JOSIANE PADILHA DE PAULA

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) PARA A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE HEPARINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Orientadora: Profª. Drª. Sônia Faria Zawadzki

CURITIBA

2009

Padilha de Paula, Josiane

Desenvolvimento de nanopartículas de poli(ácido lático) para a administração oral de heparina / Josiane Padilha de Paula. – Curitiba, 2009. 133 f.

Orientadora: Sônia Faria Zawadzki

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

1. Polímeros - Nanopartículas. I. Zawadzki, Sônia Faria. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

547

P123d

TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) PARA A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE HEPARINA

por

JOSIANE DE FÁTIMA PADILHA DE PAULA

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: Profª Drª Sônia Faria Zawadzki
Dep. de Química – UFPR

Profª Drª Hellen Karine Stulzer
Dep. de Farmácia – UEPG

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz
Dep. de Química – UEM

Prof. Dr. Ronilson Vasconcelos Barbosa
Dep. de Química – UFPR

Prof. Dr. Andersson Barison
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 18 de fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dra. **Sônia Faria Zawadzki**, por acreditar na minha capacidade, pelos conselhos e sugestões, por conduzir com muita paciência e de forma carinhosa a construção desse trabalho, mas acima de tudo pela atitude corajosa de me acolher no momento de dificuldade e incerteza. Jamais esquecerei que foi essa decisão que permitiu a realização dessa tese.

Ao professor Dr. **Paulo Vitor Farago**, amigo de todas as horas, pelas sugestões imprescindíveis, pela presença incansável, pela dedicação e competência que foram essenciais na execução desse trabalho e ainda por ter compartilhado comigo momentos de alegria e angústia durante todos esses anos.

À amiga **Elisabete Ferreira Silva**, pelo tempo despendido, pela dedicação e paciência sem limites no momento de correção do trabalho e acima de tudo pela amizade demonstrada.

Ao professor Dr. **Ronilson Vasconcelos Barbosa**, pela contribuição no exame de qualificação e principalmente por todas as sugestões dadas, de forma tão espontânea, durante o período de execução do trabalho. Pelo bom humor e apoio em momentos de dificuldade que hoje ouso chamar de amigo.

Ao professor Dr. **Patrício Peralta Zamora** pelas sugestões valiosas no exame de qualificação e pela ajuda na análise dos dados do trabalho.

À professora Dra **Nádia Krueger**, pela correção criteriosa dos relatórios anuais e de qualificação e pelos conselhos sensatos.

À professora Dra **Jaísa Fernandes Soares**, ex-coordenadora do programa de pós-graduação, pela sensibilidade e discernimento, que formam essenciais para a continuidade desse trabalho.

Ao professor Dr. **Andersson Barison**, pela importante contribuição nas análises de RMN.

Aos amigos **Andrei,** pela dedicação e empenho em todo o desenvolvimento das nanopartículas e a **Fernando,** pela presença amistosa e animadora. Por terem sido amigos que apoiaram incondicionalmente esse trabalho.

Ao Dr. **Milton Domingues Michel**, pela enorme boa vontade e dedicação. Pela imensa ajuda com o MEV, sem a qual eu não poderia ter dado seqüência a esse trabalho. Por ter se tornado um grande amigo.

Aos amigos do laboratório de genética, Dra. **Carolina,** Msc. **Rafael,** Msc. **Maria Isabel e Fernando**, por terem sido tão prestativos no empréstimo de equipamentos e pela boa amizade que desenvolvemos.

A **Douglas Wellington Migliorini,** pelo desprendimento na colaboração na execução das análises de raio-X.

Aos amigos do LABPOL, **Juliana, Carlos, Patrícia, Reinaldo, Tiago, Cláudio, Simone, Heveline, Márcia, Tatiane** e **Beatriz**, agradeço pela amizade, colaboração e por tornar minhas viagens um grande prazer.

Ao secretário do Programa de Pós Graduação, **Marcelino**, pelo atendimento atencioso e competente durante esses anos.

Aos amigos e sócios do Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas, Msc **Jeanine Margraf Bittencourt,** Msc **Marcia Venânico Marcon e** Msc **Eduardo Pietruchinski**, pelo desprendimento com que compreenderam a minha ausência.

À bioquímica **Priscila Salles de Brito**, por me substituir com presteza e competência, em minhas atividades no LAPAC, viabilizando minhas viagens.

A todos os bioquímicos e funcionárias do LAPAC, **Érico, Ludmila, Fabíula, Juliana, Cleusa, Zelinda, Silvana, Eliana, Ederli, Estela, Édina, Adriana, Rosana, Camila,**

e Anaelisa, que com muita presteza e paciência me auxiliaram no decorrer desse período.
À amiga **Olinda Thomé Chamma**, pela presença, incentivo e encorajamento.

À amiga **Candida Leonor Miranda**, que enquanto esteve presente entre nós foi uma grande incentivadora.

À administração da UEPG, aos professores Dr. **João Carlos Gomes** e Dr. **Luciano Vargas** pela compreensão na liberação de minhas atividades.

Aos professores do departamento de Engenharia de Materiais Dr. **Adilson Chinelatto** e Dra. **Adriana Chinelatto**, por permitirem a execução da análise morfológica dos materiais produzidos.

Ao professor Dr. **Carlos Granado**, Chefe do departamento de engenharia de materiais, pela autorização do uso do Raio-X.

Ao professor Dr. **Sinvaldo Blaglie,** Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio na dispensa das minhas atividades pedagógicas.

Às amigas **Nilvan, Cláudia, Jeanne** e **Eliane Fidelis**, pelo constante incentivo.

À **Marly Santos**, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, por me fazer sentir presente, mesmo em minha ausência.

À **Marilene,** do Biotério, pelo companheirismo e pela contribuição no manuseio dos animais.

À professora Dra **Josélia Daher**, pelo apoio na utilização do Biotério.

À professora Msc **Josiane Crisitine Bachmann Madalozzo**, Coordenadora do Curso de Farmácia, pelo incentivo ao trabalho e pelo suporte dado junto ao colegiado de curso.

À minha mãe **Anita**, que sempre foi o alicerce para o meu crescimento profissional e mais uma vez se manteve firme ao meu lado durante todos esses anos de trabalho.

À minha irmã **Joseli**, minhas sobrinhas **Helena** e **Barbara**, e meu cunhado **Christiano**, que sempre me apoiaram e pela simples presença foram motivo de grande incentivo para que eu seguisse em frente.

E, por fim, mas acima de tudo, agradeço a **Deus**, que me concedeu capacidade física, emocional e intelectual para realizar esse trabalho e principalmente por ter apontado a direção e iluminado os caminhos quando tudo parecia perdido.

RESUMO

A heparina é um glicosaminoglicano altamente sulfatado, de ocorrência natural, amplamente utilizada como fármaco anticoagulante para o tratamento da trombose venosa profunda e do embolismo pulmonar. Devido a sua elevada massa molar, à presença de cargas negativas na sua estrutura química, à suas propriedades hidrofílicas com baixa permeabilidade através da membrana epitelial e à possibilidade de degradação no trato gastrointestinal, sua administração normalmente ocorre através da via parenteral, o que pode acarretar uma baixa adesão do paciente ao tratamento. Visando a utilização da heparina por via oral, muitos estudos têm sido realizados para a obtenção de sistemas poliméricos, como conjugados entre esse fármaco e diferentes polímeros ou, ainda, como micro/nanopartículas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver matrizes poliméricas para a encapsulação de heparina, passíveis de administração por via oral, a partir de materiais biodegradáveis baseados no poli(ácido lático). Para isso, foram sintetizados quatro diferentes poliésteres, sendo três materiais derivados da policondensação do ácido lático, com diferentes grupos terminais, a partir dos quais foram elaboradas nanopartículas contendo heparina pelo método de emulsão múltipla seguida de evaporação do solvente. O quarto material polimérico foi resultante da conjugação da heparina com o poli(ácido lático), com o qual foram preparadas nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Estudos morfológicos, espectrométricos e de avaliação anticoagulante *in vivo* foram realizados para caracterizar esses materiais. A síntese dos poliésteres com diferentes terminações, *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), bem como a formação do complexo heparina-poli(ácido lático), foi conduzida com sucesso. O *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) como matriz polimérica, o diclorometano como solvente orgânico, o polisorbato 20 como estabilizante da emulsão primária e o PVAl a 10 % na fase externa aquosa, foram definidos como as melhores condições para a elaboração de nanopartículas contendo heparina por emulsão múltipla e evaporação do solvente. Essas partículas foram classificadas como nanocápsulas, com tamanho médio de 97,2 nm e taxa de encapsulação de 55,1 %. A atividade anticoagulante foi comprovada, sendo o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) mais elevado de 43 segundos foi verificado após 2 horas da administração oral. As partículas, produzidas por nanoprecipitação a partir do complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), foram definidas como nanoesferas, revelando um tamanho médio de 97,3 nm. Esse produto apresentou uma atividade anticoagulante prolongada, que se manteve por um período de 24 horas após a aplicação por via oral. Dessa forma, esses materiais nanoestruturados podem ser considerados como estratégias farmacoterapêuticas viáveis e promissoras para a administração oral da heparina.

ABSTRACT

Heparin is a highly-sulfated glycosaminoglycan of natural occurrence which is widely used as an anticoagulant drug for the management of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. However, heparin is not absorbed in the upper gastrointestinal tract due to its relatively high molecular weight, negatively charged structure and hydrophilic properties with a low permeability through the epithelial membrane. Besides, this drug can be depolymerizated after oral intake. Hence, parenteral routes, *e.g.* intravenous and subcutaneous injections, have been often used for the heparin-based treatment that can result in a low patient compliance. In order to provide an oral delivery of heparin with a suitable anticoagulant activity, some polymeric delivery systems have been currently studied as polymer-drug conjugates or micro/nanoparticles. Thus, the aim of this work was to develop biodegradable polymeric materials to entrap heparin in nanoparticles for oral administration. Four polymeric materials based on poly(lactic acid) were synthesized. Three of them were obtained from the polycondensation of lactic acid followed by some particular changes in the end groups that were used to prepare nanoparticles by multiple emulsion/solvent evaporation method. The fourth polymeric material was prepared by conjugating heparin with poly(lactic acid) and it was used to produce nanoparticles by nanoprecipitation method. Morphological, spectrometrical and *in vivo* anticoagulant analyses were performed. The synthesis of the three polyesters *α*-hydroxy-*ω*-carboxy-poly(lactic acid), *α*,*ω*-di-carboxy-poly(lactic acid) and *α*,*ω*-di-hydroxy-poly(lactic acid), as well the conjugated heparin-poly(lactic acid), were successfully achieved. The material prepared using *α*-hydroxy-*ω*-carboxy-poly(lactic acid) as polymeric matrix, methylene chloride as an organic solvent, polysorbate 20 as stabilizing to internal aqueous phase and 10 % poly(vynil alcohol) as surfactant to external aqueous phase was chosen as the best formulation to produce heparin-loaded nanoparticles by multiple emulsion/solvent evaporation method. These nanocapsules were spherically-shaped with smooth surface, medium size of 97.2 nm and encapsulation rate of 55.1 %. Their anticoagulant activity was established with an activated partial thromboplastin time (aPTT) of 43 seconds after 2 hours of oral administration. The particles obtained by nanoprecipitation from conjugated heparin-*α*-hidroxy-*ω*-carboxy-poly(lactic acid) were described as nanospheres and also demonstrated a medium size of 97.3 nm. Their anticoagulant activity was confirmed and remained for 24 hours after oral administration. Therefore, the performed nanoparticles can be regarded as a feasible and promising pharmacotherapeutical approach for the oral administration of heparin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – MECANISMO DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA E AÇÃO DA ANTITROMBINA COMO ANTICOAGULANTE 25
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DE HEPARINA 26
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS POSSÍVEIS ROTAS DE TRANSLOCAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS (NP) PELA MEMBRANA MUCOSA INTESTINAL, SENDO, MU (MUCOSA); EC (ENTERÓCITOS); MC (CÉLULAS MICROVILOSAS DE MEMBRANA); LC (LINFÓCITOS); MP (MACRÓFAGOS); BL (LÂMINA BASAL); TJ (JUNÇÃO); I (ABSORÇÃO PARACELULAR); II (ENDOCITOSE PELOS ENTERÓCITOS); III (ATRAVÉS DAS CÉLULAS M). 29
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM LIPOSSOMA MULTILAMELAR 31
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS NANO/MICROPARTÍCULAS 32
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR MEIO DO MÉTODO DE EMULSÃO MÚLTIPLA E EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE 35
FIGURA 7 – ADMINISTRAÇÃO ORAL DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO HEPARINA POR GAVAGEM 58
FIGURA 8 – PUNÇÃO INTRA-CARDÍACA PARA A OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO 59
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE POLICONDENSAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO PARA A FORMAÇÃO DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), MATERIAL DE PARTIDA PARA A SÍNTESE DOS DEMAIS POLÍMEROS EM ESTUDO 61
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL EMPREGADO PARA VERIFICAR O EFEITO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS (TEMPERATURA E TEMPO DE REAÇÃO) NA CONSISTÊNCIA DO POLÍMERO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 62
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DAS PROJEÇÕES DO PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO PARA AVALIAR O EFEITO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS (TEMPERATURA E TEMPO DE REAÇÃO) NA CONSISTÊNCIA DO POLÍMERO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 63
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL UTILIZADO PARA VERIFICAR O EFEITO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS (CATALISADOR E TEMPO DE REAÇÃO) NA CONSISTÊNCIA DO POLÍMERO [*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)] 65

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DO *A*,*Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), RESULTANTE DA REAÇÃO ENTRE O *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E O ANIDRIDO SUCCÍNICO 65
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DO *A*,*Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), RESULTANTE DA REAÇÃO ENTRE O *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E O DIETILIENOGLICOL..... 66
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA PROPOSTA PARA A SÍNTESE DO CONJUGADO HEPARINA-*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) - FORMAÇÃO DO INTERMEDIÁRO IA ENTRE A MOLÉCULA DE POLI(ÁCIDO LÁTICO E DE DCC. 68
FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA PROPOSTA PARA A SÍNTESE DO CONJUGADO HEPARINA-*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) - FORMAÇÃO DO INTERMEDIÁRO IB ENTRE A MOLÉCULA DE HEPARINA E DE DCC..... 69
FIGURA 17 – OBTENÇÃO DO CONJUGADO POLI(ÁCIDO LÁTICO)/HEPARINA ATRAVÉS DA REAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO II E A AMINA COM A FORMAÇÃO DE UMA AMIDA..... 70
FIGURA 18 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO POLI(ÁCIDO LÁTICO) / HEPARINA A PARTIR DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO GRUPO CARBOXÍLICO DA HEPARINA E O GRUPAMENTO OH DO POLI(ÁCIDO LÁTICO), EM PRESENÇA DO SISTEMA DCC/DMAP. 71
FIGURA 19 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO POLI(ÁCIDO LÁTICO) A PARTIR DA REAÇÃO ENTRE O GRUPAMENTO OH DA HEPARINA E CARBOXILA DO POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 72
FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO DICROMATO DE POTÁSSIO EM MEIO ÁCIDO 77
FIGURA 21 – CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE HIDROXILA EM POLIÉSTERES E POLIÉTERES (POLÍMERO UTILIZADO COMO PADRÃO: CAPA 2085) 78
FIGURA 22 – ESPECTRO DE IVTF DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_A#4 (4 CM^{-1}, 32 SCANS, EM PASTILHA DE KBR) 84
FIGURA 23 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO PARA O HOMOPOLÍMERO DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) (DRUMOND *ET AL.*, 2004)..... 84
FIGURA 24 – ESPECTROS DE IVTF DOS POLÍMEROS *A*,*Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), SINTETIZADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, FRENTE AO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_A#4 (4 CM^{-1}, 32 SCANS, EM PASTILHA DE KBR)..... 85
FIGURA 25 – ESPECTROS DE IVTF DOS POLÍMEROS *A*,*Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), SINTETIZADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, FRENTE AO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_A#4 (4 CM^{-1}, 32 SCANS, EM PASTILHA DE KBR)..... 86

FIGURA 26 – ESPECTRO DE IVTF DO COMPLEXO HEPARINA-*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) SINTETIZADO, FRENTE AO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_A#4 (4 CM^{-1}, 32 SCANS, EM PASTILHA DE KBR) 87
FIGURA 27 – ESPECTRO RMN DE ^{13}C DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_A#4 91
FIGURA 28 – ESPECTRO RMN DE ^{13}C DO *A*,*Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_B#1 92
FIGURA 29 – ESPECTRO RMN DE ^{13}C DO *A*,*Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_C#4 . 93
FIGURA 30 **–** DIFRATOGRAMAS DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_A#4, *A*,*Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_B#1 E *A*,*Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_C#4 94
FIGURA 31 – DIFRATOGRAMA DO CONJUGADO HEPARINA-*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), FRENTE AOS DIFRATOGRAMAS DA HEPARINA E DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) PAL_A#4 94
FIGURA 32 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS PARTÍCULAS DENOMINADAS COMO FORMULAÇÃO **1** (FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV, AUMENTO DE 2.000X)..... 96
FIGURA 33 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS PARTÍCULAS DESIGNADAS COMO FORMULAÇÃO **2** (FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV, AUMENTO DE 2.000X)..... 97
FIGURA 34 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS PARTÍCULAS QUE CONSTITUEM A FORMULAÇÃO **3** (FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV, AUMENTO DE 5.000X)..... 97
FIGURA 35 – VARIAÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO PVAL COM MASSA MOLAR DE 123.000 G MOL^{-1} 98
FIGURA 36 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS PARTÍCULAS QUE COMPÕEM A FORMULAÇÃO **4** (FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV, AUMENTO DE 5.000X)..... 99
FIGURA 37 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS NANOPARTÍCULAS OBTIDAS COM A UTILIZAÇÃO DO PVAL DE BAIXA MASSA MOLAR, (**A**) PVAL A 5 % (AUMENTO 1.000 X), (**B**) PVAL A 10 % (AUMENTO 10.000 X) E (**C**) PVAL A 15 % (AUMENTO 10.000 X).. 100
FIGURA 38 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS PARTÍCULAS ELABORADAS COM O EMPREGO DE PVP NA FASE AQUOSA EXTERNA (FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV, AUMENTO DE 5.000 X) 102
FIGURA 39 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS COM A UTILIZAÇÃO DE POLISORBATO 80 NA FASE AQUOSA EXTERNA (FOTOMICROGRAFIA VISUALIZADA POR MEV, AUMENTO DE 2.000 X)..... 102

