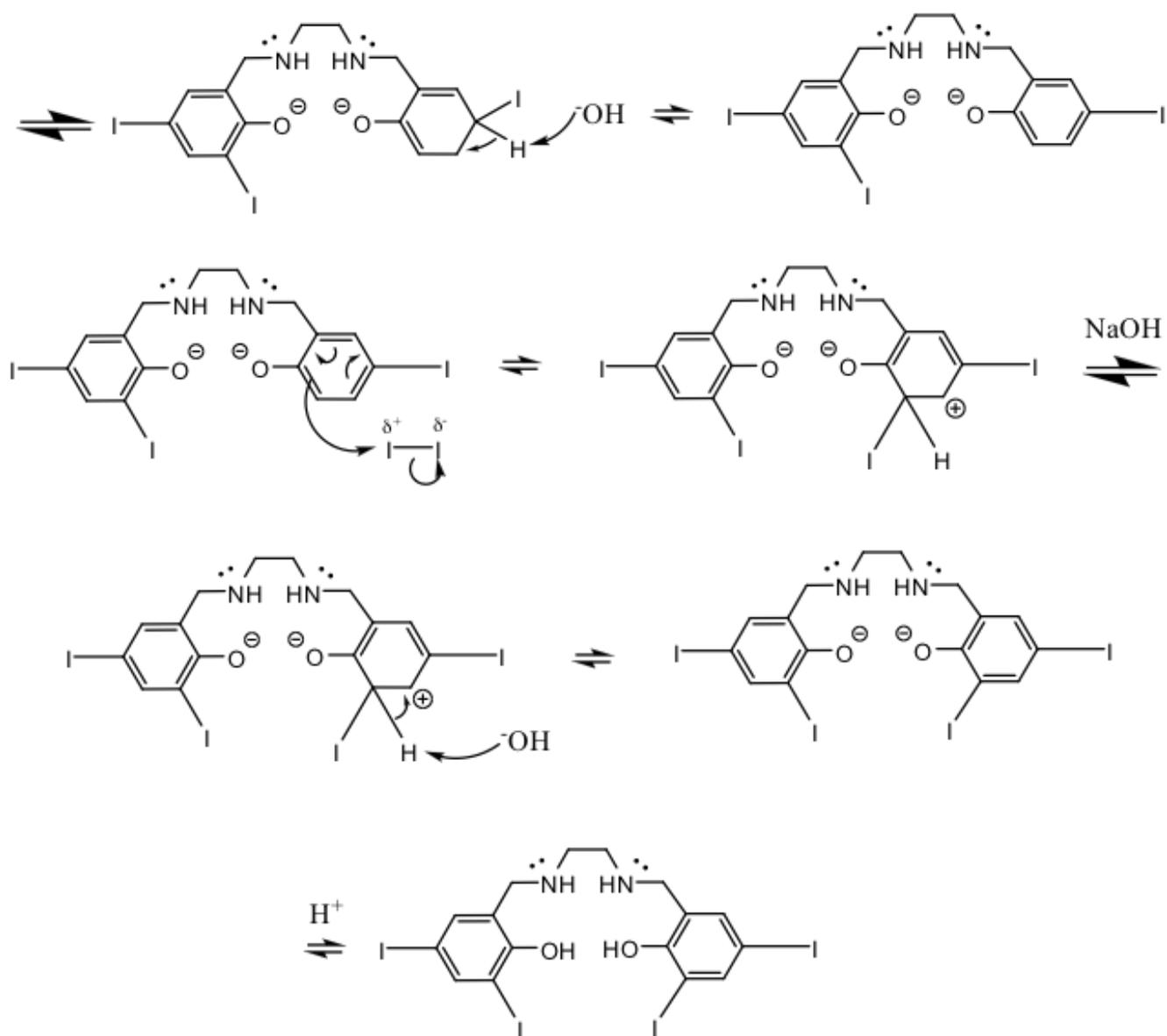


Figura 15. Mecanismo de halogenação do anel aromático dissubstituído contendo sítios doadores e retiradores de elétrons.

A estrutura final acima como modelo de molécula mais esperado, devido a orientação mais provável causada pelo grupo doador de elétrons mais forte, sendo este o fenol, orienta a entrada dos iodios na posição “orto” e “para” a ele. Entretanto pode haver reações paralelas

causando produtos multisubstituídos devido ao grupo retirador “amina” que orientaria as entradas dos iodios posteriores para este grupo funcional resultando em várias moléculas. Isto foi comprovado qualitativamente por observação experimental na qual o processo de iodação causa o aumento de polaridade na molécula, portanto, foi necessário o acoplamento de cadeias carbônicas para aumentar a hidrofobicidade do composto. Foi preferível inicialmente acoplar a cadeia carbônica e depois iodar o composto.

Após a Base de Schiff iodada ter sido sintetizada conforme a Figura 15 foi realizado o teste de absorção de raio-x deste produto no aparelho IVIS® LUMINA XR Series III (28 Kv 100 μ A) em comparação com a água (Figura 16) evidenciando que a Base de Schiff iodada absorve uma grande quantidade de raios-x.

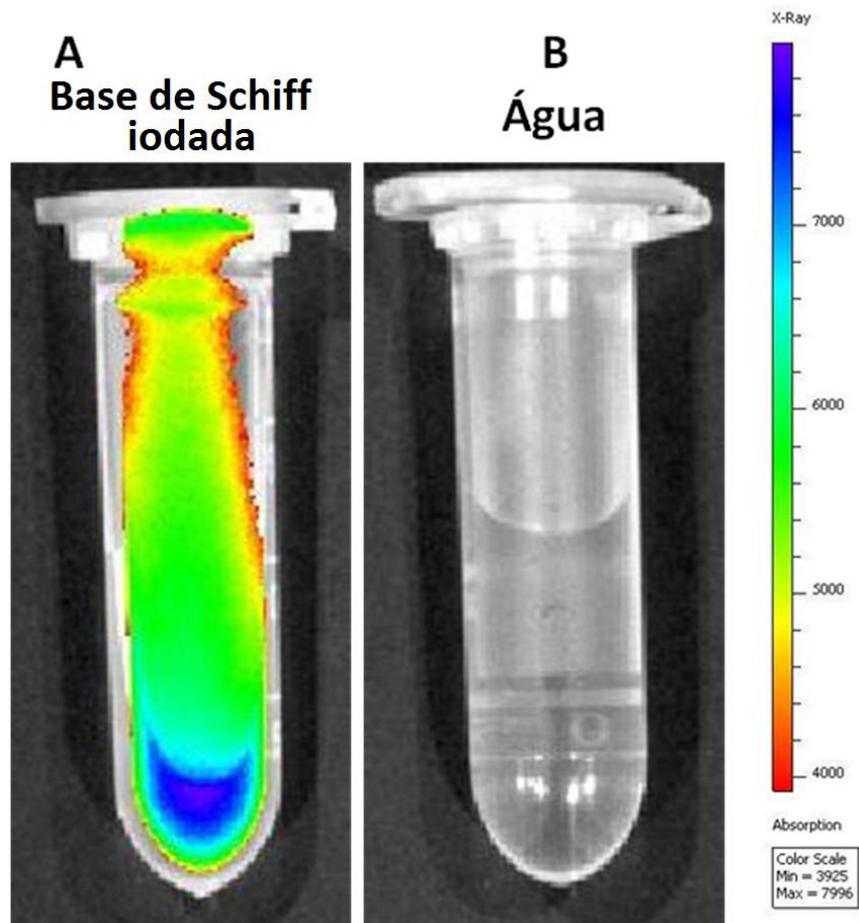


Figura 16. Comparativo da Base de Schiff iodada com a água na absorção de raios-x.