FIGURA 40 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS COM A UTILIZAÇÃO DO CLOROFÓRMIO COMO SOLVENTE ORGÂNICO (FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV, (**A**) AUMENTO DE 3 .000X E (**B**) AUMENTO DE 27.000 X)..... 103
FIGURA 41 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS NANOPARTÍCULAS BASEADAS NO (**A**) PAL_A#4 (AUMENTO 12.000 X), NO (**B**) PAL_B#1 (AUMENTO 18.000 X) E NO (**C**) PAL_C#4 (AUMENTO 18.000 X) (FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV) 104
FIGURA 42 – DIFRATOGRAMAS DA HEPARINA, DO POLÍMERO DE PARTIDA PAL_A#4, DA MISTURA FÍSICA (HEPARINA:PAL_A#4, 1:1 M/M) E DAS NANOPARTÍCULAS OBTIDAS A PARTIR DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 105
FIGURA 43 – DIFRATOGRAMAS DA HEPARINA, DO POLÍMERO DE PARTIDA PAL_B#1, DA MISTURA FÍSICA (HEPARINA:PAL_B#1, 1:1 M/M) E DAS NANOPARTÍCULAS OBTIDAS A PARTIR DO *A*,*Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 106
FIGURA 44 – DIFRATOGRAMAS DA HEPARINA, DO POLÍMERO DE PARTIDA PAL_C#4, DA MISTURA FÍSICA (HEPARINA:PAL_C#4, 1:9 M/M) E DAS NANOPARTÍCULAS OBTIDAS A PARTIR DO *A,Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 106
FIGURA 45 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS NANOPARTÍCULAS DE HEPARINA, PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE EMULSÃO MÚLTIPLA E EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE..... 110
FIGURA 46 – ASPECTO MORFOLÓGICO DAS NANOPARTÍCULAS OBTIDAS POR NANOPRECIPITAÇÃO (FOTOMICROGRAFIA VISUALIZADA POR MEV, AUMENTO DE 18.000 X)..... 111
FIGURA 47 – DIFRATOGRAMAS DA HEPARINA, DO PRÓ-FÁRMACO HEPARINA-*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E DAS NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR NANOPRECIPITAÇÃO 112
FIGURA 48 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA AÇÃO ANTICOAGULANTE DO CONJUGADO HEPARINA-*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) ADMINISTRADO INTRAPERITONIALMENTE EM RATOS WISTAR 113
FIGURA 49 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA AÇÃO ANTICOAGULANTE DAS NANOPARTÍCULAS ELABORADAS COM O COMPLEXO HEPARINA-*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL 114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SEQÜÊNCIA BÁSICA DE EVENTOS QUE OCORREM NA HEMOSTASIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA, APÓS A LESÃO VASCULAR 23

TABELA 2 – PLANEJAMENTO FATORIAL PRELIMINAR, INDICANDO AS VARIÁVEIS, OS NÍVEIS E AS COMBINAÇÕES PROPOSTAS PARA A OBTENÇÃO DO PRODUTO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 43

TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL ADICIONAL, DETALHANDO AS VARIÁVEIS, OS NÍVEIS E AS COMBINAÇÕES PROPOSTAS PARA A OBTENÇÃO DO PRODUTO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 44

TABELA 4 – PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A OBTENÇÃO DO *A*,*Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), APRESENTANDO AS VARIÁVEIS, OS NÍVEIS E AS COMBINAÇÕES PROPOSTAS .. 45

TABELA 5 – PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A OBTENÇÃO DO *A*,*Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), DETALHANDO AS VARIÁVEIS, OS NÍVEIS E AS COMBINAÇÕES PROPOSTAS 46

TABELA 6 – TENSOATIVOS ESTABILIZANTES UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE HEPARINA PELO MÉTODO DE EMULSÃO MÚLTIPLA E EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE 54

TABELA 7 – PLANEJAMENTO FATORIAL UTILIZADO PARA ESTUDAR O EFEITO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS (TEMPERATURA E TEMPO DE REAÇÃO) NA CONSISTÊNCIA DO POLÍMERO (*A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 62

TABELA 8 – PLANEJAMENTO FATORIAL USADO PARA ANALISAR O EFEITO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS (PRESENÇA DE CATALISADOR E TEMPO DE REAÇÃO) NA CONSISTÊNCIA DO POLÍMERO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 64

TABELA 9 – ÍNDICE DE CARBOXILA DO *A,Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E O SEU PERCENTUAL DE AUMENTO EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CARBOXILA DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) DE PARTIDA 73

TABELA 10 – EFEITOS CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3, A PARTIR DAS RESPOSTAS DE ÍNDICE DE CARBOXILA DOS PRODUTOS DENOMINADOS COMO *A,Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 74

TABELA 11 – ÍNDICE DE CARBOXILA DO *A,Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E O SEU PERCENTUAL DE REDUÇÃO EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CARBOXILA DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) DE PARTIDA 75
TABELA 12 – EFEITOS CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3, A PARTIR DAS RESPOSTAS DE ÍNDICE DE CARBOXILA DOS PRODUTOS DESIGNADOS COMO *A,Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 76
TABELA 13 – REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA OBTIDAS NO ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE HIDROXILA EM POLIÉSTERES E POLIÉTERES (POLÍMERO UTILIZADO COMO PADRÃO: CAPA 2085)..... 79
TABELA 14 – VALORES MÉDIOS OBTIDOS PARA O ÍNDICE DE HIDROXILA DE POLIÉSTERES E POLIÉTERES COMERCIAIS, OBTIDOS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO EM ESTUDO E PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA 80
TABELA 15 – ÍNDICE DE HIDROXILA DO *A,Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E O SEU PERCENTUAL DE VARIAÇÃO (AUMENTO OU REDUÇÃO) EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE HIDROXILA DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) DE PARTIDA 81
TABELA 16 – EFEITOS CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3, A PARTIR DAS RESPOSTAS DE ÍNDICE DE HIDROXILA DOS PRODUTOS DESIGNADOS COMO *A,Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 81
TABELA 17 – ÍNDICE DE HIDROXILA DO *A,Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E O SEU PERCENTUAL DE AUMENTO EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE HIDROXILA DO *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) DE PARTIDA 82
TABELA 18 – EFEITOS CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3, A PARTIR DAS RESPOSTAS DE ÍNDICE DE HIDROXILA DOS PRODUTOS DENOMINADOS COMO *A,Ω*-DI-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)..... 82
TABELA 19 – MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA CALCULADA PARA OS POLÍMEROS *A,Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), COM BASE NOS RESPECTIVOS VALORES DE ÍNDICE DE CARBOXILA 88
TABELA 20 – MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA CALCULADA PARA OS POLÍMEROS *A*-*Ω*-HIDROXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO), COM BASE NOS RESPECTIVOS VALORES DE ÍNDICE DE HIDROXILA 89
TABELA 21 – VALORES DE MASSA MOLAR PARA OS POLÍMEROS *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) E *A,Ω*-DI-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO..... 89

TABELA 22 – TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE *A*-HIDROXI-*Ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) (PAL_A#4) CONTENDO HEPARINA, FORMULADAS POR EMULSÃO MÚLTIPLA E EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE 95
TABELA 23 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA HEPARINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PVAL 107
TABELA 24 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA HEPARINA A PARTIR DO USO DE DIFERENTES TENSOATIVOS NA FASE AQUOSA EXTERNA..... 108
TABELA 25 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA HEPARINA EM MATRIZ POLIMÉRICA DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) COM DIFERENTES GRUPOS TERMINAIS 109

LISTA DE ABREVIATURAS

A_1/O	Água em Óleo
$A_1/O/A_2$	Água em Óleo em Água
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ASTM	*American Society for Testing and Materials*
AT	Antitrombina
CAPA	Poli(ε-caprolactona)
CET	Cromatografia por exclusão de tamanho
CPG	Cromatografia de permeação em gel
CV%	Coeficiente de variação percentual
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DEG	Dietilenoglicol
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
HLB	Balanço lipofílico-hidrofílico
IUPAC	*Compendium of chemical terminology*
IVTF	Infravermelho com transformada de Fourier
LAPAC	Laboratório Pontagrossese de Análises Clínicas
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
$\overline{M_n}$	Massa molar numérica média
$\overline{M_w}$	Massa molar ponderal média
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Massa molar
m/V	Massa por volume
PAL	Poli(ácido lático)
PCL DIOL	Policaprolactona diol
PCL	Poli(ε-caprolactona) diol

PEG	Polietilenogligol
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHB	Poli(3-hidroxibutirato)
PHBV	Poli(3- hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)
PLGA	Poli(ácido lático-*co*-glicólico)
PPG	Polipropilenoglicol
PVAl	Poli(álcool vinílico)
PVP	Poli(vinilpirrolidona)
RMN	Ressonância magnética nuclear
$SnOct_2$	Octanoato de estanho
TGI	Trato gastrintestinal
THF	Tetra-hidrofurano
TTP-a	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UI	Unidades Internacionais

GLOSSÁRIO

Anticoagulantes – Fármacos utilizados para prevenir a formação de trombos;

Antitrombina III – Glicoproteína sintetizada pelo fígado e pelas células endoteliais, que tem a função de inibir fisiologicamente o processo de coagulação sanguínea, evitando a formação de trombos. Sua ação é potencializada pela heparina;

Embolia pulmonar – Trombos (coágulos) que bloqueiam os vasos pulmonares;

Gavagem – Método de introdução de alimentos ou produtos líquidos, através de tubo, pelo nariz ou pela boca em animais de experimentação;

Hemostasia – Equilíbrio entre a hemorragia e a trombose;

Plaquetas – Também conhecidas como trombócitos, são fragmentos do citoplasma dos megacariócitos. Embora desprovidas de material nuclear, apresentam elevada atividade bioquímica e têm importante participação no processo de coagulação sanguínea;

Trombocitopenia – Redução do número de plaquetas (trombócitos) abaixo dos valores normais;

Trombos – agregados de fatores sanguíneos, envolvendo plaquetas, fibrina e outros elementos celulares, que participam da hemostasia, por vezes é denominado de coágulo;

Trombose venosa – formação de trombos (coágulos) dentro do vaso sanguíneo. Ocorre quando o sistema hemostático é ativado inapropriadamente;

Unidades Internacionais (UI) – unidade utilizada para substâncias cuja atividade biológica não tem boa correlação com sua massa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 OBJETIVOS 22
2.1 Objetivo Geral 22
2.2 Objetivos Específicos 22

3 REVISÃO DE LITERATURA 23

4 MATERIAL E MÉTODOS 41
4.1 REAGENTES E SOLVENTES 41
4.2 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁTICO) 42
4.2.1 Síntese do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) 42
4.2.2 Síntese do *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) 44
4.2.3 Síntese do *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) 45
4.3 SÍNTESE DO CONJUGADO HEPARINA E α-HIDROXI-ω-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 46
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS 47
4.4.1 Ensaio de consistência 47
4.4.2 Determinação do índice de acidez 47
4.4.3 Determinação do índice de hidroxila 48
4.4.4 Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier 51
4.4.5 Determinação da massa molar 52
4.4.6 Avaliação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) 53
4.4.7 Análise por difração de raio-X 53
4.5 ENCAPSULAÇÃO DA HEPARINA EM NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) 53

4.5.1 Obtenção das nanopartículas contendo heparina por meio do método de emulsão múltipla e evaporação do solvente 53

4.5.2 Elaboração das nanopartículas do conjugado entre heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) pelo método de nanoprecipitação 55

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS NANOPARTICULADOS 55

4.6.1 Determinação da heparina incorporada nas nanopartículas 55

4.6.2 Análises morfológicas e de superfície 57

4.7 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS CONTENDO HEPARINA 57

4.7.1 Animais experimentais 57

4.7.2 Administração dos materiais poliméricos contendo heparina58

4.7.3 Coleta das amostras de sangue 59

4.7.4 Avaliação da atividade anticoagulante dos materiais poliméricos contendo heparina 59

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61

5.1 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁTICO) 61

5.1.1 Síntese do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)..... 61

5.1.2 Síntese do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático)..... 65

5.1.3 Síntese do *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático)..... 66

5.2 SÍNTESE DO CONJUGADO HEPARINA E *α*-HIDROXI-*ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO) 67

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS 73

5.3.1 Determinação do índice de acidez 73

5.3.2 Determinação do índice de hidroxila 76

5.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho 83

5.3.4 Massa molar numérica média 88

5.3.5 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear 90

5.3.6 Difração de raio-X dos materiais poliméricos 93

5.4 ENCAPSULAÇÃO DA HEPARINA EM NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) 95

5.4.1 Nanopartículas da heparina obtidas por meio do método de emulsão múltipla e evaporação do solvente 95

5.4.2 Quantificação da heparina encapsulada nas partículas 107

5.4.3 Avaliação da ação anticoagulante das nanopartículas de heparina obtidas por emulsão múltipla e evaporação do solvente 109

Figura 45 – Representação gráfica da atividade anticoagulante das nanopartículas de heparina, produzidas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente 110

5.5 NANOPARTÍCULAS DE HEPARINA PREPARADAS POR MEIO DO MÉTODO DE NANOPRECIPITAÇÃO 111

5.5.1 Análise morfológica e de superfície 111

5.5.2 Avaliação da ação anticoagulante do complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e das nanopartículas obtidas por nanoprecipitação 112

6 CONCLUSÕES 116

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 118

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo desenvolvimento de sistemas poliméricos para a liberação de fármacos tem sido crescente. Nos últimos anos, ancorados na engenharia genética e na biotecnologia, muitos trabalhos vêm sendo realizados visando a produção de novos sistemas como alternativa aos esquemas convencionais de terapêutica farmacológica.

Uma atenção especial tem sido dada à utilização de fármacos macromoleculares com funções terapêuticas como peptídeos e proteínas, na forma de vacinas, hormônios e DNA recombinante e, nesse sentido, grandes avanços já foram alcançados.

Embora esses tratamentos sejam muito promissores, ainda se encontram dificuldades para o seu emprego, como a instabilidade desses fármacos diante da ação enzimática e sua grande dificuldade em superar as barreiras orgânicas para o exercício de sua ação biológica. Fatos como esse levaram à necessidade do desenvolvimento de sistemas que protegessem esses fármacos, facilitassem sua absorção e, dessa forma, garantissem sua atividade terapêutica.

Para essa exercer esse papel, os sistemas de liberação modificada se apresentaram como uma grande opção. Esses sistemas envolvem aspectos multidisciplinares e oferecem muitas vantagens em relação à terapêutica convencional, sendo as principais: maior eficácia, diminuição da toxicidade e proteção do fármaco contra a degradação. Além disso, ainda, pode-se destacar como vantagem, que essas formas farmacêuticas podem ser projetadas para apresentar um maior tempo de permanência na circulação, ou para o seu direcionamento aos alvos específicos.

Dessa forma, a utilização de fármacos encapsulados pode, também, proporcionar uma opção de administração mais acessível, como no caso da via oral, o que é sempre desejável, pois propiciam maior conforto aos pacientes, garantindo, assim, uma maior adesão ao tratamento.

A heparina, aplicada no tratamento e na profilaxia da trombose venosa profunda, pode ser citada como um exemplo característico de fármaco administrado invariavelmente pela via endovenosa ou pela via subcutânea, o que causa um desconforto ao paciente e dificuldade na continuidade do tratamento terapêutico.

Embora, de modo geral, o processo de encapsulação de fármacos não apresente maiores dificuldades muitos tratamentos, como o citado acima, utilizam como fármacos as macromoléculas hidrofílicas, o que determina um desafio maior, o desenvolvimento sistemas de liberação capazes de encapsular de forma eficiente essas moléculas e sem alterar suas propriedades farmacodinâmicas.

O primeiro passo para se atingir esse objetivo é a seleção dos polímeros que formarão a matriz polimérica. O mercado oferece muitos polímeros, de origem sintética ou natural, que podem ser empregados para esse fim. Ainda que os materiais de origem natural tenham sido bastante atraentes por algumas de suas características, outros aspectos dificultam a sua aplicação sendo, portanto, os polímeros sintéticos os mais utilizados na tecnologia farmacêutica.

Apesar das muitas opções disponíveis na atualidade, muitas vezes se faz necessária a síntese ou a modificação estrutural de polímeros para que se atinjam os requisitos necessários e se obtenha o melhor desempenho para o sistema proposto, favorecendo, assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação com diferentes características, apropriados para os diversos fármacos.

Vários parâmetros, como o método selecionado, a matriz polimérica, o agente estabilizante, o fármaco a ser encapsulado, entre outros, interferem na produção e nas características desses sistemas. Assim, cada sistema deve ser desenvolvido individualmente para que se possa alcançar o objetivo ao qual se destina, não bastando, portanto a produção de uma fórmula padrão.

Considerando essas importantes questões, nesse trabalho foi proposto o desenvolvimento de materiais poliméricos a partir da síntese e de modificações estruturais no poli(ácido lático) para a nanoencapsulação da heparina, visando a sua administração por via oral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver sistemas poliméricos a partir de materiais biodegradáveis, baseados no poli(ácido lático) e heparina, passíveis de administração por via oral.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar poliésteres biodegradáveis utilizando o ácido lático como monômero.
- Promover a conjugação da molécula de heparina com o poli(ácido lático), possibilitando a modificação do seu caráter hidrofílico.
- Caracterizar os materiais poliméricos obtidos.
- Produzir nanopartículas contendo heparina a partir dos polímeros sintetizados, aplicando o método de emulsão múltipla com evaporação do solvente.
- Preparar nanopartículas por meio do processo de nanoprecipitação, utilizando o conjugado formando entre heparina e poli(ácido lático).
- Proceder a caracterização dessas nanopartículas produzidas.
- Avaliar a ação anticoagulante, *in vivo*, das nanopartículas de heparina elaboradas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A coagulação sanguínea é um mecanismo fisiológico essencial para a manutenção da hemostasia. Em algumas situações, o descontrole desse mecanismo pode levar a fenômenos hemorrágicos (sangramento) ou à formação de trombos, condição patologia conhecida como trombose, que é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (SILVA; HASHIMOTO, 2006; MCKENZIE, 1996).

Esse complexo processo fisiológico pode ser dividido em dois estágios, o primeiro, a hemostasia primária, que envolve a vasoconstrição de pequenos vasos e a formação de um tampão plaquetário. O segundo estágio, a hemostasia secundária, que compreende os fatores teciduais, o cálcio e as proteínas plasmáticas da coagulação, que interagem na superfície celular para consolidar o tampão de fibrina-plaquetas (LOTSPEICH-STEININGER, 1998; JOBE, 1998; BAIN, 1986). A Tabela 1 apresenta a seqüência de eventos que ocorrem após uma lesão vascular.

TABELA 1 – Seqüência básica de eventos que ocorrem na hemostasia primária e secundária, após a lesão vascular

Fase	Evento	Comentários
1	Vasoconstrição (P)	Modificada pela musculatura lisa; tem sua ação aumentada pelos elementos secretados pelas plaquetas
2	Adesão plaquetária (P)	Adesão ao tecido conectivo subendotelial exposto no vaso lesado
3	Agregação plaquetária (P)	Interação e adesão de uma plaqueta com as outras para iniciar o tamponamento do local da lesão
4	Consolidação do tampão fibrina-plaqueta (S)	Interação dos fatores de coagulação na superfície plaquetária com produção de fibrina. Formação do tampão formado fibrina-plaquetas no sítio da lesão, estancando o sangramento.