Podemos observar na Figura 17 abaixo a radiopacidade da Base de Schiff iodada no tubo de poliestireno. Em comparação com as densidades teciduais estimadas pelo modelo artificial, a Base de Schiff iodada apresenta radiopacidade ligeiramente inferior ao osso cortical, o que seria uma excelente característica para a sua utilização em formulações de contraste em raio-x.

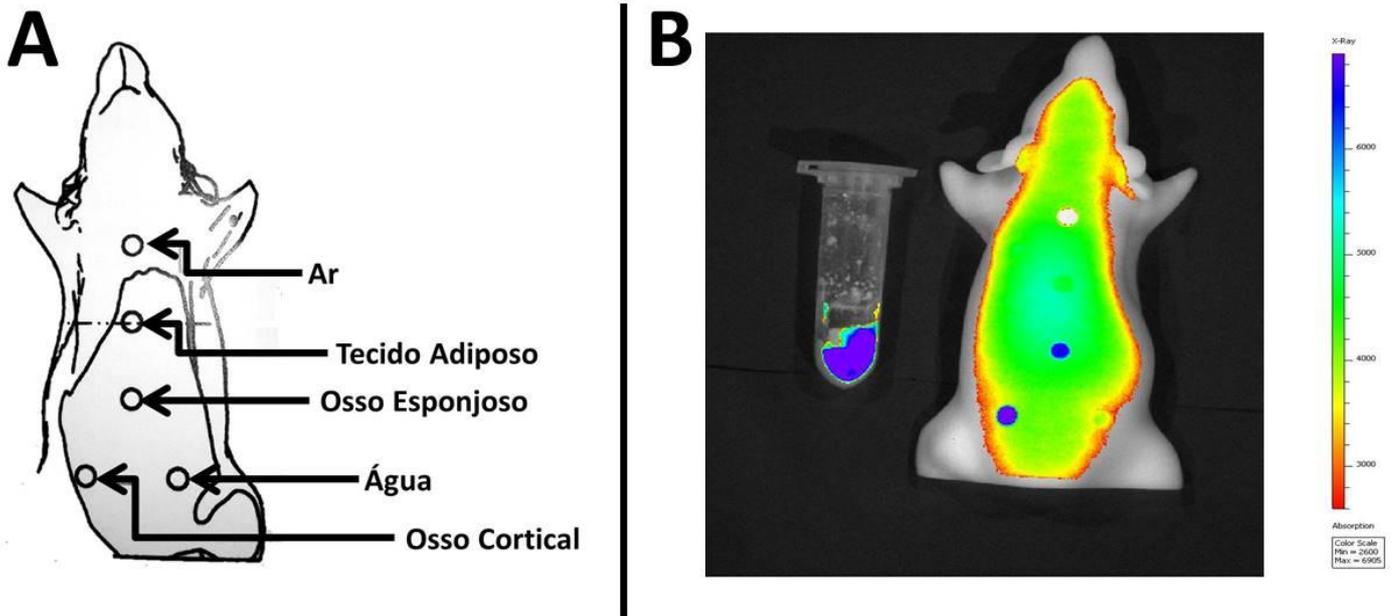
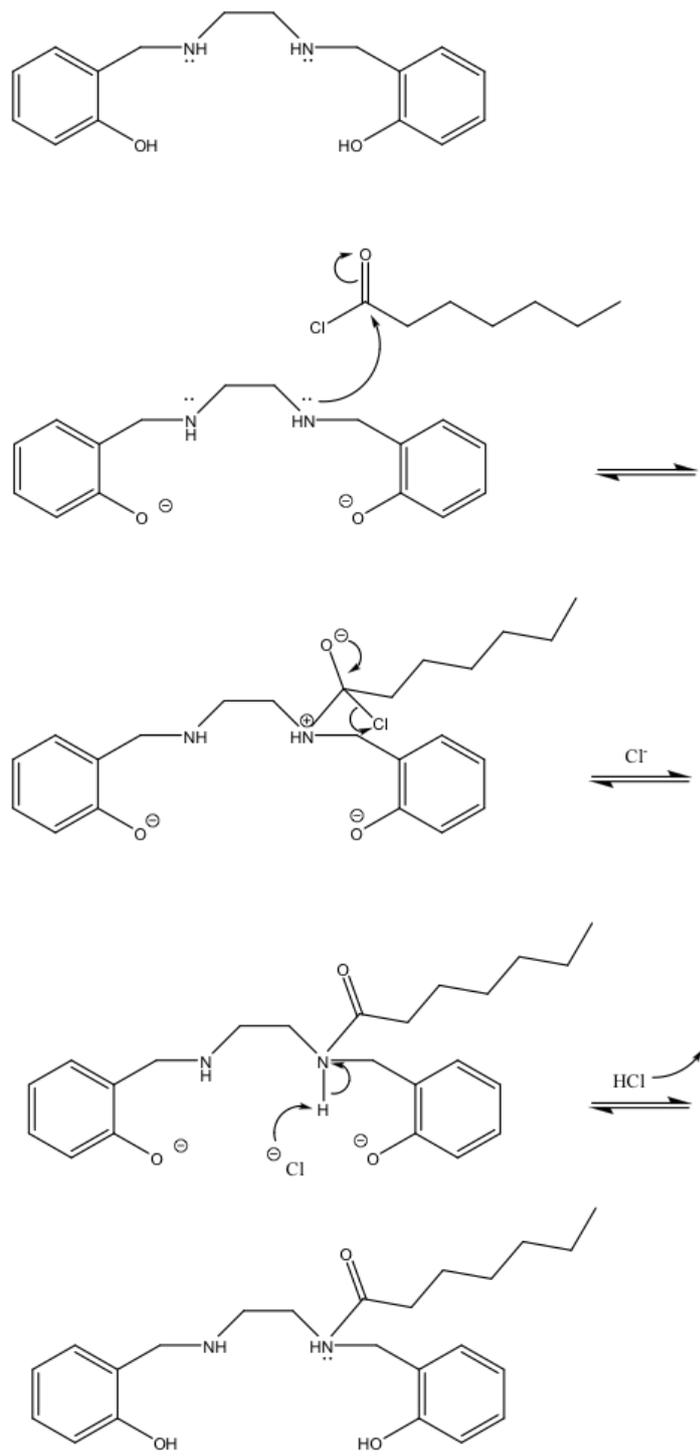


Figura 17. Imagem de tomada radiográfica da Base de Schiff iodada. Na seção A observamos o mapa de localização das esferas representando as densidades radiográficas no modelo artificial. Em B, podemos observar a representação da densidade radiográfica estimada, artificialmente colorida, de diferentes tecidos biológicos, além de um tubo de poliestireno contendo a Base de Schiff iodada.

4.6- Ligação com cadeia carbônica:

Depois que a Base de Schiff foi formada passou-se para a próxima etapa que foi sintetizar a Base de Schiff iodada com cadeia C7 (Figura 18) para trazer hidrofobicidade à molécula da Base de Schiff para quando esta for nanoemulsionada toda a Base de Schiff permaneça na nanoemulsão e não fora desta.



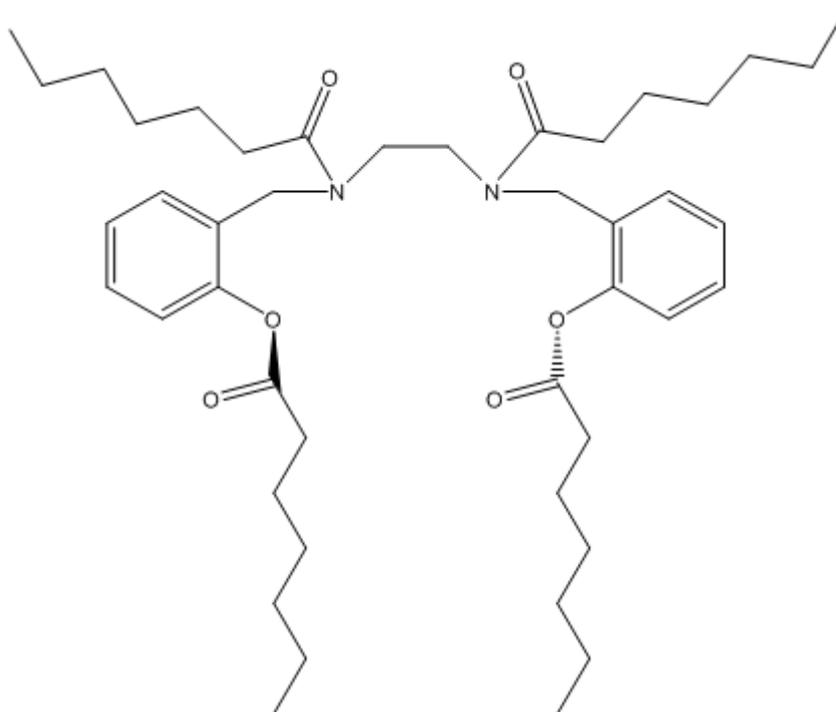


Figura 18. Ligação de cadeia C7 na Base de Schiff .

Após a ligação da cadeia C7 à Base de Schiff foi procedido a iodação segundo a figura 14 levando a formação do produto final que está representado na figura 19 abaixo.

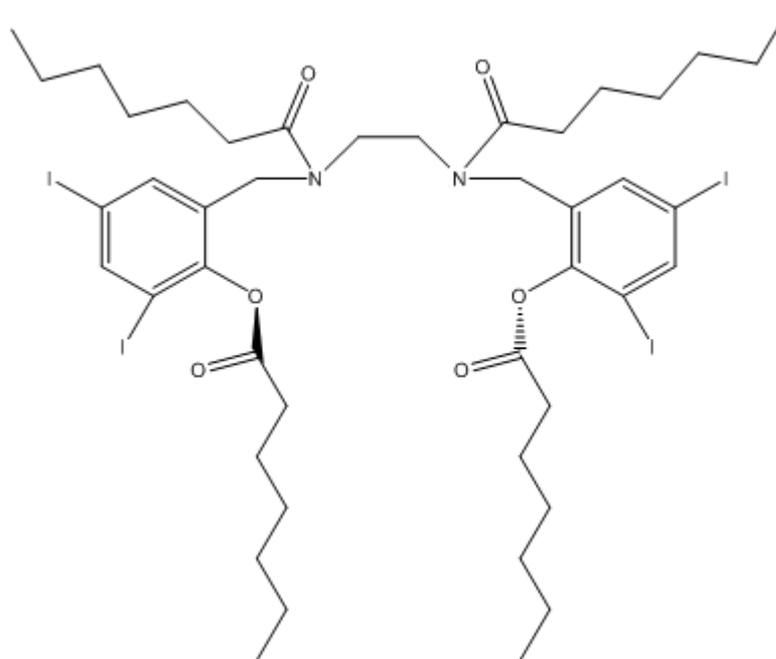


Figura 19. Iodação da Base de Schiff acoplada a cadeia C7.

Após o acoplamento com cadeias C7 e a iodação a figura 20 abaixo evidencia que houve maior absorção da Base de Schiff iodada com cadeias C7 do que a água.

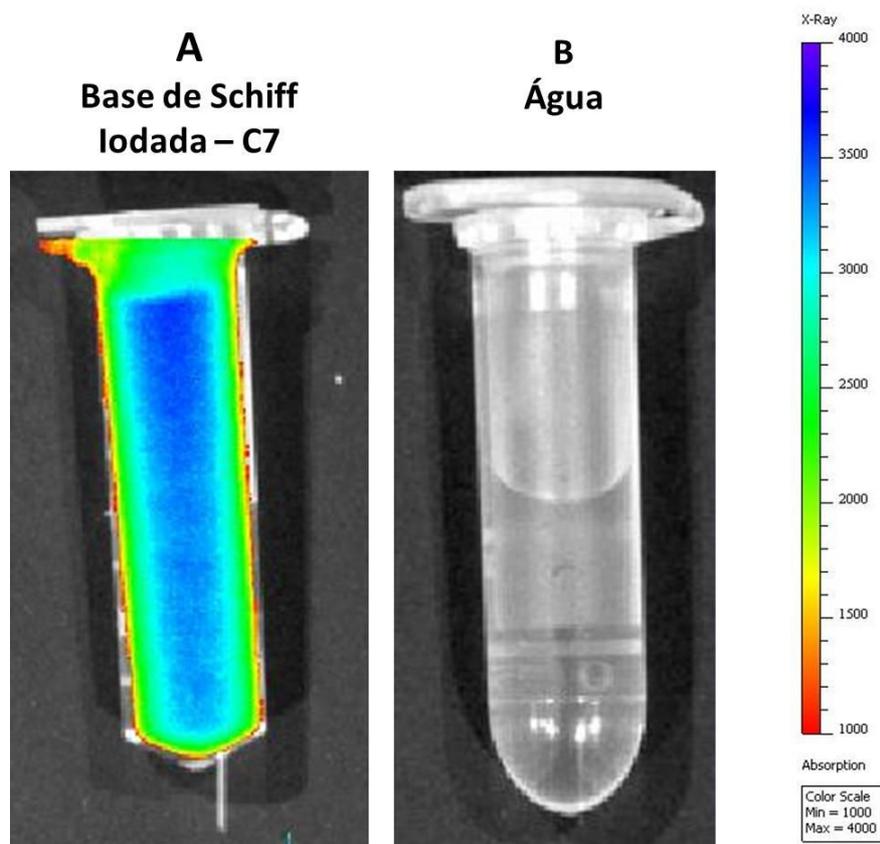


Figura 20. A) Base de Schiff iodada com cadeias C7 possui maior absorção de raios-x que a água (B).