Legenda: P = hemostasia primária; S = hemostasia secundária

Fonte: Lotspeich-Steininger (1998)

A hemostasia secundária ocorre basicamente através de três vias de coagulação, a via extrínseca, a via intrínseca e a via comum (Figura 1).

Os fatores de coagulação envolvidos nessa fase do processo correspondem a uma série de glicoproteínas com massa molar superior a 40.000 $g.mol^{-1}$ (D´AMICO; VILLAÇA, 2006), podendo ser designados por algarismos romanos ou pelos nomes determinados pelo Comitê Internacional de Nomenclatura de Fatores Sanguíneos de

Coagulação, conforme segue: fator I (fibrinogênio), II (protrombina), III (fator tecidual), IV (cálcio), V (próacelerina), VII (próconvertina), VIII (fator anti-hemofílico), IX (fator de Christmas), X (fator de Stuart), XII (fator anti-hemofílico C), XII (fator de Hageman), XIII (fator estabilizador da fibrina). Além desses fatores, existem ainda a pré-calicreína e o cininogênio de alta massa molar. Sua forma ativa os fatores também recebem denominação por meio de algarismos romanos, acompanhadas da letra *a*, simbolizando a sua forma ativa ou por vezes são utilizados nomes usuais, como no caso, por exemplo, do fator II*a*, mais conhecido como trombina (LOTSPEICH-STEININGER, 1998).

Em sua maioria, esses fatores encontram-se na forma de pró-enzimas, ou serina-proteases, que atuam como substratos desprovidos de atividade biológica. Após sua clivagem, expõem resíduos de serina em seu centro, passando a ser enzimaticamente ativos (BAIN, 2006).

O fenômeno de conversão dessas pró-enzimas em sua forma ativa ocorre através de uma cascata de reações enzimáticas, que culmina na formação de uma enzima final chamada de trombina, a qual atua sobre o fibrinogênio solúvel, promovendo sua conversão em polímeros insolúveis de fibrina sobre o tampão plaquetário, tornando-o, assim, mais resistente (SAVILLE; BROWN, 2007; D´AMICO; VILLAÇA, 2006). O processo de coagulação e o mecanismo de anticoagulação podem ser observados na Figura 1.

Considerando que pequenas quantidades de agentes pró-coagulantes podem ativar grande quantidade dos seus substratos, são necessários mecanismos de controle hemostáticos eficientes que limitem o tampão hemostático formado ao tamanho necessário. Os inibidores da coagulação neutralizam os pró-coagulantes ativos para evitar a disseminação desmodificada da coagulação, que levaria a um estado de hipercoagulabilidade, predispondo à trombose. Esses inibidores fisiológicos da coagulação são os complexos da proteína S e da proteína C, a trombomodulina, o receptor endotelial da proteína C, o inibidor da via do fator tissular e a antitrombina (AT), conhecida anteriormente como antitrombina III (ATIII) (SILVA; HASHIMOTO, 2006; LEE, *et al*.,1993).

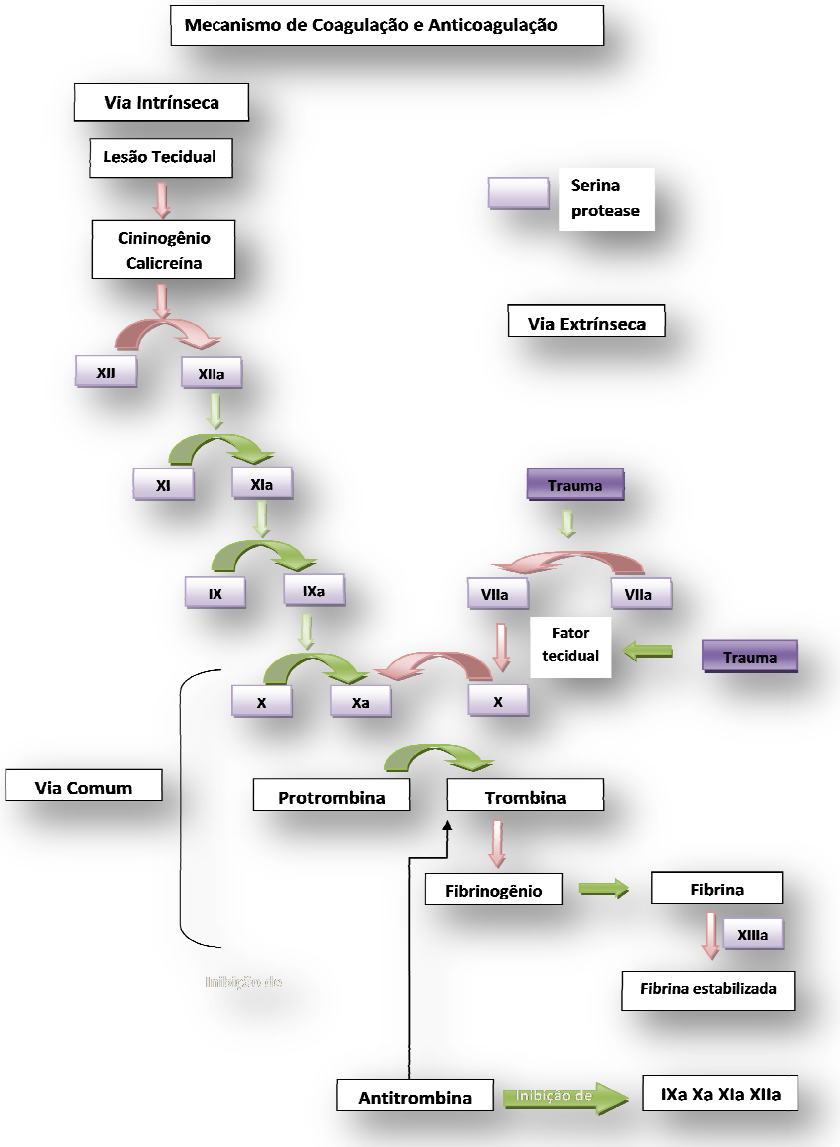


FIGURA 1 – Mecanismo de coagulação sanguínea e ação da antitrombina como anticoagulante
Fonte: adaptado de Saville e Brown (2007)

A partir desse momento será dada especial atenção ao mecanismo de ação da anticoagulação promovida pela antitrombina em função de sua interação com a heparina, objeto desse trabalho.

A antitrombina, o mais potente inibidor da coagulação (SAVILLE; BROWN, 2007), é uma alfa2-glicoproteína com massa molar de aproximadamente 58.000 mol.g $^{-1}$, produzida no fígado. No processo de anticoagulação ocorre uma reação entre a antitrombina e a trombina, envolvendo a ligação entre um resíduo de arginina da antitrombina e o centro ativo, serina, da trombina, formando um complexo

bimolecular, que é rapidamente retirado da circulação pelas células hepáticas (D´AMICO; VILLAÇA, 2006; BITHELL, 2003).

Esse processo de anticoagulação ocorre numa taxa relativamente lenta, entretanto é consideravelmente acelerado na presença da heparina, um anticoagulante de ocorrência natural, com massa molar média de 20.000 $g.mol^{-1}$, cuja estrutura está representada na Figura 2 (MONEY; YORK, 2001; LEE *et al*.,1993).

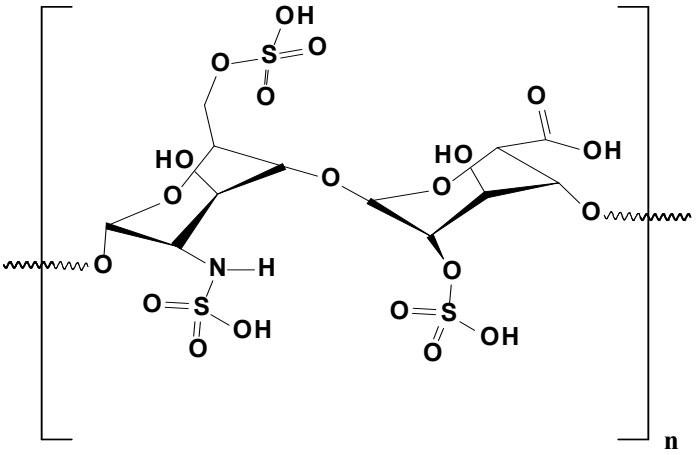


FIGURA 2 **–** Estrutura química da molécula de heparina

Para fins comerciais as preparações de heparina são obtidas de pulmão bovino ou de carneiro e, principalmente, de intestino suíno (MIDDELDORP, 2007). È solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos, como metanol, etanol e acetona. Em solução se apresenta estável em uma faixa de pH que varia entre 4 e 9, sendo rotineiramente utilizada na forma sódica. Sua ação anticoagulante se dá através da ligação da molécula de heparina a resíduos lisil da antitrombina, o que acelera a taxa de formação do complexo inibidor enzimático, sem alterar a estequiometria da reação. O resultado é o aumento da potência inibitória desse complexo, provavelmente decorrente de uma mudança conformacional que expõe os sítios enzimáticos de reação. Dessa forma, considera-se a antitrombina como o anticoagulante e a heparina o cofator (STIENE-MARTIN *et al*., 1998; LEE *et al*., 1993; RUBIN; FARBER, 1990). Devido ao grande aumento na ação da antitrombina sobre a trombina em presença da heparina, essa tem sido o anticoagulante mais empregado no tratamento e profilaxia da trombose venosa profunda (MIDDELDORP, 2007).

Além da trombina, a antitrombina inativa vários outras enzimas que apresentam sítio ativo serina, como o fator X*a*, fator IX*a* e calicreína (LEE *et al.*, 1993).

Nos casos de trombose, ou seja, quando há um desequilíbrio da hemostasia, levando à formação de trombos ou coágulos, é imperativo o tratamento profilático, para o qual a heparina é o anticoagulante de escolha, sendo administrada por via endovenosa ou subcutânea (MIDDELDORP, 2007; JIAO *et al.*, 2002).

Segundo Brunton, Lazo e Parker (2006) a heparina não tem absorção gastrintestinal, portanto se faz necessária sua administração por infusão contínua endovenosa, quando apresenta ação imediata, ou por injeção subcutânea, forma em que apresenta considerável variação em sua biodisponibilidade, tendo um atraso de 1 a 2 horas em sua ação.

Sua biodegradação irregular determina uma dose-resposta altamente variável, o que se deve, em parte, às diferenças na biodisponibilidade subcutânea da heparina e a ocupação competitiva de sítios de ligação. A heparina é removida da circulação pelas células reticuloendoteliais e pelo endotélio e é degradada por uma enzima hepática, a heparinase (STIENE-MARTIN *et al*., 1998; LEE, *et al.*, 1993; RUBIN; FARBER, 1990).

A meia-vida da heparina no plasma depende da dose administrada. Quando doses de 100, 400 ou 800 UI/kg do fármaco é administrado por via endovenosa, a atividade anticoagulante é próxima a 1, 2 e 5 horas, respectivamente.

Mais recentemente, o desenvolvimento das “heparinas de baixa massa molar”, a partir do fracionamento por despolimerização enzimática da heparina não fracionada, simplificou o tratamento e a prevenção das desordens trombóticas e estas têm sido utilizadas extensivamente no tratamento inicial do tromboembolismo venoso (PINEO *et al*., 2004).

Entretanto, a utilização da heparina via parenteral apresenta algumas desvantagens: uma janela terapêutica muito estreita, uma dose resposta muito variável exigindo monitoramento laboratorial constante, além da possibilidade de desenvolvimento da trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue) em um número significativo de pacientes que fazem tratamento prolongado com heparina. Além disso, há de se considerar o desconforto da injeção subcutânea da heparina em intervalos curtos e regulares de tempo (PINEO *et al*., 2004; MONEY; YORK, 2001).

A sua administração oral seria muito mais conveniente para o paciente, entretanto, por não apresentar absorção gastrointestinal, o desenvolvimento de formulações orais de heparina na forma de complexo ou encapsulada em sistemas poliméricos de liberação, constitui objeto de grande importância clínica, não apenas por eliminar o desconforto da dor durante as aplicações, mas por diminuir o tempo de internamento e melhorar a adesão do paciente ao tratamento (ITO, 2006; KIM *et al*., 2005; HIEBERT; WICE; PING, 2005; HIEBERT; WICE; PING, 2004).

Os sistemas de liberação de fármacos podem ser veiculados no organismo através de diferentes vias de administração. Dentre as mais utilizadas podem ser citadas a parenteral e a oral, embora também possam ser empregadas a tópica e a nasal. A escolha da rota mais adequada depende da conveniência e da necessidade, entretanto é notório que a rota escolhida afetará profundamente a absorção, a liberação e a distribuição do fármaco no organismo.

A via parenteral, por definição, inclui qualquer rota que não seja a rota gastrointestinal (enteral), assim, a via parenteral se refere às vias endovenosa, intramuscular e subcutânea. Um medicamento aplicado por via endovenosa entra diretamente na circulação, não havendo barreiras a serem superadas; a via intramuscular apresenta uma absorção relativamente rápida, sendo utilizada quando não se necessita um efeito imediato; já na via subcutânea o medicamento é aplicado no tecido conectivo alveolar, imediatamente abaixo da pele, apresentando uma absorção mais lenta (LEE; ROBINSON, 2000).

A via oral, embora seja a via mais conveniente, continua sendo um desafio para a administração de fármacos encapsulados em sistemas de liberação, incluindo micro ou nanopartículas, devido às barreiras fisiológicas e morfológicas impostas pelo trato gastrointestinal (JUNG *et al*., 2000), tais como enzimas proteolíticas intestinais (pepsina, tripsina, quimitripsina), endopeptidases, membrana mucosa, flora bacteriana intestinal e células epiteliais do revestimento.

A arquitetura histológica da mucosa gastrointestinal previne eficientemente a entrada de material particulado proveniente do ambiente. Apesar desta restrição, a membrana mucosa não é impenetrável e, embora controverso, hoje é aceito que o transporte de nanopartículas ocorre por esta via. O mecanismo de transporte pode ocorrer por três caminhos: por uma rota paracelular; por endocitose realizada pelos enterócitos, ou por um mecanismo imunológico associado ao tecido linfóide (MORISHITA *et al*., 2004; JUNG *et al*., 2000; TOBÍO *et al*., 2000; ALLÉMANN;

LEROUX; GURNY, 1998). Esses mecanismos estão apresentados esquematicamente na Figura 3.

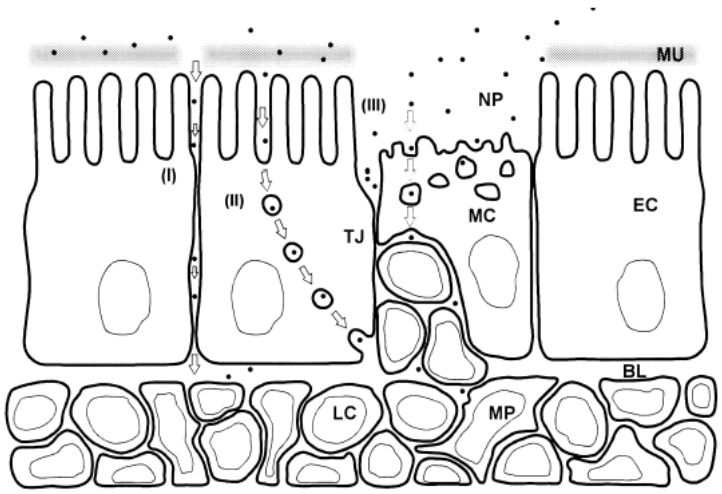


FIGURA 3 – Representação esquemática das possíveis rotas de translocação de nanopartículas (NP) pela membrana mucosa intestinal, sendo, MU (mucosa); EC (enterócitos); MC (células microvilosas de membrana); LC (linfócitos); MP (macrófagos); BL (lâmina basal); TJ (junção); I (absorção paracelular); II (endocitose pelos enterócitos); III (através das células M).

Fonte: Jung *et al*. (2000)

Apesar das dificuldades apresentadas, o conhecimento acumulado durante os últimos anos sobre o mecanismo de interação entre biomateriais nanoestruturados e as superfícies biológicas, bem como a descoberta de novas nanotecnologias, tem trazido uma perspectiva promissora para a aplicação de nanocarregadores de macromoléculas através das mucosas (PREGO *et al*., 2005).

Estudos têm demonstrado que, na absorção de sistemas de liberação na forma de micro ou nanopartículas pelo trato gastrointestinal, o tamanho das partículas é fator determinante, sendo vários autores estão de acordo com o fato de que a absorção aumenta com a diminuição do diâmetro da partícula. Morishita *et al*. (2004), em estudo realizado com micropartículas, também encontrou resultados concordantes. Outro fator crucial é a natureza das partículas e as modificações de superfície, desenhadas para melhorar a interação com receptores, facilitando a vetorização e sua entrada nas células (PREGO *et al*., 2005; FLORENCE 2005; MORISHITA *et al*., 2004).

Uma vez que o fármaco tenha sido administrado no organismo por meio de um sistema de liberação, ele poderá ser liberado através de um dos três mecanismos primários: difusão, intumescimento seguido de difusão ou degradação do polímero.

No processo de difusão, o fármaco passa através do polímero, sem que haja alteração do mesmo. A difusão pode se dar em escala macroscópica, pelos poros da matriz polimérica ou a nível molecular, passando através das cadeias poliméricas.

O intumescimento seguido de difusão é possível quando o sistema de liberação for desenhado de tal forma que não haja possibilidade de liberação do fármaco antes que se encontre em um meio biologicamente apropriado. Nessas condições favoráveis, o polímero absorverá água ou outro líquido biológico, intumescendo pelo aumento do conteúdo de solvente aquoso permitindo que o fármaco possa, então, difundir através da matriz polimérica.

No terceiro processo, de degradação do polímero, diferente dos modelos citados acima, as matrizes poliméricas se degradam no interior do organismo como resultado de processos biológicos normais, eliminando a necessidade de remoção do sistema após liberação do fármaco. As cadeias poliméricas destes polímeros biodegradáveis sofrem hidrólise resultando em cadeias progressivamente menores, biocompatíveis, como no caso dos polilactídeos e poliglicolídeos e seus copolímeros, cuja degradação resulta na formação de ácido lático e de ácido glicólico, respectivamente. Esses entram no ciclo de Krebs, sendo posteriormente transformados em dióxido de carbono e água e excretados (BRANNON-PEPPAS, 1997).