Após a formulação da Base de Schiff iodada com cadeia C7 foi percebido uma inversão na densidade (Figura 21) aonde a Base de Schiff que era para estar acima da água passou a ficar abaixo desta demonstrando maior densidade que a água.

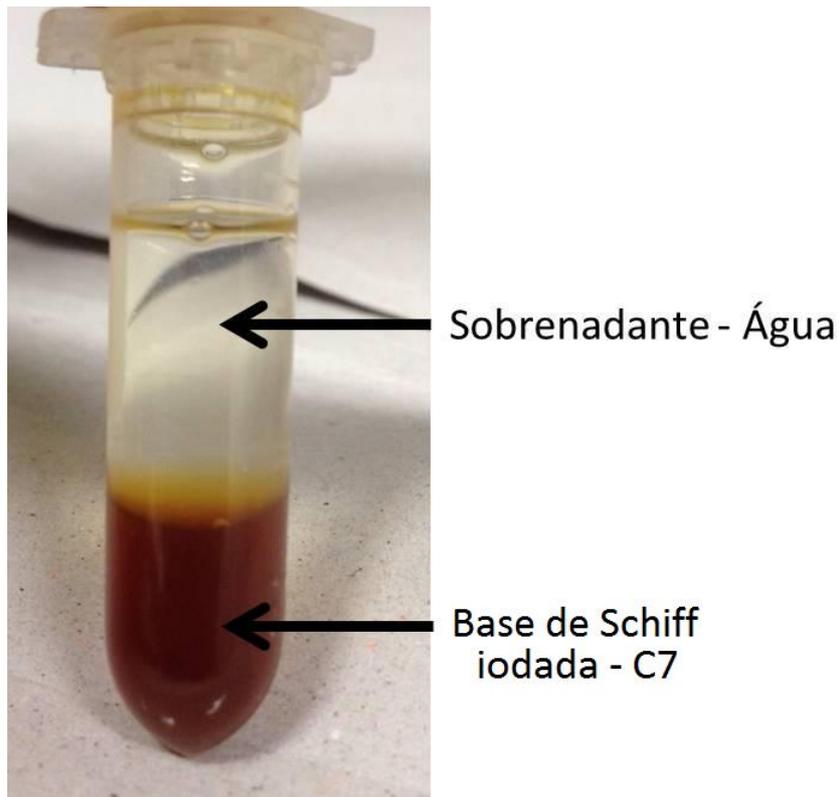


Figura 21. A Base de Schiff iodada – C7 demonstra maior densidade em relação ao sobrenadante (água).

Foi feito uma comparação entre a Base de Schiff iodada com cadeia C7 e o óleo de girassol iodado para demonstrar a já percebida inversão na densidade aonde a Base de Schiff possui maior densidade que a água (Figura 22). Já no óleo de girassol iodado é claro perceber que este possui menor densidade que a água, portanto permanece acima desta. Esta inversão da densidade se deve ao peso molecular da Base de Schiff que é substancialmente alto se comparado com o peso molecular do óleo de girassol.

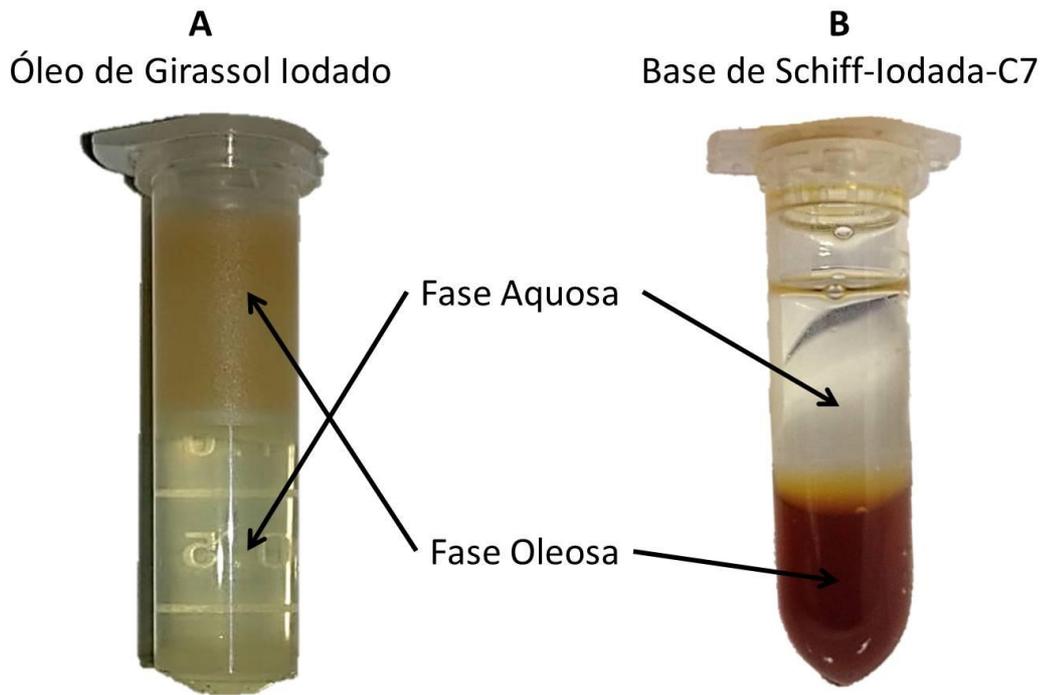


Figura 22. Comparativo da mistura do óleo de girassol e solução alcoólica iodada a 10% e a Base de Schiff iodada com cadeias C7. Percebe-se uma inversão na densidade da Base de Schiff.

Abaixo (Figura 23) está um comparativo do teste no IVIS[®] LUMINA XR Series III (28 Kv 100 μ A) para absorção de raios-x e a amostra *in natura*.