Analisando por esse contexto, os sistemas de liberação de fármacos apresentam inúmeras vantagens sobre os sistemas convencionais, sendo as mais importantes: aumento de sua eficácia, com manutenção dos níveis terapêuticos adequados, proteção do fármaco contra a degradação, direcionamento aos alvos específicos, possibilidade de incorporação de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos, maior facilidade de atravessar barreiras biológicas, como estômago e intestino, diminuição da toxicidade, maior tempo de permanência na circulação e menor número de administrações da medicação e, conseqüentemente, maior adesão do paciente ao tratamento (BREUNIG; BAUER; GOEPFERICH, 2008; LEE; ZHANG; FENG, 2007; OLIVEIRA; LIMA, 2006; LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004;

SIEPMANN *et al*., 2004; KUMAR, 2000; BRANNON-PEPPAS, 1997; FLORENCE, *et al*., 1995).

O desenvolvimento e a preparação dos sistemas de liberação modificada de fármacos envolve inúmeras áreas de conhecimento, caracterizando sua multidisciplinaridade (KUMAR, 2000).

Esses sistemas de liberação podem apresentar formas variadas, dependendo do tipo de polímero utilizado e da técnica de preparo empregada para sua obtenção. Os principais tipos são os lipossomas, as nanopartículas e as micropartículas, sendo que os fármacos carregados nesses sistemas podem estar aprisionados fisicamente ou ligados ao polímero através de ligações primárias efetivas (NORI; KOPECEK, 2005; SONG *et al*, 1997).

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, rodeadas por compartimentos aquosos (Figura 4). Conforme a quantidade de camadas pode-se ter os lipossomas unilamelares ou multilamelares. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade, esses sistemas têm encontrado ampla aplicação, desde a área de cosméticos até a liberação de fármacos e genes, bem como em diagnóstico e na indústria alimentícia (ASHAN *et al*., 2002; KELLER, 2001).

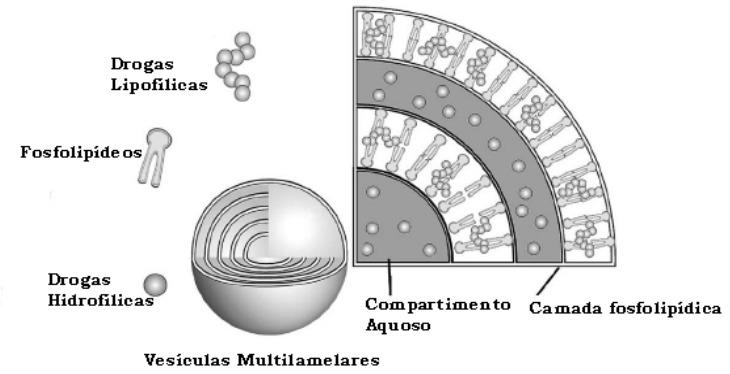


FIGURA 4 – Representação esquemática de um lipossoma multilamelar
Fonte: adaptado de Keller (2001)

As partículas poliméricas podem ser classificadas como nanopartículas ou micropartículas, baseadas no tamanho.

As nanopartículas são partículas poliméricas sub-micrométricas que geralmente apresentam tamanho entre 10 nm e 1000 nm, enquanto as micropartículas apresentam um diâmetro que varia entre 1 e 1000 *μ*m. Em sua preparação, o fármaco é dissolvido em solvente apropriado, aprisionado (encapsulado ou ligado à matriz polimérica) e, dependendo do método de preparação, podem ser obtidas nano/microcápsulas ou nano/microesferas. As nano/microcápsulas são sistemas compostos por uma única camada polimérica que envolve um núcleo, enquanto as nano/microesferas consistem em uma matriz polimérica na qual os fármacos são física e uniformemente dispersos (BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2003; BRIGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002; SOPPIMATH *et al*., 2001; KUMAR, 2000; ARSHADY, 1999; ALLÉMAN; LEROUX; GURNY, 1998; COUVREUR *et al*, 1997; AFTABROUCHAD; DOELKER, 1992), conforme apresentado na Figura 5.

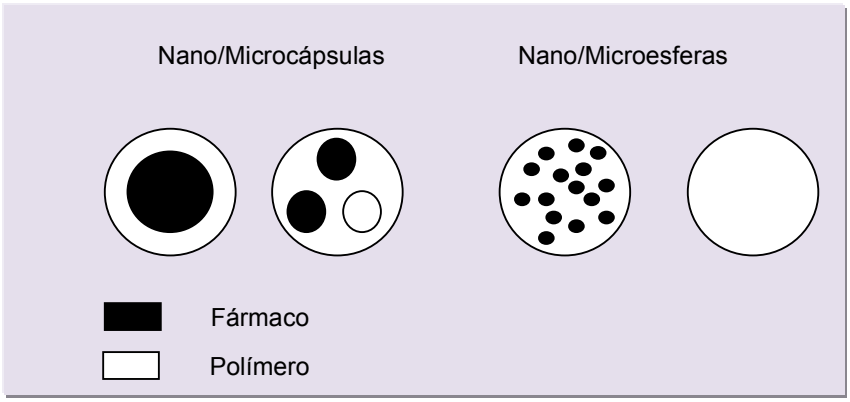


FIGURA 5 – Representação esquemática das nano/micropartículas
Fonte: adaptado de Aftabrouchad e Doelker (1992)

A decisão pelo desenvolvimento de uma formulação na forma de micro ou de nanopartículas depende da função para a qual será aplicada. Pode-se dizer que as nanopartículas apresentam algumas vantagens sobre as micropartículas quando se deseja uma administração endovenosa, pois os menores capilares do corpo têm diâmetro de 5 a 6 μm. Considerando que o tamanho das nanopartículas dispersas no sangue são consideravelmente menores, há garantia que a partícula não causará embolismo (HANS; LOWMAN, 2002).

Em geral, os métodos utilizados na preparação de micro ou nanopartículas para uso farmacêutico, podem ser classificados em duas categorias principais, a primeira baseada em reações químicas como a polimerização de monômeros dispersos e a segunda decorrente das propriedades físico-químicas de polímeros pré-formados (FREIBERG; ZHU, 2004; SAKUMA; HAYASHI; AKASHI, 2001; SOPPIMATH *et al.*, 2001; QUINTANAR-GUERRERO *et al*., 1996; COUVREUR, 1997).

Considerando a segunda categoria citada acima, a escolha entre os vários métodos existentes para a preparação de nano ou micropartículas depende, basicamente, da natureza do fármaco que se pretende encapsular, ou seja, fármacos lipofílicos ou hidrofílicos (ZAMBAUX *et al*.,1998). Os fármacos hidrofóbicos, em geral, são mais fáceis de encapsular, devido à sua maior solubilidade nos solventes orgânicos utilizados nas formulações, enquanto os fármacos hidrofílicos apresentam um desafio maior devido à sua tendência em migrar para a fase aquosa da preparação (BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2003; JAIN, 2000).

Outro desafio que se apresenta é a encapsulação de fármacos hidrofílicos macromoleculares, como proteínas e peptídeos, em decorrência do desenvolvimento de novos tratamentos que utilizam proteínas como vacinas, hormônios, fatores de crescimento e do surgimento de materiais da engenharia genética e da biotecnologia, como o DNA recombinante. Também se podem citar outras macromoléculas, como a heparina, já empregadas tradicionalmente na medicina.

Esses fármacos apresentam baixa biodisponibilidade devido a degradabilidade frente a enzimas e dificuldade de atravessar as barreiras biológicas (LEE; ZHANG; FENG, 2007; HOFFART *et al*., 2006; COUVREUR *et al*., 1997).

Esses fatos justificam os esforços empregados no desenvolvimento e na melhoria de sistemas de liberação, que protegem os fármacos e favorecem a transposição das barreiras biológicas.

O método mais comumente utilizado para o desenvolvimento de sistemas nano ou microencapsulados, contendo fármacos hidrofílicos, está baseado na emulsificação de polímeros pré-formados. Para tanto três técnicas fundamentais têm sido empregadas: a emulsificação seguida de evaporação do solvente, o procedimento de *salting-out* e a nanoprecipitação (QUINTANAR-GUERRERO *et al*.,

1996), a partir das quais foram desenvolvidas várias derivações com o objetivo de atingir as melhores condições de encapsulação para cada fármaco.

A emulsificação seguida de evaporação do solvente é o método mais comumente usado para a precipitação de nanopartículas poliméricas sólidas. Essa técnica é muito eficiente para a incorporação de fármacos lipofílicos, mas pouco adequada para incorporação de fármacos hidrofílicos. Nesse procedimento, o fármaco hidrofóbico, o polímero e o solvente orgânico constituem uma fase orgânica, que é emulsionada em uma fase aquosa, formando uma emulsão água em óleo (A/O). O solvente é então eliminado por evaporação ou por difusão. (HANS; LOWMAN, 2002; SAKUMA; HAYASHI; AKASHI, 2001; SOPPIMATH *et al.*, 2001; JAIN, 2000; COUVRER *et al*., 1997). Quando é empregada a técnica de difusão do solvente, é essencial que o fármaco e o polímero sejam solúveis no solvente escolhido, e esse deve ser parcialmente solúvel na água, para que a difusão possa ocorrer. A eliminação do solvente causa a separação do polímero e do fármaco ou óleo contido nessa fase e, conseqüentemente, a redução da partícula (MOINARD-CHÉCOT *et al*., 2008). Os solventes comumente utilizados são o diclometano, acetato de etila, entre outros (MOINARD-CHÉCOT *et al*., 2008; JAIN, 2000).

Segundo Moinard-Chécot *et al*. (2008) esse método apresenta vantagens sobre outros, como o uso de solventes orgânicos aceitáveis para o uso farmacêutico, alta reprodutibilidade, melhor controle do tamanho das partículas, além da facilidade de transposição para a escala industrial.

Considerando que a técnica descrita acima é pouco adequada para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, uma alteração neste protocolo foi realizada utilizando a técnica da emulsão múltipla para melhorar a incorporação de fármacos dessa natureza (SOPPIMATH *et al*, 2001; COUVRER *et al*., 1997). Vários autores têm aplicado essa técnica com sucesso para incorporação de fármacos hidrofílicos de baixa massa molar, como apresentado por Farago *et al*.(2008) que obteve êxito encapsulando cloridrato de metformina na forma de micropartículas. Outros autores relatam estudos de encapsulação na forma de micro ou nanopartículas utilizando essa técnica para encapsular fármacos de elevada massa molar, como oligonucleotídeos, peptídeos, heparina entre outras macromoléculas (LEE; ZANG; FENG *et al,* 2007; JIAO *et al*. 2002; DELIE *et al*., 2001).

Na técnica da emulsão múltipla, representada na Figura 6, uma solução aquosa do fármaco, com ou sem agente tensoativo, é emulsionada em uma fase orgânica, contendo um polímero hidrofóbico, dissolvido em um solvente orgânico.

Geralmente utiliza-se o diclometano para esse fim, entretanto alguns autores propõem a utilização de diferentes solventes, como dicloroetano, acetona, clorofórmio, entre outros. Essa primeira emulsão formada, chamada emulsão primária (A_1/O) é então emulsionada em uma fase aquosa, constituída por água, freqüentemente associada a agentes tensoativos para garantir sua estabilidade formando-se, então, uma emulsão múltipla ($A_1/O/A_2$). Vários tensoativos podem ser utilizados como agente estabilizante na fase aquosa externa, entretanto o poli(álcool vinílico) (PVAl), é mencionado pela maioria dos autores como o mais eficiente para essa função (JAIN, 2000; ZAMBAUX *et al*. ,1998; SCHOLES *et al*. ,1993). Nesse procedimento também é possível eliminar o solvente através de evaporação ou de difusão (JAIN, 2000).

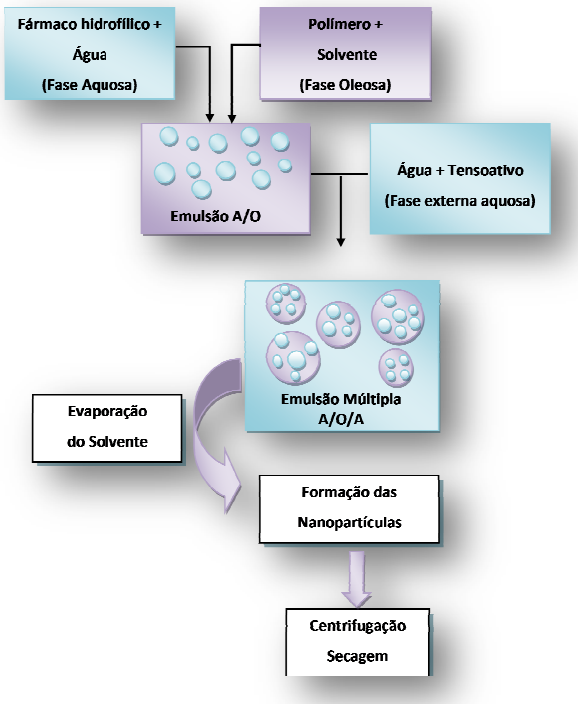


FIGURA 6 – Representação esquemática da produção de nanopartículas por meio do método de emulsão múltipla e evaporação do solvente

Inúmeros estudos têm sido conduzidos para avaliar os parâmetros envolvidos na produção de nanopartículas. Vários autores concordam em relação à

diminuição do tamanho das partículas com o aumento da agitação (NAMUR *et al*., 2006; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; SAHOO *et al*., 2002; SOPPIMATH *et al*., 2001; COUVREUR, *et al*., 1997). Por outro lado, essa concordância diminui quando existe a necessidade de obtenção de partículas da ordem sub-micrométrica; nesse caso, alguns autores sugerem a necessidade de aplicação de outro tipo de energia mecânica, a sonicação, em uma ou ambas as etapas do processo, como essencial para a obtenção dessas partículas (DELIE *et al*., 2001).

Outro parâmetro bastante estudado é a concentração do tensoativo estabilizante na fase aquosa externa da emulsão, sendo ela simples A/O ou múltipla (A/O/A). A maioria dos autores concorda que o aumento da concentração de estabilizante na fase aquosa externa implica na diminuição do tamanho das partículas (HOFFART *et al*., 2006; NAMUR *et al*., 2006; GALINDO-RODRIGUEZ *et al*., 2004; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; JIAO *et al*., 2001). Segundo Galindo-Rodriguez *et al*. (2004) vários mecanismos estão envolvidos nesse fenômeno, sendo que a interação das cadeias do PVAl na interface das gotículas pode reduzir a tensão interfacial, além de promover uma estabilização física e estérica, enquanto as cadeias não adsorvidas, presentes na solução, influenciam a viscosidade da fase contínua promovendo estabilidade hidrodinâmica. Apesar da concordância entre os autores sobre a redução do tamanho das partículas com o aumento da concentração do estabilizador, muita controvérsia pode ser observada em relação à concentração ideal para obtenção de partículas, em especial quando se trata de nanopartículas.

Outra técnica empregada para a produção de micro ou nanopartículas é a coacervação ou separação de fases, também chamada "*salting out*": De acordo com a definição da IUPAC (*Compendium of Chemical Terminology, eletronic version*), considera-se coacervação a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais, sendo a fase mais concentrada do componente coloidal o coacervado, e a fase menos concentrada, a solução de equilíbrio. Para que a separação de fases ocorra, um eletrólito deve ser adicionado; em geral, se aplicam sais que apresentem um ou mais dos seguintes cátions: Mg^{+2}, Li^{+}, Na^{+}, K^{+} e NH_4^{+} ou ainda, um ou mais dos seguintes ânions SO_4^{-2},HPO_4^{-2}, CH_3COO^{-}, $C_6H_5O_7^{3-}$, Cl^{-}, NO_3^{-}, ClO_3^{-}, I^{-}, ClO_4^{-} e SCN^{-} (US Patent 7164005). A presença do eletrólito, que reage com as moléculas de água, diminui a solubilidade das cadeias poliméricas em relação à água, devido ao efeito "*salting out"*, como conseqüência, cadeias poliméricas reagem entre si,

associando-se a cadeias vizinhas, formando agregados, que se depositam ao redor das gotículas lipofílicas da fase dispersa, formando uma camada protetora (BACHTSI; KIPARISSIDES, 1996).

Outro importante método utilizado na preparação de nanopartículas é o método da nanoprecipitação, também conhecido como deslocamento do solvente. Essa técnica, rápida e de fácil execução foi patenteada por Fessi e colaboradores (FESSI *et al*., 1989). Para a produção de nanoparticulas utilizando esse método é necessário o uso de dois solventes, sendo o polímero e o fármaco solúveis em um deles e insolúveis no outro, que é denominado não solvente. Quando o polímero entra em contato com o não solvente, ocorre uma rápida dessolvatação desse, levando à sua precipitação com encapsulação imediata do fármaco. A nanoprecipitação se deve a um fenômeno conhecido como efeito Marangoni (BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005; QUINTANAR-GUERRERO *et al*., 1998).

De acordo com Bilati, Allémann e Doelker (2005) esse método não requer a aplicação de energia elevada nem apresenta interfaces óleo/água, condições que podem danificar a estrutura protéica que está sendo encapsulada. Outra vantagem que pode ser observada nessa técnica é a ausência de solventes tóxicos ou a necessidade de tensoativos. Entretanto, a utilização desse método se limita a fármacos lipofílicos, assim, esses mesmos autores apresentaram uma proposta de desenvolvimento da técnica de precipitação para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, para a qual obtiveram resultados animadores.

Pelo exposto fica evidente que existe um grande número de métodos que podem ser empregado na produção de nano ou micropartículas, portanto, as características do fármaco a ser encapsulado, o polímero empregado e as condições disponíveis para a encapsulação devem ser minuciosamente estudadas antes da execução do processo, para que se possa atingir os melhores resultados de encapsulação e o tamanho mais adequado para a aplicação que se pretende.

Além do que, para que determinada formulação de um sistema de liberação tenha êxito, é necessário que o material empregado seja inerte, biocompatível, isento de impurezas, rapidamente metabolizado (MARCOS-FERNANDÈZ *et al.*, 2006; KUMAR, 2000).

Uma variedade de polímeros naturais e sintéticos, de baixa e de alta massa molar, tem sido empregada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Apesar da maior biodegradabilidade dos polímeros naturais, estes têm

sido menos utilizados em função da dificuldade na obtenção de materiais com a mesma pureza, de sua imunogenicidade e de sua instabilidade, o que confere aos polímeros sintéticos um lugar de destaque para esta aplicação (NORI; KOPECEK , 2005; HANS; LOWMAN, 2002).

Os polímeros biodegradáveis de origem sintética têm sido utilizados como uma alternativa aos plásticos não-biodegradáveis, pois além de contribuir com a diminuição da poluição ambiental, ainda apresentam ampla aplicação nas áreas biomédicas, nas quais se ressalta sua aplicação como matriz para os sistemas de liberação de fármacos, o que justifica o vultoso crescimento do interesse pela síntese e pelo desenvolvimento de polímeros e copolímeros completamente biodegradáveis (SUN *et al.*, 2006; TERSKI *et al.*, 2006; LEIVA *et al.*, 2006; MARCOS-FERNANDÈZ *et al.*, 2005),

Essas características são apresentadas pelos poliésteres, que compreendem todos os polímeros que contém o grupo funcional éter na cadeia polimérica principal. Sendo assim, uma infinidade de estruturas químicas pode se ligar a esses grupos ésteres, possibilitando a formação de uma diversidade de poliésteres com características distintas (HUANG; LI; VERT, 2004; EDLUND; ALBERTSSON, 2003).