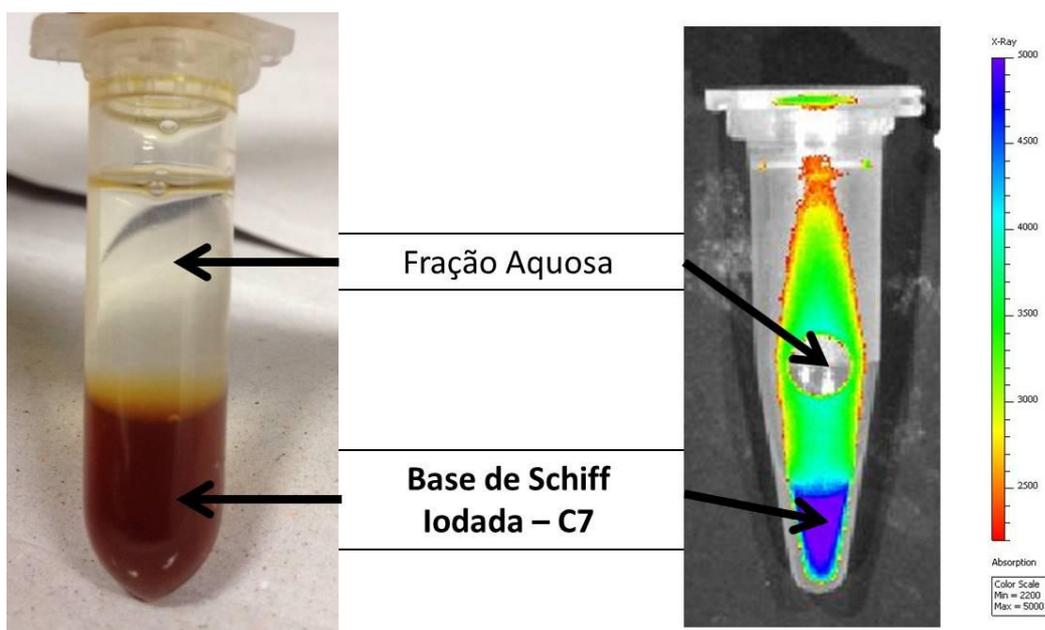


Figura 23. Base de Schiff iodada-C7 com alta absorção de raios-x evidenciado no aparelho Lumina em comparação com a amostra *in natura*.

Após a comprovação da absorção da Base de Schiff iodada - C7 esta foi nanoemulsionada e levada ao aparelho IVIS® LUMINA XR Series III (28 Kv 100 μ A) para determinação da absorção de raios-x o que é comprovado na Figura 24 abaixo.

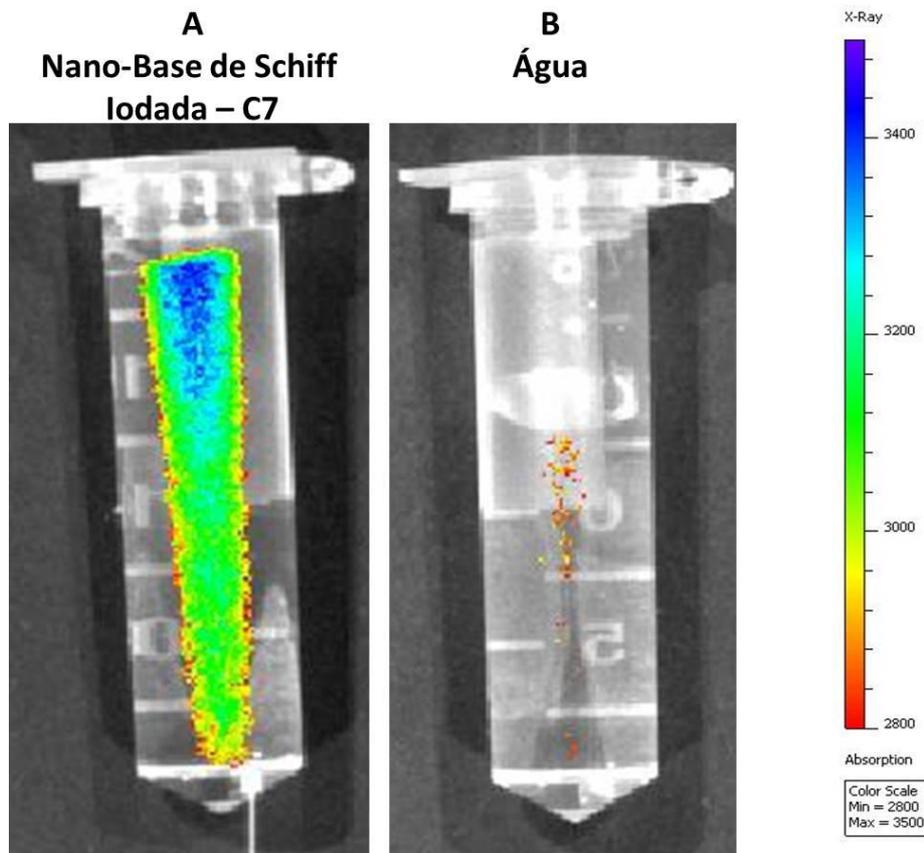


Figura 24. Nanoemulsão de Base de Schiff iodada-C7 e sua absorção de raios-x comparado ao da água.

5. DISCUSSÃO

Com o passar dos anos houve um grande avanço no desenvolvimento de novos agentes de contraste. Nas últimas décadas, principalmente desde 1990, momento que se iniciou o desenvolvimento de agentes de contraste nanoparticulados, tem-se buscado cada vez mais agentes de contraste que possam trazer menores efeitos adversos, sanar as dificuldades de manipulação dos agentes anteriores e que sejam agentes com baixo custo de síntese. (44)

O trabalho aqui proposto pretende contribuir no desenvolvimento de um novo agente de contraste iodado, que são as moléculas mais usadas nos dias de hoje como agentes de contraste. Mesmo passando por várias evoluções estes agentes de contraste iodados ainda possuem algumas limitações. A primeira limitação é o seu baixo peso molecular que faz com que sejam rapidamente excretados pelos rins o que resulta em um tempo de circulação *in vivo* muito rápido. A segunda limitação é que são necessárias altas doses de agentes de contraste para uma adequada tomada de imagem e a eliminação renal rápida pode levar a sérios efeitos adversos. Por fim, apesar destes agentes de contrastes poderem ser funcionalizados com biomoléculas alvo, a aquisição destas imagens não é possível devido à baixa carga de contraste que é entregue para estes momentos e à baixa sensibilidade destes agentes de contraste para raio-x. (45)

Uma das estratégias utilizadas para a solução destes problemas apresentados é a veiculação dos agentes de contraste em carreadores moleculares nanoestruturados. A partir

desta estratégia, os agentes de contraste teriam um tempo de meia-vida prolongado pelo fato de prevenirem a filtração glomerular a partir de uma lógica tamanho-dependente. O Aparato de filtração na rede capilar glomerular nos rins é composto de três elementos consecutivos que são essenciais para sua função de filtração. Estes são o endotélio, a membrana basal glomerular (GBM) e os podócitos. O primeiro componente, e o mais importante para aumentar a meia-vida de agentes de contraste nanoestruturados, é o endotélio que é altamente fenestrado. Estas fenestrações possuem de 60 a 80 nm de tamanho. Como os agentes de contraste nanoestruturados são maiores que este tamanho estes não são filtrados permanecendo no organismo por mais tempo até sua posterior degradação e por fim filtração.(46)