Nesse contexto, podem ser citados os polihidroxialcanoatos (PHAs), poliésteres termoplásticos, representados pelo poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHBV), que são produzidos por fermentação por uma variedade de cepas bacterianas (CHEN; WU, 2005; KÖSE *et al.*, 2005; CHEN; DAVIS, 2002). Além desses, podem ser citados os poli(metacrilatos) que são polímeros acrílicos, amplamente difundidos na área farmacêutica, e as policaprolactonas (PCL), mas o grande destaque dentre os polímeros é o poli (ácido lático) [PAL] e seus copolímeros, em especial o poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico) [PLGA] (HIRSJARVI, PELTONEN; HIVONEN, 2007; LEE; ZHANG; FENG, 2007; PROIKAKIS *et al*., 2006; TSERKI *et al*, 2006; ZHANG; FENG, 2006; SOPPIMATH, *et al*, 2001).

O grande interesse por esses poliésteres, em especial o poli (ácido lático) e o poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico), para aplicação como matriz polimérica em sistemas de liberação de fármacos se deve ao fato de que são facilmente degradados formando subprodutos inócuos (ácido lático e ácido glicólico), que são facilmente absorvidos pelo organismo (CHEN *et al*., 2006; DAILEY; KISSEL, 2005;

DRUMOND; WANG, 2004; ANDREOPOULOS; HATZI; DOXASTAKIS, 2001; ANDREOPOULOS; HATZI; DOXASTAKIS, 1999; HYON; JAMSHIDI; IKADA, 1997).

O ácido lático é uma das menores moléculas opticamente ativas, e consiste em um ácido orgânico encontrado em muitos produtos naturais. Apresenta dois estereoisômeros, o L(-) e o D(+), sendo que os polímeros obtidos a partir do ácido lático variam muito em função da razão e da distribuição dos estereoisômeros.

Esses polímeros podem ser produzidos por diferentes rotas de polimerização. Os obtidos pela policondensação do ácido lático são conhecidos como poli(ácido lático), enquanto os que são obtidos por polimerização por abertura do anel do lactídeo correspondente, são chamados de polilactídeos. (SODERGARD; STOLT, 2002; MOON *et al*, 2001a; MOON *et al*, 2001b; HYON, 1997; AJIOKA, *et al*. 1995).

A popularidade desses polímeros se deve à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade bem documentadas. Mas, apesar das grandes vantagens desse material, sabe-se que o PLGA não pode ser utilizado em algumas situações. O efeito negativo que ele causa na estabilidade das proteínas durante a sua preparação e estocagem impede sua utilização como matriz para encapsulação desses fármacos. Isto se deve à degradação do PLGA, através da catálise ácida, que leva ao acúmulo de monômeros (de ácido lático e ácido glicólico) dentro do sistema de liberação, resultando numa diminuição do pH no microambiente e a conseqüente desnaturação das proteínas encapsuladas. Outro ponto negativo é a sua extrema hidrofobicidade, que resulta em baixa eficácia na encapsulação de fármacos hidrofílicos, em especial aqueles com baixa massa molar (DAILEY; KISSEL, 2005).

Para minimizar esses problemas, vários estudos têm sido conduzidos, e novos polímeros sintetizados. Alguns exemplos são o poli(ácido lático-*b*-etilenoglicol), formando um copolímero anfifílico (DRUMOND; WANG, 2004); poli(metoxietilenoglicol)-*co*-(ácido lático)-co-(ácido glicólico) (DING *et al*, 2006); poli(ácido lático-*b*-caprolactona) (LEIVA *et al*, 2006), dentre outros.

Os materiais assim formados possuem ainda baixa hidrofilicidade e não apresentam, em sua superfície, sítios para reconhecimento celular. Vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de melhorar essas características. Uma alternativa interessante é a introdução de segmentos hidrofílicos nos poliésteres alifáticos, criando um copolímero. Polissacarídeos como o amido e a dextrana são polímeros hidrofílicos naturais que têm sido empregados para este fim (CAI *et al*., 2003).

O poli(ácido lático) é um polímero com muitas aplicações em áreas médicas, como por exemplo, em suturas e grampos cirúrgicos, implantes ortopédicos e incorporação de fármacos. Essas aplicações tão diversificadas requerem polímeros com características particulares. Uma das características mais relevantes a ser considerada é a massa molar desse polímero. Assim, para o emprego do poli(ácido lático) em próteses é imprescindível que esse polímero tenha uma elevada massa molar, devido à dureza necessária a essa aplicação. Por outro lado, para a aplicação do poli(ácido lático) como matriz polimérica em sistemas de liberação de fármacos, podem ser utilizados polímeros de baixa massa molar, que são facilmente degradados formando subprodutos inócuos (ácido lático), que são absorvidos pelo organismo (CHEN *et al.,* 2006; DRUMOND; WANG, 2004; ANDREOPOULOS; HATZI; DOXASTAKIS, 2001; ANDREOPOULOS, HATZI; DOXASTAKIS, 1999; HYON; JAMSHIDI; IKADA, 1997).

A massa molar do poli(ácido lático) está fortemente relacionada com o tipo de reação e com o tipo de técnica escolhida para sua síntese. Assim, o poli(ácido lático) sintetizado por policondensação do ácido lático, tende a resultar na produção de oligômeros, enquanto a síntese através de polimerização por abertura do anel do lactídeo (poliadição) favorece a obtenção de polímeros de maior massa molar (CHEN *et al*., 2006; SODERGARD; STOLT, 2002; HYON; JAMSHIDI; IKADA, 1997).

As características e aplicações dos polímeros também podem ser influenciadas pelos grupos terminais presentes em sua estrutura. Vários autores têm estudado essa influência na degradação dos polímeros bem como em suas atividades biológicas. (CHHABRA; SACHDEVA; SINGH, 2007; WIGGNS *et al*., 2006; LEE *et al*., 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Água purificada, obtida por meio do sistema Milli-Q® (Ultrapure Water Purification System, MILLIPORE®).

Ácido lático, solução aquosa 90% (m/V) (SYNTH®).

Heparina precipitada, o equivalente a 20.000 UI de heparina foram acidificados com solução de ácido clorídrico a 10 % (V/V). Após, o material foi precipitado em acetona e seco na temperatura ambiente.

Heparina sódica, solução aquosa contendo 5.000 UI.mL^{-1} (CRISTÁLIA®).

Heparina sódica, solução aquosa contendo 5.000 UI/0,25 mL (PARINEX®).

Octanoato estanoso (FLUKA®).

Piridina P.A. (GRUPO QUÍMICA®), seca com hidróxido de bário (SYNTH®) e, purificada por destilação fracionada a 112 ºC.

Poli(álcool vinílico) com massa molar (MM) de 80.000 g.mol^{-1} (FLUKA®).

Poli(ε-caprolactona), com MM de 400 g.mol^{-1} e terminação diol (CAPA 2043 SOLVAY®).

Poli(ε-caprolactona), com MM de 830 g.mol^{-1} e terminação diol (CAPA 2085 SOLVAY®).

Poli(álcool vinílico) com MM de 13.000 a 23.000 g.mol^{-1} (FLUKA®).

Poli(álcool vinílico) com MM de 70.000 a 80.000 g.mol^{-1} (FLUKA®).

Poli(álcool vinílico) com MM de 123.000 g.mol^{-1} (FLUKA®).

Poli(tereftalato de etileno) (PET) com MM de 30.000 g.mol^{-1} (RHODIA STER®).

Polietilenoglicol com MM de 400 g.mol^{-1} (PEG, DELAWARE®).

Polipropilenoglicol com MM de 1.300 g.mol^{-1} (PPG, VORANOL DOW CHEMICAL®).

Poli(tereftalato de etileno) (PET) com MM de 39.000 g.mol^{-1}, reciclado a partir de embalagens comerciais para água mineral, refrigerante e chá.

Os solventes orgânicos foram devidamente purificados, de acordo com procedimentos preconizados pela literatura (MANO; DIAS, 2005; PERRIN; ARMAREGO, 1988). Os demais reagentes apresentaram grau analítico e foram utilizados sem qualquer tratamento prévio.

4.2 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁTICO)

De forma sumarizada, a síntese do poli(ácido lático) foi realizada pelo método de polimerização por condensação, amplamente difundido na química de polímeros, a partir do monômero ácido lático P.A., com elevado teor de pureza. Além disso, duas modificações estruturais foram propostas, resultando em três poliésteres com diferentes grupamentos terminais. Considerando a estrutura química obtida, o poli(ácido lático) com grupos terminais carboxila e hidroxila foi denominado de ***α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)**, o poli(ácido lático) possuindo dois grupos terminais carboxila foi chamado de ***α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático**) e o poli(ácido lático) revelando dois grupos terminais hidroxila foi nominado de ***α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático**). As condições de polimerização para a produção desses polímeros estão detalhadas abaixo.

4.2.1 Síntese do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

A elaboração do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) foi conduzida por meio da reação de policondensação do ácido lático em solução a 90 % (VETEC®), fundamentada na literatura corrente (CHEN *et al*., 2006; HYON; JAMSHIDI; IKADA *et al*., 1997), mediante a modificação de algumas condições experimentais.

Para a síntese foram colocados 200 mL de ácido lático (90 % m/V) em balão de duas bocas com capacidade de 500 mL, ao qual foi adaptado um sistema de destilação para a condensação da água vaporizada. O balão foi mantido em banho de óleo, sob agitação magnética constante, empregando uma placa de aquecimento FISATOM® (modelo 752A). Ao sistema de destilação foi aplicada uma pressão reduzida de – 350 ± 10 mmHg, utilizando uma bomba de vácuo PRISMATEC® (modelo 131).

Considerando a necessidade de estudar as condições reacionais mais adequadas para a obtenção do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), foi delineado um planejamento fatorial de experimentos com dois níveis e duas variáveis (2^2).

Nesse estudo preliminar, a temperatura e o tempo reacional foram estabelecidos como variáveis, conforme detalhado na Tabela 2.

TABELA 2 – Planejamento fatorial preliminar, indicando as variáveis, os níveis e as combinações propostas para a obtenção do produto *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

	Níveis	
Variáveis	***nível (–)***	***nível (+)***
1 Temperatura	135 ^{o}C	180 ^{o}C
2 Tempo de reação	4 h	8 h
	Combinações	
Ensaios	**variável 1**	**variável 2**
PAL_a#1	–	–
PAL_a#2	+	–
PAL_a#3	–	+
PAL_a#4	+	+

A resposta processada nessa análise correspondeu à determinação da consistência do material polimérico, conforme descrito por Panzeri *et al*. (1979). De forma complementar, visando avaliar mais criteriosamente a influência das variáveis mencionadas na viscosidade dos materiais resultantes como *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), foi ainda inserido a esse delineamento mais um nível de temperatura (200 ºC) e de tempo reacional (16 h), totalizando nove condições experimentais, simplificadamente designadas de PAL_a#1 até PAL_a#9.

Para verificar o efeito do uso de catalisador na reação de policondensação proposta, foi elaborado um planejamento fatorial adicional 2^2, estipulando como variáveis o uso ou não de catalisador, octanoato de estanho ($SnOct_2$), e o tempo reacional (Tabela 3).

Após a síntese, cada *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) obtido, em um total de 13 polímeros elaborados nas etapas de planejamento experimental, foi dissolvido em acetona P.A. e precipitado, por duas vezes, em água purificada. Posteriormente, foram colocados em estufa (QUIMIS®, modelo Q316M4), mantida em 30 ^{o}C, para secagem.

TABELA 3 – Planejamento fatorial adicional, detalhando as variáveis, os níveis e as combinações propostas para a obtenção do produto *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

	Níveis	
Variáveis	***nível (–)***	***nível (+)***
1 $SnOct_2$	ausência	0,15 mL (0,463 mmol)
2 Tempo de reação	8 h	16 h
	Combinações	
Ensaios	**variável 1**	**variável 2**
PAL_a#10	–	–
PAL_a#11	+	–
PAL_a#12	–	+
PAL_a#13	+	+

4.2.2 Síntese do *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático)

O polímero *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) foi obtido por meio da reação de polimerização em solução, adaptada de Wiggins *et al*. (2006).

Em um balão de duas bocas de 50 mL foram colocados 5 g do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), sintetizado e purificado previamente, anidrido succínico P.A. (ALDRICH®) e 20 mL de dicloroetano P.A. (MERCK®). O meio reacional foi mantido em banho de óleo a 60 ± 2 ^oC, sob agitação constante, acoplado a um sistema de refluxo.

Para o *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), os parâmetros concentração de anidrido succínico, presença/ausência de catalisador e tempo reacional foram estabelecidos como variáveis em um planejamento fatorial 2^3, como sumarizado na Tabela 4. A resposta obtida nesse delineamento foi analisada a partir da determinação do índice de acidez proposta por Lucas, Soares e Monteiro (2001).

Após a síntese, cada material obtido foi lavado com uma solução a 10 % (V/V) de HCl P.A. (MERCK®) por três vezes, para a retirada do excesso de anidrido succínico. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com água purificada, sendo que cada produto foi conduzido a secagem em estufa a 30 ^oC.

TABELA 4 – Planejamento fatorial para a obtenção do *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), apresentando as variáveis, os níveis e as combinações propostas

	Níveis	
Variáveis	***nível (–)***	***nível (+)***
1 Tempo de reação	8 h	16 h
2 Anidrido succínico	0,75 g (7,5 mmol)	1,84 g (18,35 mmol)
3 $SnOct_2$	ausência	0,24 mL (0,74 mmol)

	Combinações		
Ensaios	**variável 1**	**variável 2**	**variável 3**
PAL_b#1	–	–	–
PAL_b#2	+	–	–
PAL_b#3	–	+	–
PAL_b#4	+	+	–
PAL_b#5	–	–	+
PAL_b#6	+	–	+
PAL_b#7	–	+	+
PAL_b#8	+	+	+

4.2.3 Síntese do *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático)

Para a obtenção do *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) foi conduzida uma reação de polimerização por condensação, envolvendo o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e o dietilenoglicol (DEG).

Em um balão de duas bocas de 250 mL, foram colocados 5 g de *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), previamente sintetizado e purificado, e quantidades variáveis de dietilenoglicol. Ao meio reacional foi acoplado um sistema de condensação, sendo que o mesmo foi mantido a 135 ± 5 ^{o}C, sob agitação constante.

As variáveis testadas, por meio de um planejamento fatorial 2^3, foram: concentração de DEG, presença/ausência de catalisador e tempo de reação, conforme a Tabela 5. Nesse delineamento experimental, a resposta foi estabelecida a partir da determinação do índice de hidroxila, método analítico desenvolvido a partir de resultados apresentados por Paula *et al*. (2008).

Cada polímero sintetizado foi dissolvido em acetona P.A. e precipitado em água purificada. Para a remoção do DEG residual, o produto foi ainda lavado com água purificada por quatro vezes e, posteriormente, seco em estufa a 30 ^{o}C.

TABELA 5 – Planejamento fatorial para a obtenção do *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), detalhando as variáveis, os níveis e as combinações propostas

	Níveis	
Variáveis	***nível (–)***	***nível (+)***
1 DEG	18,6 mL (0,196 mmol)	46,5 mL (0,490 mmol)
2 $SnOct_2$	ausência	0,10 mL (0,309 mmol)
3 Tempo de reação	5 h	10 h

	Combinações		
Ensaios	**variável 1**	**variável 2**	**variável 3**
PAL_c#1	–	–	–
PAL_c#2	+	–	–
PAL_c#3	–	+	–
PAL_c#4	+	+	–
PAL_c#5	–	–	+
PAL_c#6	+	–	+
PAL_c#7	–	+	+
PAL_c#8	+	+	+

4.3 SÍNTESE DO CONJUGADO HEPARINA E α-HIDROXI-ω-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)

Inicialmente, 20.000 UI de heparina sódica (CRISTÁLIA®) preparada previamente, foi dissolvida em 2 mL de dimetilsulfóxido P.A. (DMSO, VETEC®).
Para a síntese do conjugado entre a heparina e o polímero *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), foi empregado o método proposto por Neises e Steglish (1978) para a esterificação de ácidos carboxílicos, com modificações, descrito abaixo.

Em um balão de fundo redondo, 7,44 g de *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), previamente sintetizado e purificado, 2 mL da heparina solubilizada em DMSO e quantidades catalíticas de dimetilaminopiridina (DMAP) foram completamente dissolvidos em 50 mL de dimetilformamida (DMF). Por fim, foram acrescentados 0,908 g de diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), sendo que a reação foi mantida em temperatura ambiente, sob atmosfera de N_2, por 12 horas.

Transcorrido o tempo reacional, o produto foi filtrado e adicionado de 0,5 mL de água purificada para a precipitação do DCC residual, na forma de diciclo-hexiluréia. Na seqüência o material foi filtrado novamente. A esse foram

adicionados, lentamente, 10 mL de água purificada, resultando na precipitação do conjugado entre heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático). Esse material foi separado por filtração, seco a temperatura ambiente e mantido em dessecador contendo sílica-gel.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS

4.4.1 Ensaio de consistência

A consistência do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), foi determinada em duplicata pelo método de escoamento entre duas placas de vidro, conforme o preconizado por Panzeri *et al*. (1979). Esse procedimento foi adotado em decorrência da falta de disponibilidade de outro método analítico de baixo custo para a avaliação de parâmetros reológicos, relacionados à massa molar desses polímeros.

A massa de 1,0 g do polímero-teste foi colocada sobre uma placa de vidro. Em seguida, outra placa de vidro com massa aferida de 761,75 g foi cuidadosamente depositada, de forma paralela, sobre a primeira. Após 5 minutos, utilizando uma régua graduada em centímetros, foi realizada a medida do diâmetro do halo formado pela compressão de cada amostra, nas condições padronizadas.

4.4.2 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez foi obtido em triplicata por titulação indireta, a partir das considerações feitas por Lucas, Soares e Monteiro (2001), para todos os produtos sintetizados como *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático). Uma massa conhecida de cada polímero foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL e dissolvida em 5 mL de acetona P.A. Foram acrescentados 30 mL de solução aquosa de NaOH 1 $mol.L^{-1}$ e a mistura foi deixada à temperatura ambiente, sob agitação magnética, por um período de 30 minutos. Na seqüência, foram adicionadas três gotas do indicador (solução etanólica de fenolftaleína, 1 % m/V) e foi procedida a titulação, empregando uma solução

aquosa de HCl 1 mol.L^{-1}, previamente padronizada, como titulante. Considerando o volume gasto na bureta, foi calculado o índice de acidez em mg KOH.g^{-1} do polímero, conforme a Equação 1.

EQUAÇÃO 1

$$\text{Indice de COOH} = \frac{(V_{branco}-V_{teste}) \times 36,5 \times 0,05611}{m}$$

Sendo, V_{branco}, o volume de HCl 1 mol.L^{-1} (mL) consumido na titulação, quando da ausência do polímero; V_{teste}, o volume de HCl 1 mol.L^{-1} (mL) consumido na titulação, quando da presença do polímero e *m*, a massa de polímero utilizada para a determinação do índice de carboxila ou de acidez.

4.4.3 Determinação do índice de hidroxila

O índice de hidroxila foi avaliado em triplicata para todos os produtos sintetizados como *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), a partir de um método colorimétrico especificamente desenvolvido e validado para poliésteres susceptíveis a hidrólise nas condições estabelecidas no método padrão da *American Society for Testing and Materials* (ASTM).

4.4.3.1 Determinação do índice de hidroxila pelo método colorimétrico

A determinação quantitativa de grupos hidroxila de cada material polimérico foi fundamentada na reação de oxidação com dicromato de potássio em meio ácido (reativo de Jones modificado). A intensidade da cor desenvolvida foi analisada por espectrometria na região do visível (λ = 600 nm), em espectrofotômetro Perkin-Elmer – Colemann III Junior®, cedido pelo LAPAC - Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas (PAULA *et al*., 2008).

4.4.3.2 Preparo do reativo de Jones modificado

Uma solução saturada de dicromato de potássio em ácido sulfúrico foi elaborada. Para isso, 25 g de dicromato de potássio P.A. foram adicionados em 25

mL de H_2SO_4 P.A., sob agitação. Posteriormente, foram adicionados cuidadosamente 75 mL de água purificada (OSSELTON; WIDDOP, 2004).

4.4.3.3 Validação analítica

Para a validação analítica do método colorimétrico de determinação do índice de hidroxila, foi elaborada uma curva analítica, a partir de 1,2 g do polímero CAPA 2085 (SOLVAY®), uma poli(ε-caprolactona) com terminação diol tendo o valor de índice de hidroxila conhecido e padronizado de 136,6 mg KOH.g^{-1}. Essa massa foi diluída em 100 mL de acetona, de forma a obter uma solução-mãe contendo a concentração final de 1,639 mg KOH.mL^{-1}. Alíquotas, que variaram de 0,5 mL até 5 mL dessa solução-mãe, foram transferidas para tubos de ensaio Colemann® e o volume foi completado para 5 mL com acetona, resultando em dez concentrações conhecidas no intervalo de 0,164 a 1,164 mg KOH.mL^{-1}.

Os tubos foram colocados em banho de ultra-som, aos quais foram acrescentados 300 µL do reagente de Jones modificado, sendo simultaneamente acionado o cronômetro. Transcorrido exatamente 1 minuto, foram acrescentados 2 mL de solução de HCl 3 mol. L^{-1}. A absorvância foi quantificada após 30 minutos em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm. Todas essas etapas foram desenvolvidas em triplicata, resultando em três diferentes curvas analíticas que foram plotadas em planilha eletrônica (Origin®).

4.4.3.3.1 Linearidade

Com base no coeficiente de correlação (r) calculado para cada uma das três curvas analíticas descritas anteriormente, foi calculado o coeficiente de correlação médio. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados por meio da relação entre o desvio padrão resultante dos valores de interseção com o eixo das ordenadas, considerando as três curvas analíticas elaboradas, e a inclinação da curva analítica média, usando o fator multiplicador sugerido pela norma ICH (1996), conforme demonstrado nas Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3{,}33 \times DP}{B} \qquad \text{EQUAÇÃO 2}$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B} \qquad \text{EQUAÇÃO 3}$$

Sendo, *LD*, o limite de detecção, *LQ*, o limite de quantificação, *DP*, o desvio padrão proveniente das três curvas analíticas, a partir dos valores de interseção com o eixo das ordenadas e *B*, o coeficiente angular da curva analítica média.

4.4.3.3.2 Precisão

A precisão foi estudada por meio dos parâmetros de repetibilidade e de precisão intermediária. Para avaliar a repetibilidade, foram preparadas três concentrações diferentes (0,53274, 0,90156 e 1,27038 mg KOH.mL^{-1}), totalizando nove determinações, sendo o resultado expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia. A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação entre as determinações de uma mesma concentração (0,90156 mg KOH.mL^{-1}) realizadas em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

4.4.3.3.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através do método de recuperação. Para isso, foi adicionada uma quantidade conhecida de CAPA 2085 (0,08196 mg KOH.mL^{-1}) a cada solução amostra, resultando nas concentrações de 0,6147, 0,98352 e 1,35234 KOH.mL^{-1}. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

4.4.3.4 Determinação do índice de hidroxila pelo método padrão conforme a ASTM

Com o propósito de pesquisar a confiabilidade dos valores obtidos pelo método colorimétrico em avaliação, o índice de hidroxila foi também determinado por ftalação sob refluxo, em triplicata, de acordo com o que preconiza a *American Society for Testing and Materials* (ASTM *designation*: 4274-94), para diferentes poliésteres e poliéteres, CAPA 2043, CAPA 2085, DEG, PEG 400, PET descarte, PET virgem e PPG.

Os grupos hidroxila, presentes em cada material polimérico, foram esterificados com solução de anidrido ftálico em piridina. Esse meio reacional foi preparado previamente, misturando 111 g de anidrido ftálico (ALDRICH®) e 700 mL de piridina P.A., seca e purificada (PERRIN; ARMAREGO, 1988).

Cada amostra foi pesada e colocada em um erlenmeyer com boca esmerilhada. Em seguida, 25 mL do reagente anidrido ftálico/piridina foram exatamente medidos e acrescentados ao frasco. O erlenmeyer foi colocado em banho de glicerina, mantido a 115 ± 2 ^{o}C por 2 horas, sob refluxo. Após esse período, o frasco foi removido do aquecimento e deixado em temperatura ambiente para o resfriamento. A seguir, foram acrescentados aproximadamente 50 mL de piridina purificada através do condensador e três gotas do indicador fenolftaleína (solução etanólica, 1 % m/V). Na seqüência, foi realizada a titulação com NaOH 0,5 mol.L^{-1}.

Um branco foi preparado por meio do mesmo procedimento, na ausência de amostra. Considerando o método descrito, o índice de hidroxila foi calculado em mg KOH.mL^{-1}, a partir da Equação 4.

$$\text{Índice de OH} = \frac{(V_{branco} - V_{teste}) \times M \times 56{,}11}{m} \qquad \text{EQUAÇÃO 4}$$

Sendo, V_{branco}, o volume de NaOH 0,5 mol.L^{-1} (mL) consumido na titulação, quando da ausência da amostra; V_{teste}, o volume de NaOH 0,5 mol.L^{-1} (mL) consumido na titulação, na presença da amostra, M, molaridade da solução de NaOH (0,5 mol.L^{-1}); e m, a massa de polímero utilizada para a determinação do índice de hidroxila.

4.4.4 Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier

A análise por infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) foi realizada em espectrofotômetro Excalibur Series FTS 3500GX (BIO-RAD LABORATORIES®), e também no espectrofotômetro Nicolet 4700 (THERMO ELECTRON®), 32 scans.min^{-1}, resolução de 2 cm^{-1}, cedido pela UEPG . Os polímeros de *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e

α,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), elaborados a partir das diferentes condições experimentais descritas, foram solubilizados em acetona, na concentração de 0,25 % (m/V) e analisados na forma de filme sobre uma placa de KBr.

4.4.5 Determinação da massa molar

4.4.5.1 Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel

As análises de cromatografia por permeação em gel (CPG) foram desenvolvidas em sistema Shimadzu LC10AD (SHIMADZU CORPORATION®), provido de um detector de índice de refração. Para a análise foram empregadas duas colunas Tosoh TSH-gel (TOSOH CORPORATION®) em série, com limites de exclusão correspondente a 10^4 e 10^3 u.m.a., respectivamente. Os ensaios foram realizados a 45 ^oC, utilizando o tetra-hidrofurano (THF) como fase móvel, previamente deaerado, a uma vazão de 1,0 $mL.min^{-1}$. A injeção foi feita por um amostrador automático SIL – 10A (SHIMADZU CORPORATION®), sendo que o volume de injeção foi de 20 µL. A massa molar aparente foi calculada considerando os valores de volume de retenção estabelecidos para os padrões monodispersos de poliestireno, dimetilbenzeno e antraceno. A análise foi realizada no Instituto de Química da UFRGS.

4.4.5.2 Determinação da massa molar numérica média – quantificação por grupos terminais

A massa molar numérica média foi calculada a partir dos valores de índice de carboxila e de índice de hidroxila, presentes como grupos funcionais terminais nos materiais poliméricos, conforme preconizado por Lucas, Soares e Monteiro (2001), de acordo com as Equações 5 e 6.

EQUAÇÃO 5

$$\text{mol de polímero.g}^{-1} = \frac{(\text{Índice}_{COOH} + \text{Índice}_{OH})}{2 \times 56{,}11 \times 1000}$$

$$M_n = \frac{1}{\text{mol de polímero.g}^{-1}} \qquad \text{EQUAÇÃO 6}$$

Sendo, $Índice_{COOH}$, o índice de acidez em mg KOH.g^{-1} polímero; $Índice_{OH}$, o índice de hidroxila em mg KOH.g^{-1} polímero; e *Mn*, massa molar numérica média

4.4.6 Avaliação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de (RMN) foram obtidos em espectrômetro de RMN Avance 400 (BRUKER®) operando a 9,4 Tesla, com núcleos de ^{1}H e de ^{13}C em 400,13 e 100,61 MHz, respectivamente. O espectrômetro foi equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm, de observação direta, com gradiente de campo no eixo z. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado.

4.4.7 Análise por difração de raio-X

Os materiais poliméricos sintetizados foram analisadas em difratômetro de raio-X Shimadzu XRD-6000 (SHIMADZU CORPORATION®), varredura de 2º.min^{-1} e 2θ de 5º a 55º, radiação Kα de cobre (λ = 1,5418 Å), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, para a observação dos picos indicativos de cristalinidade. Com o propósito de permitir uma avaliação comparativa do conjugado heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), o mesmo procedimento foi adotado para a heparina previamente acidificada e precipitada em acetona, bem como para a mistura física, em massa, 1:1 [heparina:poli(ácido lático)].

4.5 ENCAPSULAÇÃO DA HEPARINA EM NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO)

4.5.1 Obtenção das nanopartículas contendo heparina por meio do método de emulsão múltipla e evaporação do solvente

As nanopartículas contendo heparina foram elaboradas por emulsão múltipla e evaporação do solvente, conforme os relatos prévios da literatura (FECZKÓ; TÓTH; GYENIS, 2007; JIAO *et al*., 2002; SAHOO *et al*., 2002). O processo foi realizado em duas etapas, sendo que, inicialmente, a fase orgânica (O) foi obtida pela solubilização de 0,25 g de *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) em 40 mL de um solvente orgânico, diclorometano P.A. ou clorofórmio P.A. A esse meio, foi adicionada a fase aquosa interna (A_1), constituída por 0,25 mL de solução aquosa de heparina (5.000 UI.mL^{-1}) e 0,25 mL de polisorbato 20. A mistura foi vigorosamente agitada (22.000 rev.min^{-1}) durante 1 minuto, por meio de um dispersor de alta velocidade (Ultra-turrax®, modelo T18 N, IKA®), resultando na emulsão primária água em óleo (A_1/O).

Na segunda etapa, a emulsão A_1/O foi dispersa na fase aquosa externa (A_2), constituída por 100 mL de uma solução aquosa de poli(álcool vinílico) (PVAl), com diferentes massas molares e em concentrações variáveis (em m/V). Considerando a necessidade de estudar a influência de outros estabilizantes para a formação da emulsão múltipla, poli(vinil pirrolidona) ou polisorbato 80 foi ainda adotado como tensoativos para a fase A_2. A Tabela 6 sumariza os tensoativos estabilizantes empregados para o método de nanoencapsulação, com as respectivas concentrações avaliadas.

TABELA 6 – Tensoativos estabilizantes utilizados no desenvolvimento das nanopartículas de heparina pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente

Formulação	Estabilizante	Massa molar (g.mol^{-1})	Concentração (%)
1	PVAl	123.000	0,1
2	PVAl	123.000	1,0
3	PVAl	123.000	2,5
4	PVAl	70.000 a 80.000	2,5
5	PVAl	13.000 a 26.000	5,0
6	PVAl	13.000 a 26.000	10,0
7	PVAl	13.000 a 26.000	15,0
8	PVP	40.000	1,0
9	Polisorbato 80	1.310	1,0

Para a elaboração da emulsão múltipla (A_1/O/A_2), o sistema foi mantido em agitação a 22.000 rev.min^{-1}, por 3 minutos. Essa emulsão permaneceu em agitação mecânica a baixa rotação (800 rev.min^{-1}) por 4 horas, para a total evaporação do solvente orgânico e formação das nanopartículas. Essas partículas foram recuperadas por centrifugação a 20.000 rev.min^{-1}, durante 15 minutos, sendo que o

sobrenadante foi reservado para a quantificação da heparina. Posteriormente, as nanopartículas foram lavadas com água purificada e centrifugadas, por três vezes, para a retirada do tensoativo estabilizante. Cada material polimérico foi seco em estufa a 37 ^{o}C por 4 horas e mantido em dessecador contendo sílica-gel.

De forma complementar, nanopartículas contendo heparina foram produzidas por emulsão $A_1/O/A_2$ e evaporação do solvente, a partir dos polímeros com diferentes grupos terminais, *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático). Nesse caso, para a definição das condições experimentais mais adequadas, foram considerados os resultados prévios encontrados para a matriz polimérica de *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático).

4.5.2 Elaboração das nanopartículas do conjugado entre heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) pelo método de nanoprecipitação

A nanoprecipitação foi conduzida com 0,50 g do conjugado entre heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), previamente sintetizado e purificado, por meio do método clássico desenvolvido por Fessi *et al*. (1988) e adaptado por Beck *et al*. (2003). Esse material polimérico foi dissolvido em 40 mL de acetona P.A. e precipitado em 80 mL de um meio não-solvente, constituído por água purificada e 0,30 g de polisorbato 80. Posteriormente, a dispersão foi levada ao evaporador rotativo (modelo Q344, QUIMIS®), sob pressão reduzida, a 35 ± 2 ºC, para a remoção total do solvente orgânico e concentração parcial do produto, até um volume final 10 mL. A suspensão coloidal, em concentração de 50 mg.mL^{-1} do conjugado polimérico, foi acondicionada em frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado e conservada na temperatura ambiente, em dessecador contendo sílica-gel.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS NANOPARTICULADOS

4.6.1 Determinação da heparina incorporada nas nanopartículas

A quantificação da heparina nas partículas obtidas por emulsão múltipla e evaporação do solvente foi realizada em triplicata, pelo método colorimétrico proposto pela literatura (JIAO *et al*., 2002, GRANT *et al*., 1984, LAM; SILBERT; ROSENBERG, 1976). A quantificação foi feita de forma indireta, empregando o sobrenadante resultante do processo de encapsulação. O método está fundamentado nas propriedades de metacromasia da molécula de heparina, sendo que a reação de cor ocorreu em presença do corante Azure II (FLUKA®).

Ao volume de 50 *µ*L do sobrenadante, obtido após a centrifugação de cada amostra, foram adicionados 950 *µ*L da solução aquosa do corante Azure II, (0,02 $mg.mL^{-1}$), preparada no momento da análise. A mistura foi homogeneizada e mantida na temperatura ambiente por 5 minutos. Em função da concentração de heparina presente, a coloração azul característica do reativo empregado foi convertida em coloração roxa, pela formação do complexo metacromático. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, cedido pelo LAPAC, marca QUICKLAB® em 536 nm, zerando o equipamento com o branco. A partir da quantidade de heparina obtida no sobrenadante, foi calculada a quantidade de heparina incorporada nas partículas e a eficiência de encapsulação, conforme as Equações 7 e 8.

EQUAÇÃO 7

$$\text{UI de heparina}_{\text{partículas}} = \text{total de heparina}_{\text{formulação}} - \text{UI de heparina}_{\text{sobrenadante}}$$

EQUAÇÃO 8

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{\text{UI de heparina}_{\text{partículas}}}{\text{total de heparina}_{\text{formulação}}} \times 100$$

Previamente, esse método analítico foi avaliado em termos de linearidade, mediante a elaboração de três curvas analíticas. Cada curva analítica foi elaborada com dez pontos, a partir da utilização de um volume de 950 *µ*L da solução do corante Azure II e de um volume definido de 50 *µ*L de diferentes soluções aquosas de heparina, correspondendo às concentrações variáveis entre 0,05 e 0,9 UI.

Considerando as absorvâncias obtidas como resposta para as três curvas analíticas, foi determinado o valor de coeficiente de correlação médio, r = 0,984, com limite de quantificação (LQ = 0,158 UI de heparina) e limite de detecção (LD = 0,053 UI de heparina).

4.6.2 Análises morfológicas e de superfície

4.6.2.1 Microscopia eletrônica de varredura e avaliação de tamanho das partículas

A avaliação morfológica e de superfície das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em equipamento Shimadzu SSX-550 (SHIMADZU CORPORATION®), cedido pela UEPG, de acordo com o preconizado por Souza (1998). As nanopartículas foram fixadas em suporte metálico e submetidas à metalização com ouro no equipamento Shimadzu IC 50 (SHIMADZU CORPORATION®).

O tamanho das partículas foi determinado com o auxílio do software Image Tool® (versão 3.0, UNIVERSIDADE DO TEXAS). Cada amostra foi avaliada por, no mínimo, cinco vezes, sendo o resultado expresso em termos de valor médio (NAMUR *et al*., 2006).

4.6.2.2 Difração de raio-X

As nanopartículas foram analisadas em difratômetro de raio-X Shimadzu XRD-6000 (SHIMADZU CORPORATION®), scan de 2º.min^{-1} e 2θ de 5º a 55º, radiação Kα de cobre (λ = 1,5418 Å), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, condições previamente padronizadas para os polímeros de partida e para o conjugado heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático).

4.7 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS CONTENDO HEPARINA

4.7.1 Animais experimentais

Foram empregados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso médio de 280 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais não receberam alimentação por

um período de 12 horas. A água potável foi fornecida de maneira livre e irrestrita (*ad libitum*).