Inicialmente, foi planejado o desenvolvimento de uma nanoemulsão como carreador nanoestruturado lipídico para a veiculação do agente de contraste. Para tanto, surgiu a perspectiva de utilização do óleo de girassol que é um óleo que possui uma grande quantidade de ácidos graxos mono e poliinsaturado. A seleção do óleo de girassol teve como base uma revisão na literatura, que indicou que este era um óleo poliinsaturado de fácil obtenção e baixo custo. No geral os ácido graxos insaturados do óleo de girassol estão situados na segunda posição da molécula de triglicerídeo. É o ácido linoléico que prevalece nesta posição da molécula. O ácido oléico ocupa a primeira posição e os ácidos saturados ocupam a terceira

posição. É sabido que o índice de iodo depende da posição da dupla ligação na molécula de ácido linoléico comparada com o grupo carboxila (-COO-), e varia consideravelmente devido a distância entre as duplas ligações e o grupo carboxila. Portanto, se o número de átomos de carbono entre o grupo carboxila e a dupla ligação aumenta então a probabilidade de halogenação diminui. (47) Sabendo que os ácidos graxos no óleo de girassol possuem dupla ligação situada nas posições 9-10 e 11-12 do ácido linoléico a ligação do iodo é praticamente impossível. A atividade das duplas ligações diminui se a distância entre estas e os grupos carboxilas aumenta. O aumento de átomos de carbonos na cadeia ácida diminui a atividade das duplas ligações e reduz a velocidade de saturação. (48) Portanto, a incorporação do iodo no óleo de girassol não leva a quebra da dupla ligação e não ocorre de acordo com o mecanismo de substituição nucleofílico biomolecular que é característico para outros halogênios.

A incorporação do iodo no óleo de girassol acontece nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados através da formação de complexos tipo π . Nestes complexos a ligação entre o iodo (elétron aceptor) e o ácido graxo insaturado (elétron doador) é formada com a participação do elétron da ligação do grupo doador que é a ligação dupla do ácido graxo insaturado. Quando se dá a halogenação esta é percebida pela mudança de cor da reação que

esmaece a cor característica do iodo até a quase extinção desta cor demonstrando que ocorreu a halogenação. (49)

A partir dos resultados obtidos na halogenação do óleo de girassol, uma nanoemulsão lipídica foi sintetizada. O método de produção das nanoemulsões foi uma adaptação de protocolo proposto pelo grupo.(50) As adaptações foram centradas na incorporação do óleo de girassol e sua halogenação *in situ*, ou seja, incorporando as moléculas de iodo durante o processo de síntese das nanoemulsões. A partir deste método foi possível a obtenção de nanoemulsões contendo o óleo de girassol iodado, todavia, observamos que havia a liberação deste halogênio da nanoestrutura.(48) Esta nanoemulsão foi levada a ultrafiltração com filtros Amicon para perceber se havia ou não iodo fora da nanoemulsão o que foi demonstrado após a filtração aonde a nanoemulsão ficou retida no filtro e iodo passou o filtro e se depositou no eppendorf de coleta. Essa liberação do iodo do óleo de girassol pode ser considerado um resultado insatisfatório, pois o iodo livre é extremamente tóxico podendo trazer sérios efeitos adversos. Uma das razões levantadas que explicam esse resultado insatisfatório é a termodinâmica desfavorável da adição de dois iodios em uma dupla ligação do óleo de girassol. Como a ligação ficou instável um agente de contraste baseado nesta hipótese seria perigoso de utilizar devido à possibilidade de ocorrência de reações posteriores.

A toxicidade induzida por ingestão crônica de doses elevadas de iodo por seres humanos e outros mamíferos é bem documentada. (51,52) O iodo é um elemento essencial a vida e que em pequenas quantidades é responsável pela produção de hormônios tireoidianos. Contudo, no seu estado molecular (I_2) ou como íon iodeto (I^-) o iodo é muito tóxico para ser usado intravenosamente como agente de contraste radiológico. Historicamente para diminuir a toxicidade do iodo em agentes de contraste este foi incorporado a anéis benzênicos de forma que as propriedades resultantes do composto, como viscosidade e força iônica, se tornaram cada vez menos tóxicas para células e tecidos. (53) Também é conhecido que agentes de contraste que possuem anéis benzênicos ligados a grupamentos carboxilas ($COOH$) são considerados quimiotóxicos como o agente de contraste iônico ácido ditrizóico. (54)

Devido a estas questões surgiu a ideia de controlar esta ligação do iodo fazendo com que este não se dispusesse para o ambiente fora da nanoemulsão surgindo a ideia de indisponibilizar quimicamente o iodo bloqueando qualquer possibilidade de reação. Portanto, foi idealizado uma nova plataforma para o iodo diferente da rotineira 1,3,5-triodobenzeno conhecida como Base de Schiff. Esta não é a primeira vez que a Base de Schiff é utilizada como plataforma para agentes de contraste, mas é a primeira vez que esta é utilizada como plataforma para um agente de contraste iodado. A base de Schiff já foi utilizada com íons

metálicos paramagnéticos como uma nova classe potencial de agente de contraste para imageamento em ressonância magnética. (55) Bases de Schiff com manganês são eficazes agentes de contraste para fígado e rins.(56) A complexação desta base com um grande número de metais trouxe bastante interesse da comunidade científica devido a possuir um grande espectro de atividade farmacêutica e biológica como atividade antitumoral, anticonvulsiva, anti-inflamatória, antioxidante e também como inibidora da peroxidação lipídica.(57-62) A base de Schiff é facilmente produzida por uma diamina e dois equivalentes de salicilaldeído trazendo com isso a característica de um custo de produção extremamente baixo. A maleabilidade das bases de Schiff proporcionam o seu extensivo uso em diversas áreas como modelamento de enzimas e em catálises. Mais recentemente seu uso contém aplicações em metais contendo polímeros líquidos cristalinos, agentes antivirais, catálise assimétrica e agora modelo para agentes de contraste para raio-x. As bases de Schiff são capazes de estabilizar diferentes metais em vários estados de oxidação controlando a performance destes metais numa larga variedade de transformações catalíticas úteis.(40)

A base de Schiff iodada demonstrou uma capacidade de absorção de raio-x de cerca de 2,17 vezes maior que a água demonstrando ser excelente para a finalidade proposta. A próxima etapa foi tornar a base de Schiff lipofílica com perspectivas de utiliza-la em carreadores

nanoestruturados lipídicos. Para tal a escolha destes nanocarreadores lipídico foi baseado na premissa de que estes são muito bem tolerado pelo organismo devido a serem compostos de uma bicamada de fosfolipídios que se assemelha aos lipídios fisiológicos. (63,64) Estes são usados a mais de 25 anos o que confere bastante solidez quanto ao seu uso.(65,67) Sua síntese é bastante simples envolvendo como componentes o fosfolipídio e o colesterol permitindo a incorporação de drogas de modo ativo ou passivo,(68) sendo de uso corriqueiro do grupo. Logo após o acoplamento das cadeias C7 e a iodação da base de Schiff esta foi nanoemulsionada. Utilizamos o protocolo para síntese de nanoemulsão previamente padronizado na tese do grupo. (50)