4.7.2 Administração dos materiais poliméricos contendo heparina

4.7.2.1 Aplicação do complexo heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

Considerando a necessidade de avaliar a existência de atividade biológica do conjugado heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), uma massa correspondente a 0,8 g desse produto foi administrada intraperitonealmente, a cada animal do grupo teste (n = 3). Em um grupo controle (n = 3), foi aplicado o volume de 8 mL de DMSO, solvente empregado como veículo no grupo teste. As coletas de sangue foram realizadas por punção intra-cardíaca, nos animais do grupo teste e grupo controle, de forma paralela, nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas.

4.7.2.2 Aplicação oral das nanopartículas contendo heparina

As nanopartículas contendo heparina, previamente obtidas pelo método da emulsão múltipla e evaporação do solvente e pelo método da nanoprecipitação, foram administradas por gavagem (Figura 7), em quantidade equivalente a 2500 UI de heparina em cada animal do grupo teste (n = 3).

FIGURA 7 – Administração oral das nanopartículas contendo heparina por gavagem

4.7.3 Coleta das amostras de sangue

Após uma discreta sedação com éter etílico P.A., cada animal foi posicionado e o sangue arterial foi coletado por meio de punção intra-cardíaca (Figura 8), nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 24 h depois da administração por gavagem. O sangue coletado dos animais do grupo teste, no tempo zero, foi empregado como controle para a avaliação da atividade anticoagulante. A cada punção, o volume de 1 mL de sangue foi retirado nos intervalos pré-determinados e colocado em tubos Vacuotainer®, contendo o anticoagulante citrato de sódio (0,109 mol.L^{-1}). A mistura foi cuidadosamente homogeneizada e centrifugada entre 2000 e 2500 rev.min^{-1}, por 15 minutos. Logo em seguida procedeu-se a separação do plasma citratado, que foi mantido em temperatura ambiente. O teste foi executado dentro de um período máximo de 2 horas após a coleta.

FIGURA 8 – Punção intra-cardíaca para a obtenção das amostras de sangue para determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado

4.7.4 Avaliação da atividade anticoagulante dos materiais poliméricos contendo heparina

A ação anticoagulante foi avaliada por meio do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTP-a), conforme Laffan e Bradshaw (1985). Para a realização do ensaio foi utilizado o coagulômetro Stago®, cedido pelo LAPAC. A um volume de 50 μL de plasma citratado foram adicionados a cefalina ativada (STA–

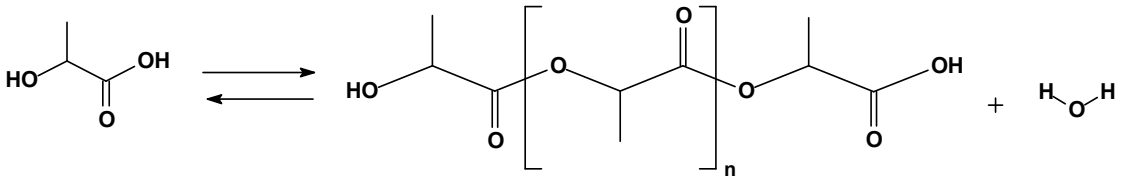
PTTa®) e $CaCl_2$ (0,025 $mol.L^{-1}$). O tempo de tromboplastina parcial ativada foi determinado em segundos, considerando as características específicas do equipamento. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata, sendo que o valor médio foi adotado como resultado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DO POLI(ÁCIDO LÁTICO)

5.1.1 Síntese do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

A partir do ácido lático, foram obtidos os três materiais poliméricos com diferentes grupos terminais funcionais. O polímero *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), inicialmente sintetizado (Figura 9), foi submetido às modificações químicas propostas, permitindo a formação do *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), com dois grupos terminais carboxila, e do *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), com dois grupos terminais hidroxila na sua estrutura química.



ácido lático **α-hidroxi-ω-carboxi-poli(ácido lático)**

FIGURA 9 – Representação esquemática da reação de policondensação do ácido lático para a formação do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), material de partida para a síntese dos demais polímeros em estudo

As melhores condições de reação para a síntese do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) foram investigadas por um sistema de planejamento fatorial de experimentos, no qual as variáveis (temperatura e tempo de reação) foram avaliadas em dois níveis, considerando como resposta os valores obtidos no ensaio de consistência. Os resultados estão representados na Tabela 7.

Para facilitar a visualização, os dados desse estudo estão apresentados na forma de um diagrama geométrico, compondo a Figura 10. Com base nessa ilustração, fica evidente que os polímeros de maior consistência foram obtidos em condições de maior tempo de reação e de maior temperatura, e que essas variáveis possuem efeitos expressivos na obtenção da resposta, avaliada a partir dos

menores valores para o diâmetro médio dos halos. Os efeitos calculados confirmaram essa observação, indicando que, em média, o halo diminuiu 1,7 cm quando o tempo de reação aumentou de 4 para 8 horas. Uma verificação similar pôde ser feita para a temperatura de reação, cujo aumento acarretou, em média, diminuições de 0,85 cm no parâmetro medido.

TABELA 7 – Planejamento fatorial utilizado para estudar o efeito das variáveis experimentais (temperatura e tempo de reação) na consistência do polímero (*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

Variável		**Nível (–)**	**Nível (+)**
Temperatura (°C)		135	180
Tempo de reação (h)		4	8
Ensaio	**Temperatura (°C)**	**Tempo (h)**	**Halo (cm)**
PAL_a#1	135	4	7,0
PAL_a#2	180	4	5,9
PAL_a#3	135	8	6,8
PAL_a#4	180	8	4,4

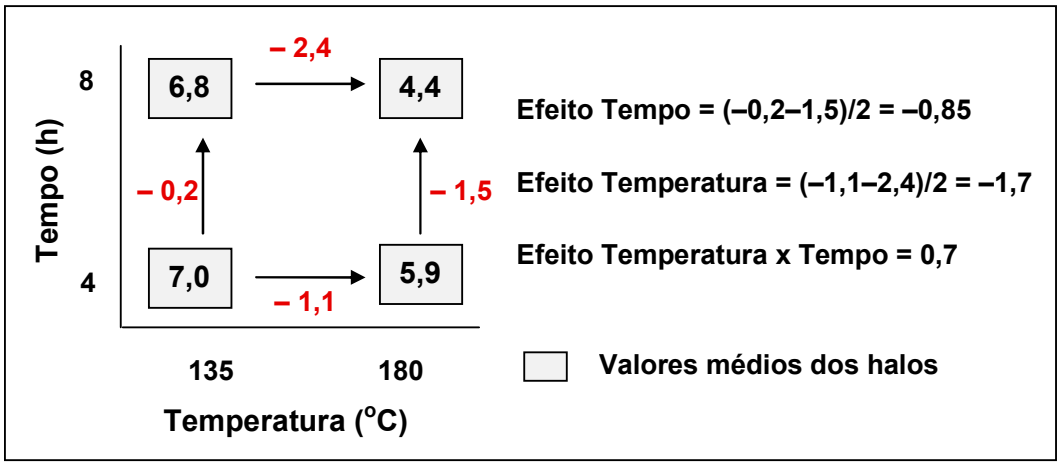


FIGURA 10 – Representação geométrica do planejamento fatorial empregado para verificar o efeito das variáveis experimentais (temperatura e tempo de reação) na consistência do polímero *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

Em função desses resultados, foi traçada a hipótese de que polímeros com consistência mais elevada poderiam ser sintetizados em condições de temperatura e de tempo de reação ainda maiores. Para corroborar com essa proposição, experimentos complementares foram realizados, estendendo-se a temperatura de

trabalho para 200 °C e o tempo de reação a 16 horas. Essa projeção do planejamento experimental, ilustrada na Figura 11, indicou que a consistência do polímero diminuiu quando a síntese foi realizada a 200 °C, comportamento que se mostra coerente com as observações relatas por Hyon, Jamshidi e Ikada (1997). De acordo com os referidos autores, a massa molar e a consistência de polímeros derivados do ácido lático foram reduzidas, quando da síntese em elevadas temperaturas, provavelmente em razão da despolimerização dos produtos.

Por sua vez, os resultados apresentados na Figura 11 indicaram pouca influência do tempo de reação de 16 horas, conduzindo a formação de halos praticamente idênticos aos obtidos com 8 horas de reação. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Hyon, Jamshidi e Ikada (1997), que também indicaram um incremento da consistência dos polímeros em tempos de reação não superiores a 8 horas.

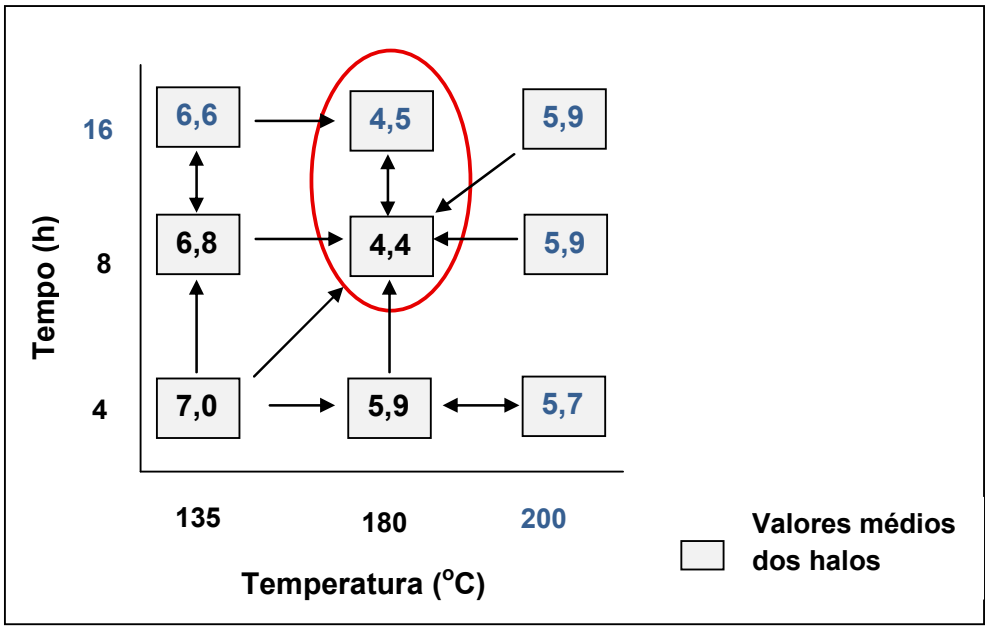


FIGURA 11 – Representação geométrica das projeções do planejamento fatorial aplicado para avaliar o efeito das variáveis experimentais (temperatura e tempo de reação) na consistência do polímero *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

Em função desses resultados, as condições experimentais estabelecidas para o polímero *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, representadas por temperatura de 180 °C e tempo de reação de 8 horas, foram consideradas as mais

favoráveis para a obtenção de materiais derivados do ácido lático de maior massa molar e de consistência mais elevada, sendo adotadas para os estudos subseqüentes.

A Tabela 8 sumariza os resultados do planejamento fatorial empregado para avaliar o efeito do tempo de reação e do uso do catalisador $SnOct_2$ na síntese dos polímeros derivados do ácido lático em estudo.

TABELA 8 – Planejamento fatorial usado para analisar o efeito das variáveis experimentais (presença de catalisador e tempo de reação) na consistência do polímero *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

Variável		**Nível (–)**	**Nível (+)**
$SnOct_2$ (mL)		Ausência	0,15
Tempo de reação (h)		8	16
Ensaio	**$SnOct_2$ (mL)**	**Tempo (h)**	**Halo (cm)**
PAL_a#10	–	8	4,2
PAL_a#11	0,15	8	4,1
PAL_a#12	–	16	4,3
PAL_a#13	0,15	16	4,2

* Legenda: – ausência

Os valores obtidos para o diâmetro médio dos halos, apresentados na forma de uma representação geométrica na Figura 12, indicaram que, nas condições experimentais estudadas, o efeito do catalisador é pouco significativo. Em média, o uso de catalisador permite uma diminuição de 0,1 cm no halo utilizado como resposta analítica, valor esse bastante próximo ao do desvio padrão característico dessa análise (aproximadamente 0,1 cm).

Esses resultados se contrapõem aos antecedentes da literatura (HYON; JAMSHIDI; IKADA, 1997), nos quais os autores sugerem que o uso de catalisadores, em especial o $SnOct_2$, apresenta efeitos positivos sobre a massa molar de materiais poliméricos, sendo usado com freqüência na síntese de polímeros do ácido láctico. Nesse caso, é aceito que o seu mecanismo envolve uma etapa de pré-iniciação, em que o $SnOct_2$ forma complexos com traços de água ou de álcool presentes, gerando um alcóxido que dá seqüência à reação de polimerização (CHEN *et al*., 2006; DRUMOND; WANG, 2004; YAO *et al*., 2004; SODERGARD; STOLT, 2002; JONG *et al*., 2001; LEE *et al*., 2001; HYON; JAMSHIDI; IKADA, 1997). Entretanto, no presente estudo, não foi possível comprovar efetivamente esse

efeito, permanecendo o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 como material polimérico selecionado para as etapas posteriores.

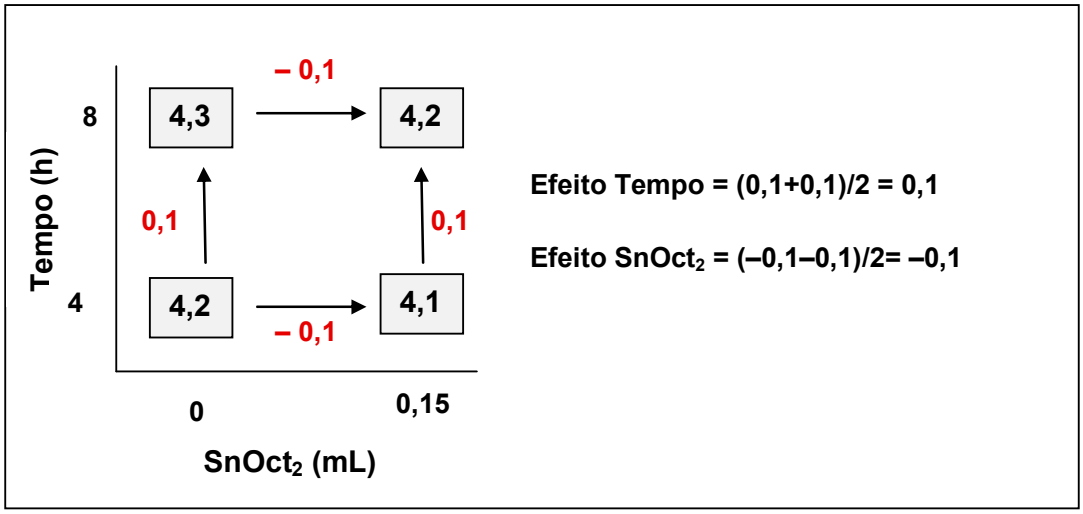
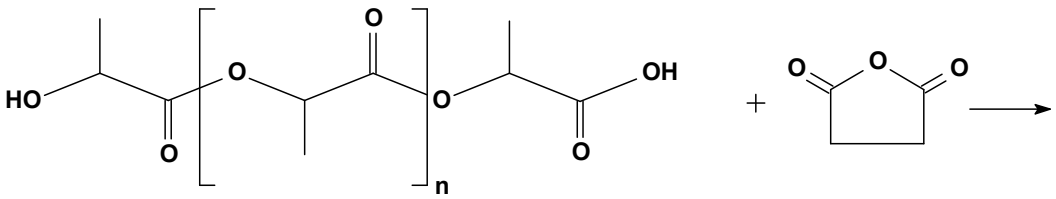


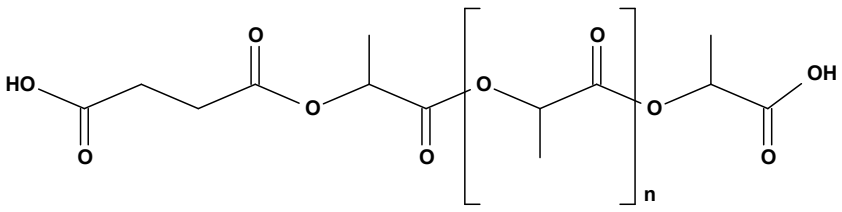
FIGURA 12 – Representação geométrica do planejamento fatorial utilizado para verificar o efeito das variáveis experimentais (catalisador e tempo de reação) na consistência do polímero [*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)]

5.1.2 Síntese do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático)



α-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4

Anidrido succínico



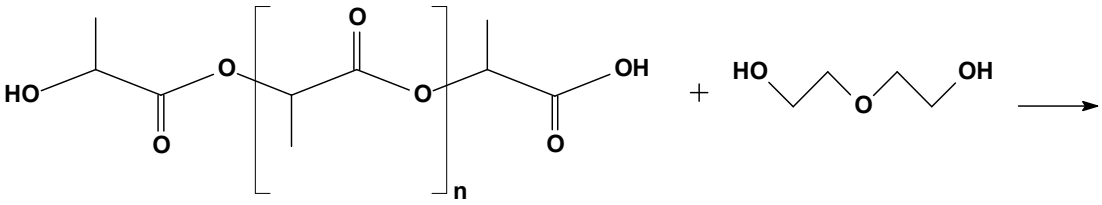
α,ω-di-carboxi-poli(ácido lático)

FIGURA 13 – Representação esquemática da síntese do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), resultante da reação entre o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e o anidrido succínico

Os oito polímeros com dois grupos terminais carboxila, denominados de forma geral como *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), obtidos a partir da reação entre o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 e o anidrido succínico, como representado na Figura 13, resultaram em materiais de coloração branca e aspecto pastoso.

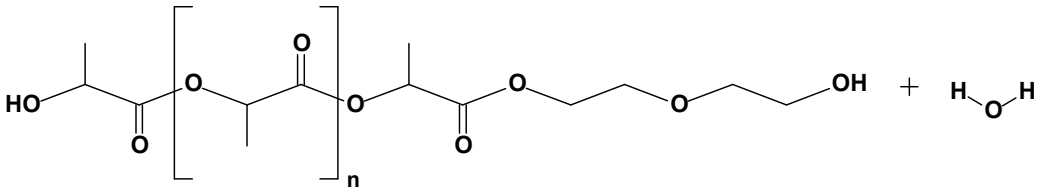
5.1.3 Síntese do *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático)

Os oito materiais derivados da reação de polimerização entre o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, previamente obtido, e o dietilenoglicol (Figura 14) resultaram em polímeros designados genericamente como *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), de aspecto sólido e opalescente, com coloração levemente esbranquiçada. Nesse caso, a seleção do produto para a encapsulação da heparina foi pautada pela determinação do índice de hidroxila (PAULA *et al*., 2008), conforme a discussão que será traçada posteriormente.