Tendo em vista a perspectiva de se utilizar a base de Schiff iodada em veículos nanoestruturados lipídicos, foi planejada a incorporação de uma cadeia carbônica no composto para conferir hidrofobicidade e permitir que esta fosse veiculada nesse tipo de carreador nanoestruturado. Uma das características que o acoplamento das cadeias C7 trouxe foi a inversão da densidade do óleo fazendo com que esta se tornasse mais pesada que a água provavelmente devido ao alto peso molecular conferido a base de Schiff com o acoplamento. Comparando a amostra de óleo de girassol iodado com a amostra da base de Schiff iodada com acoplamento C7 percebe-se a inversão da densidade do óleo. Esta mesma amostra com

acoplamento foi levada ao IVIS® LUMINA XR Series III (28 Kv 100 μ A) e teve demonstrado sua grande absorção por raios-x o que evidencia ser excelente para um agente de contraste.

A base de Schiff iodada com acoplamento C7 foi nanoemulsionada e testada no IVIS® LUMINA XR Series III (28 Kv 100 μ A) também demonstrando absorção por raios-x mas não tão intensamente quanto a base de Schiff iodada C7 não nanoemulsionada. A absorção de raios-x foi de cerca de 1,22 vezes maior.

Devido ao aparelho Lumina produzir somente voxel bidimensional não foi possível a aplicação da escala Hounsfield nas imagens coletadas pelo aparelho. Esta escala somente é possível em aparelhos de tomografia computadorizada que produz voxel tridimensional.

Estudo mais aprofundados a cerca desta característica devem ser conduzidos, porém é bastante provável que seja um efeito de diluição da concentração do produto na formulação final. Mesmo assim a absorção indica ser promissora para o uso em agentes de contraste necessitando tão somente a adequação do carregamento de iodo na nanoemulsão.

O presente trabalho abre a perspectiva para um grande avanço nos contrastes iodados, inclusive trazendo a possibilidade de utilização de polímeros, como o PVMMMA, para prevenir a eliminação renal, necessitando tão somente testes *in vivo* para completa certificação de um

novos tipos de agentes de contraste nanoemulsionados no mercado que trarão revolução à área principalmente pela fácil produção deste permitindo com que seja utilizado em larga escala.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A Base de Schiff iodada com acoplamento C7 nanoemulsionada possui potencial como agente de contraste iodado para utilização em raio-x;

- A Base de Schiff iodada com acoplamento C7 foi a formulação que conferiu a molécula características hidrofóbicas passíveis de serem utilizadas em nanoemulsão lipídica;

- A iodação da Base de Schiff conferiu a molécula no mínimo dois iodios em cada anel benzênico;

- O acoplamento da cadeia carbônica C7 conferiu a Base de Schiff a hidrofobicidade esperada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

1. McCoy D. The nature of the x-ray and its discovery. *Cal State J Med.* 1923;21:92.
2. Kropf SP. The discovery of x-ray. 2009;47(3):13–34.
3. Toledo-pereyra LH. X-Rays Surgical Revolution. 2009;(August):327–32.
4. Bellin M-F, Stacul F, Webb J a W, Thomsen HS, Morcos SK, Almén T, et al. Late adverse reactions to intravascular iodine based contrast media: an update. *Eur Radiol.* 2011 Nov;21(11):2305–10.
5. Yu S-B, Watson AD. Metal-Based X-ray Contrast Media. *Chem Rev.* 1999;99:2353–78.
6. Hainfeld J, Slatkin D, Focella T, Smilowitz H. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. 2014;
7. Bourin M, Jolliet P, Ballereau F. An Overview of the Clinical Pharmacokinetics of X-Ray Contrast Media. 1997;32(3):180–93.
8. Tires G, Baranyai Z. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging Stability and Toxicity of Contrast Agents. 2013;
9. McClelland B. Low-osmolality contrast media: premises and promises. *Radiology.* 1987;
10. Kim DJ, Kim TH, Kim DP, Kim YJ. Saline Flush Effect for Enhancement of Aorta and Coronary Arteries at Multidetector CT Coronary Purpose : Methods : Results : Conclusion : 2008;246(1).
11. Lawaczeck R., Jost G., Pietsch H, Pharmacokinetics of Contrast Media in Humans. 2011;46(9).
12. DEAN P, KIVISAARI L, KORMANO M. Contrast enhancement pharmacokinetics of six ionic and nonionic contrast media. *Invest Radiol.* 1983;
13. Kormano M, Spataro R. Comparison of contrast enhancement pharmacokinetics of contrast media in clinical patients. *Contrast media* 1982;
14. Sage MR. Review Kinetics of Water-Soluble Contrast Media in the Central Nervous System. 1983;(August):897–906.
15. Mukundan S, Ghaghada KB, Badea CT, Kao C-Y, Hedlund LW, Provenzale JM, et al. A liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice. *AJR Am J Roentgenol.* 2006 Feb;186(2):300–7.
16. Li X, Anton N, Zuber G, Vandamme T. Contrast agents for preclinical targeted X-ray imaging. *Adv Drug Deliv Rev. Elsevier B.V.;* 2014;
17. Jakhmola A, Anton N, Vandamme TF. Inorganic nanoparticles based contrast agents for X-ray computed tomography. *Adv Healthc Mater.* 2012 Jul;1(4):413–31.
18. Torchilin VP, Trubetskoy VS. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating. 1995;(95).
19. Storm G, Belliot S, Daemenb T, Lasic DD. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. 1995;(95).

20. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* Elsevier B.V.; 2012 Dec;64:24–36.
21. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol.* 2008;26(1):57–64.
22. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* Elsevier Inc.; 2009 Jun;86(3):215–23.
23. Hallouard F, Anton N, Choquet P, Constantinesco A, Vandamme T. Iodinated blood pool contrast media for preclinical X-ray imaging applications--a review. *Biomaterials.* 2010 Aug;31(24):6249–68.
24. Becker N, Liebermann D, Wesch H, Van Kaick G. Mortality among Thorotrast-exposed patients and an unexposed comparison group in the German Thorotrast study. *Eur J Cancer.* 2008 Jun;44(9):1259–68.
25. De Vries A, Custers E, Lub J, van den Bosch S, Nicolay K, Grull H. Block-copolymer-stabilized iodinated emulsions for use as CT contrast agents. *Biomaterials.* 2010 Sep;31(25):6537–44.
26. Ho Kong W, Jae Lee W, Yun Cui Z, Hyun Bae K, Gwan Park T, Hoon Kim J, et al. Nanoparticulate carrier containing water-insoluble iodinated oil as a multifunctional contrast agent for computed tomography imaging. *Biomaterials.* 2007;28:5555–61.
27. Elrod DB, Partha R, Danila D, Casscells SW, Conyers JL. An iodinated liposomal computed tomographic contrast agent prepared from a diiodophosphatidylcholine lipid. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* Elsevier Inc.; 2009;5(1):42–5.
28. Skajaa T, Cormode DP, Falk E, Mulder WJM, Fisher E a., Fayad Z a. High-density lipoprotein-based contrast agents for multimodal imaging of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:169–76.
29. Gazelle GS, Wolf GL, McIntire GL. Hepatic Imaging with Iodinated Nanoparticles : A Comparison with Iohexol in Rabbits. 1995;(Iv):700–4.
30. Nycomed C, Drive DP, Box PO. Pulmonary Delivery of Nanoparticles of Insoluble , Iodinated CT X-ray Contrast Agents to Lung Draining Lymph Nodes in Dogs. 1998;87(11):1466–70.
31. Hyafil F, Cornily J-C, Feig JE, Gordon R, Vucic E, Amirbekian V, et al. Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nat Med.* 2007 May;13(5):636–41.
32. Van Herck JL, De Meyer GRY, Martinet W, Salgado R a, Shivalkar B, De Mondt R, et al. Multi-slice computed tomography with N1177 identifies ruptured atherosclerotic plaques in rabbits. *Basic Res Cardiol.* 2010 Jan;105(1):51–9.

33. Galperin A, Margel D, Baniel J, Dank G, Biton H, Margel S. Radiopaque iodinated polymeric nanoparticles for X-ray imaging applications. *Biomaterials*. 2007 Oct;28(30):4461–8.
34. Aviv H, Bartling S, Kiesling F, Margel S. Radiopaque iodinated copolymeric nanoparticles for X-ray imaging applications. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2009 Oct;30(29):5610–6.
35. Ashokan A, Menon D, Nair S, Koyakutty M. A molecular receptor targeted, hydroxyapatite nanocrystal based multi-modal contrast agent. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2010 Mar;31(9):2606–16.
36. Jackson P a, Rahman WNWA, Wong CJ, Ackerly T, Geso M. Potential dependent superiority of gold nanoparticles in comparison to iodinated contrast agents. *Eur J Radiol*. Elsevier Ireland Ltd; 2010 Jul;75(1):104–9.
37. Jin E, Lu Z-R. Biodegradable iodinated polydisulfides as contrast agents for CT angiography. *Biomaterials*. 2014 Jul;35(22):5822–9.
38. Vera D, Mattrey R. A molecular CT blood pool contrast agent. *Acad Radiol*. 2002;
39. MATTREY R. Blood-pool contrast media are the ideal agents for computed tomography. *Invest Radiol*. 1991;
40. Cozzi PG. Metal-Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. *Chem Soc Rev*. 2004;33:410–21.
41. Atwood D a., Harvey MJ. Group 13 compounds incorporating Salen ligands. *Chem Rev*. 2001;101:37–52.
42. Bhavsar MD, Amiji MM. Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene. 2007;197–213.
43. Ourique a F, Pohlmann a R, Guterres SS, Beck RCR. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int J Pharm*. 2008 Mar 20;352(1-2):1–4.
44. Liu Y, Ai K, Lu L. Nanoparticulate X-ray Computed Tomography Contrast Agents From Design Validation to in Vivo Applications. 2012;1817–27.
45. Krause W, Schneider PW. Chemistry of X-Ray Contrast Agents. *Top Curr Chem*. 2002;222:107–50.
46. Bertrand N, Leroux J-C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomico-physiological perspective. *J Control Release*. Elsevier B.V.; 2012 Jul 20;161(2):152–63.
47. Karleskind A. *Manuel des corps gras*, Vol. 1,2, Lavoisier, Paris. *Technique et Documentation Lavoisier*; 1992;
48. Popovici C, Sturza R, Deseatnicov O. Study of the incorporation of iodine in vegetal oils. 2006;449–56.

49. James R. Malm, Keith Reemtsma and HGB. Comparative Fat and Fatty Acid Intestinal Absorption Test Utilizing Radioiodine Labeling—Results in Normal Subjects. 1956;4–7.
50. Rodrigues MC. Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cráju e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro. 2014.
51. Risher J. Toxicological profile for iodine. 2004;
52. Aulíková IP, Ováč GK, Íreš JB, Aulík ŠP, Eidel HS, Agy ON. Iodine toxicity in ruminants. 2002;2002(12):343–50.
53. Sendeski MM. Pathophysiology of renal tissue damage by iodinated contrast media. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2011 May;38(5):292–9.
54. Eloy R, Corot C, Belleville J. Contrast Media for Angiography : Physicochemical Properties, Pharmacokinetics and Biocompatibility. 1991;7(199 1):89–197.
55. Smith PH, Brainard JR, Morris DE, Jarvinen GD, Ryan RR. Solution and solid state characterization of europium and gadolinium Schiff base complexes and assessment of their potential as contrast agents in magnetic resonance imaging. 1989;7443(3):7437–43.
56. Chelate N a NM, Rocklage SM, Sheffer JSH, Cacheris WP, Quay SC, Hahn FE, et al. Structural and thermodynamic characterization of manganese(II) N,N'-dipyridoxyethylenediamine-N,N'-diacetate. A novel manganese(II) chelate. 1988;(250 mL):3530–4.
57. Malshet VG, Al Tappel L. Fluorescent products of lipid peroxidation: I. Structural requirement for fluorescence in conjugated schiff bases. Lipids. 1973;8(II):194–8.
58. Guo Z, Xing R, Liu S, Yu H, Wang P, Li C, et al. The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. Bioorganic Med Chem Lett. 2005;15:4600–3.
59. González A, Gómez E. Heptacoordinate tin (IV) compounds derived from pyridine Schiff bases: synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, anti-inflammatory and antioxidant activity. Chem 2009;
60. Hodnett EM, Dunn WJ. Structure-antitumor activity correlation of some Schiff bases. J Med Chem. 1970;13:768–70.
61. Kamel MM, Ali HI, Anwar MM, Mohamed N a., Soliman AM. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. Eur J Med Chem. Elsevier Masson SAS; 2010;45(2):572–80.
62. Verma M, Pandeya SN, Singh KN, Stables JP. Anticonvulsant activity of Schiff bases of isatin derivatives. Acta Pharm. 2004;54:49–56.

63. Fangueiro JF, Gonzalez-Mira E, Martins-Lopes P, Egea M a, Garcia ML, Souto SB, et al. A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: production, characterization and toxicity testing. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(3):545–9.
64. Kesharwani P, Gajbhiye V, Jain NK. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. *Biomaterials.* Elsevier Ltd; 2012 Oct;33(29):7138–50.
65. Waring MJ. *Liposomes in Biological Systems.* 1980;592–3.
66. Bangham a. D, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol.* Academic Press Inc. (London) Ltd.; 1964 Jan;8(5):660–IN10.
67. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* Elsevier B.V.; 2013 Jan;65(1):36–48.
68. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* Nanoscale Research Letters; 2013 Jan;8(1):102.