α-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4

Dietilenoglicol



α,ω-di-hidroxi-poli(ácido lático)

FIGURA 14 – Representação esquemática da síntese do *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), resultante da reação entre o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e o dietilienoglicol

5.2 SÍNTESE DO CONJUGADO HEPARINA E *α*-HIDROXI-*ω*-CARBOXI-POLI(ÁCIDO LÁTICO)

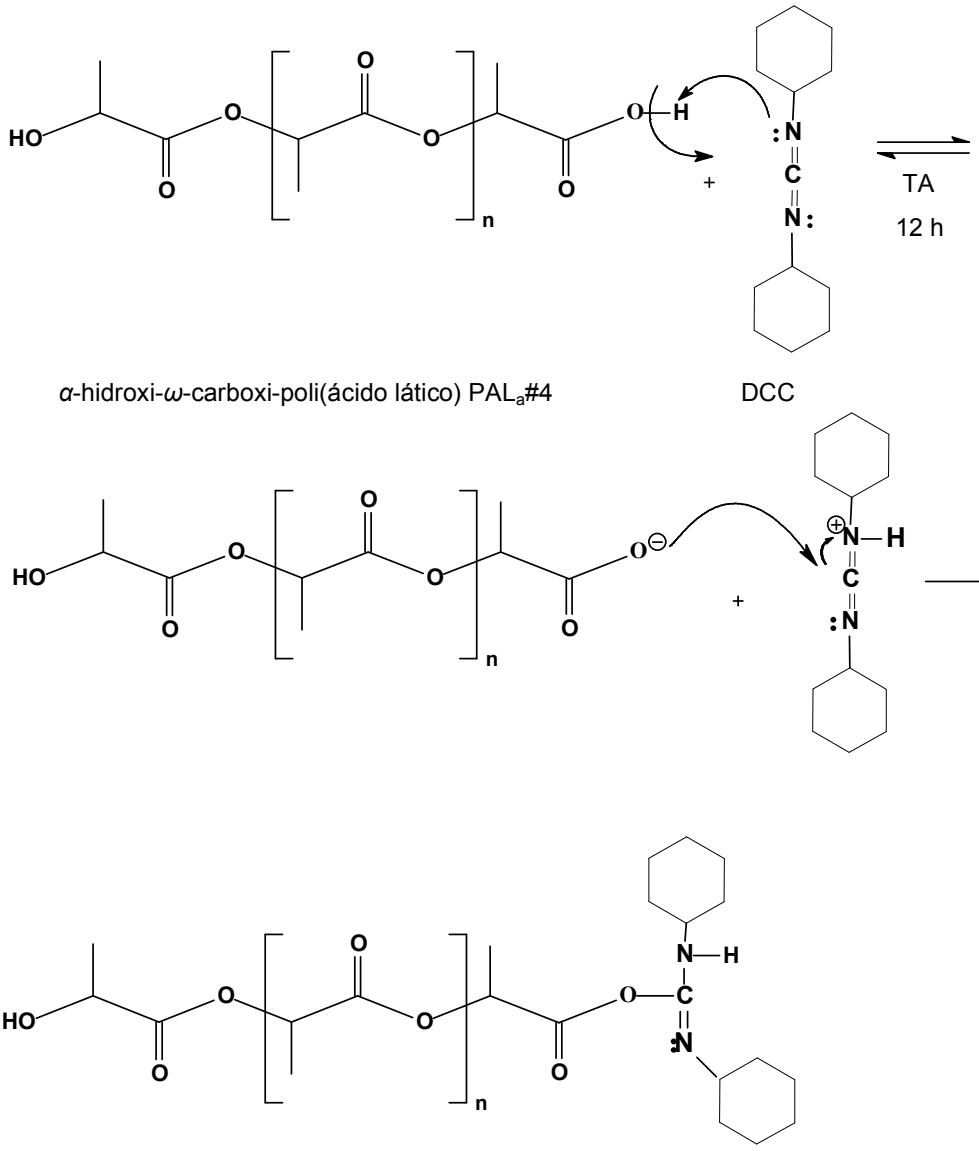
Por meio da reação entre a heparina e o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, na presença de diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e de dimetilaminopiridina (DMAP), foi sintetizado o conjugado heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático). Esse material revelou coloração branca e aspecto pastoso.

Com o propósito de aumentar a eletroficilidade dos grupos carboxilato presentes no *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) foi utilizado o DCC. Essa reação resultou em um produto que foi denominado intermediário Ia, representado na Figura 15 para a reação com o poli(ácido lático), e, intermediário Ib, Figura 16, para a reação com a molécula de heparina. O oxigênio carregado negativamente de um desses grupamentos carboxilato atuou como um nucleófilo, atacando o carbono central do DCC, o qual permaneceu temporariamente ligado a esse grupo orgânico.

Essas condições favoreceram o ataque nucleofílico nessa carbonila por um grupo amina ou hidroxila da heparina, no caso da molécula formada com o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), ou por um grupo hidroxila do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), para a molécula contendo a heparina.

Para esse mecanismo proposto, a reação de grupos carboxílicos, DCC e aminas leva à formação de amidas sem dificuldade, uma vez que as aminas são mais nucleofílicas. Entretanto, para a eficiente formação de ésteres a participação do DMAP é fundamental. Nessa reação, o DMAP, um nucleofílico forte reage com a *o*-acil uréia formando um intermediário, aqui denominado de intermediário II, que reage rapidamente com o álcool para a formação do éster (NEISES; STEGLICH, 1978; SHEEHAN; HESS, 1955).

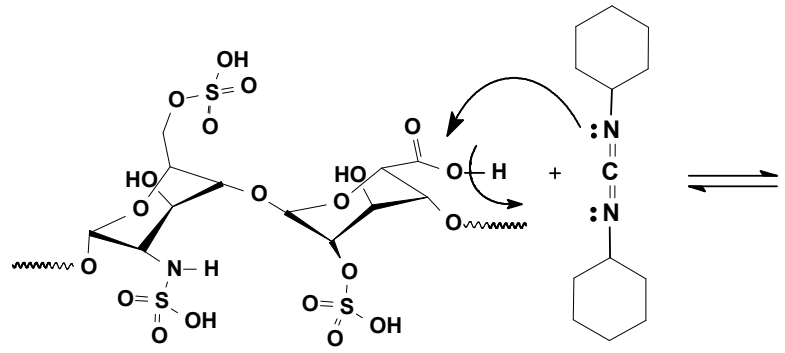
A formação do conjugado entre o poli(ácido lático) e a heparina através desse mecanismo está representado abaixo:



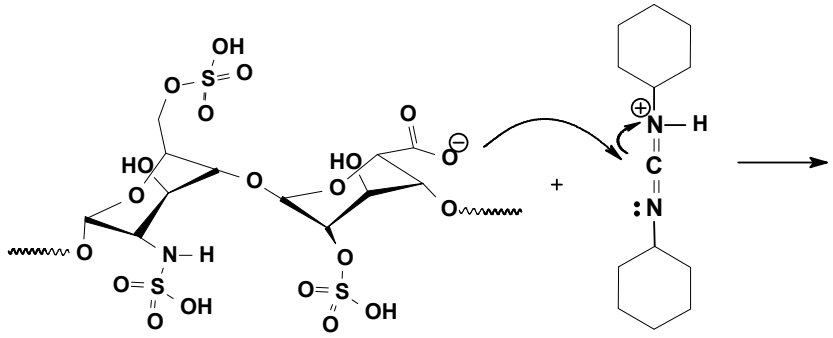
α-hidroxi-ω-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 DCC

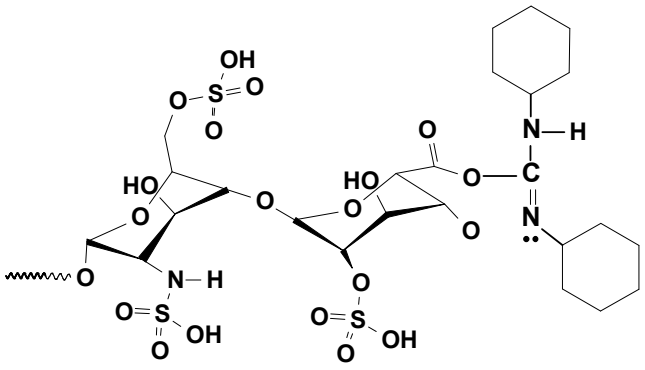
Intermediário Ia

FIGURA 15 – Representação esquemática proposta para a síntese do conjugado heparina-α-hidroxi-ω-carboxi-poli(ácido lático) - formação do intermediáro Ia entre a molécula de poli(ácido lático e de DCC.



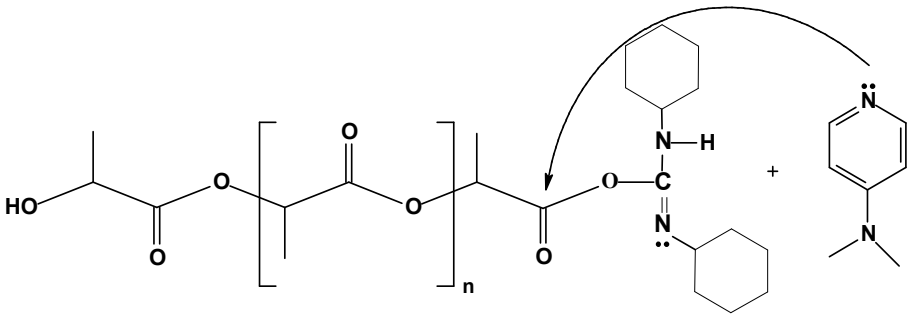
Heparina DCC



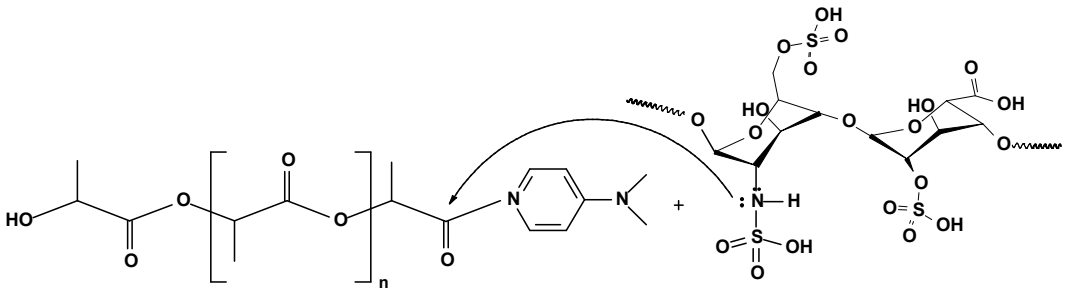


Intermediário Ib

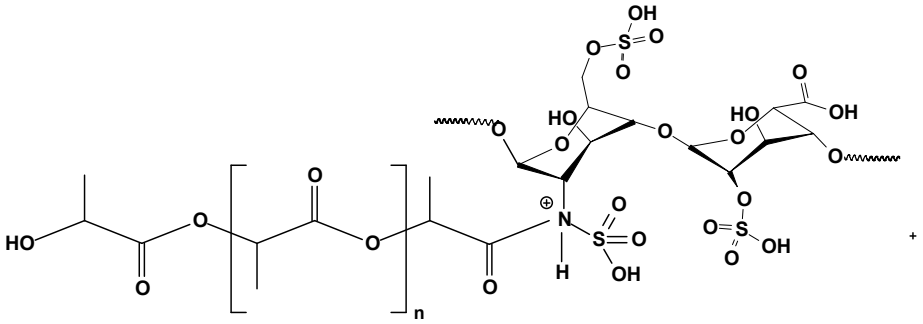
FIGURA 16 – Representação esquemática proposta para a síntese do conjugado heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) - formação do intermediáro Ib entre a molécula de Heparina e de DCC.



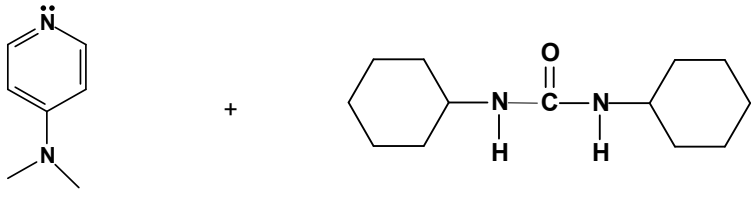
Intermediário Ia DMAP



Intermediário IIa Heparina

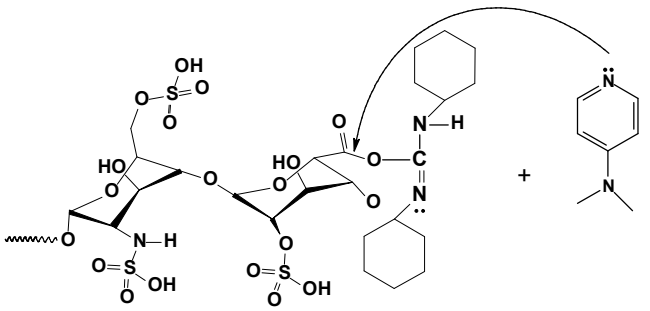


Conjugado poli(ácido lático) Heparina

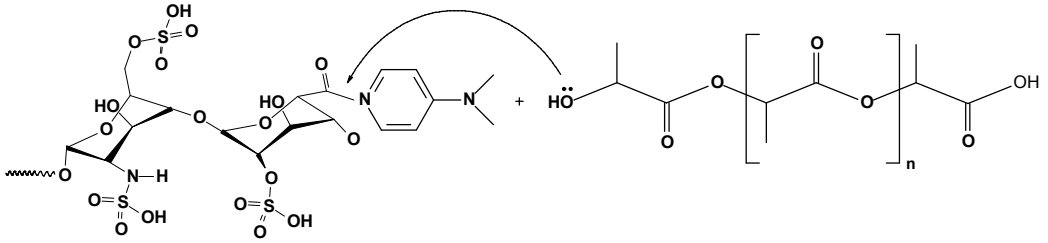


DMAP DCU

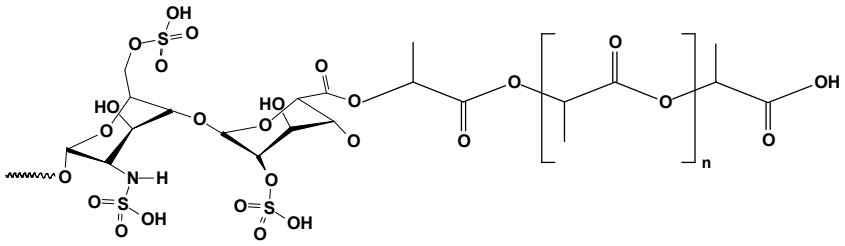
FIGURA 17 – Obtenção do conjugado poli(ácido lático)/heparina através da reação do intermediário II e a amina com a formação de uma amida.



Intermediário Ib DMAP

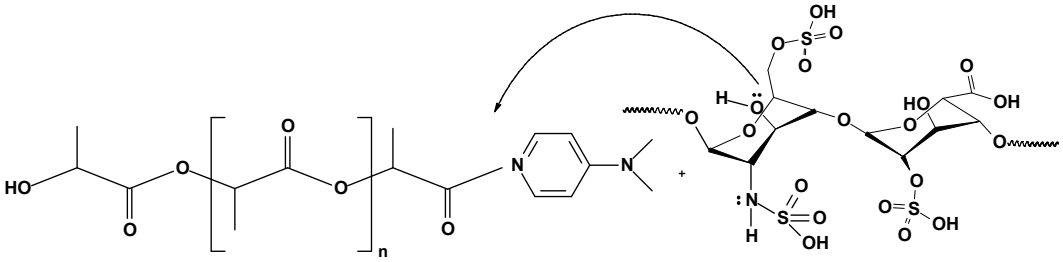


Intermediário IIb *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4

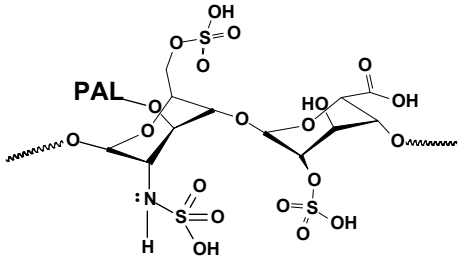


Conjugado poli(ácido lático) Heparina

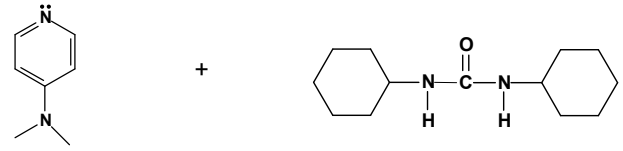
FIGURA 18 - Formação do complexo poli(ácido lático) / heparina a partir da reação de esterificação do grupo carboxílico da heparina e o grupamento OH do poli(ácido lático), em presença do sistema DCC/DMAP.



Intermediário IIa Heparina



Conjugado poli(ácido lático) Heparina



DMAP DCU

FIGURA 19 - Formação do complexo poli(ácido lático) a partir da reação entre o grupamento OH da heparina e carboxila do poli(ácido lático)

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

5.3.1 Determinação do índice de acidez

O número de carboxila para todos os materiais poliméricos sintetizados foi determinado em triplicata por titulação indireta, sendo que os resultados obtidos para os produtos genericamente denominados por *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 9 e 11. O índice de acidez do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, empregado como polímero de partida para essas modificações químicas apresentou um valor de 30,7 mg de OH g^{-1} do polímero.

Na Tabela 9, é possível observar que a reação entre o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) de partida e o anidrido succínico conduziu ao aumento do número de carboxila para todas as condições reacionais avaliadas. Em média, foi verificada uma elevação de 13,1 % no índice de acidez desses polímeros. Mesmo não sendo um aumento expressivo, ainda assim pode ser um indicativo de que ocorreu a ligação entre os grupos hidroxila do material polimérico e os grupos carboxila do anidrido succínico.

A Tabela 10 resume os resultados do planejamento fatorial 2^3 delineado para os polímeros *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), considerando como resposta o índice de carboxila, a partir das variáveis estabelecidas.

TABELA 9 – Índice de carboxila do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e o seu percentual de aumento em função do número de carboxila do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) de partida

Material	**Índice de carboxila (mg KOH g^{-1})**	**Aumento do número de carboxila em relação ao polímero de partida (%)***
PAL_b#1	35,5	15,6
PAL_b#2	33,7	9,7
PAL_b#3	34,3	11,6
PAL_b#4	35,2	14,7
PAL_b#5	35,0	14,0
PAL_b#6	34,1	11,1
PAL_b#7	34,9	13,5
PAL_b#8	35,1	14,4

***** os cálculos referentes ao percentual de aumento do número de hidroxila foram feitos com base no polímero de partida PAL_a#4, com índice de carboxila igual a 30,7 mg KOH g^{-1}

TABELA 10 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3, a partir das respostas de índice de carboxila dos produtos denominados como *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático)

Média (mg de KOH g^{-1})	**34,72 ± 0,07**
Efeitos principais	
variável **1** (tempo de reação)	– 0,40 ± 0,14
variável **2** (anidrido succínico)	0,30 ± 0,14
variável **3** ($SnOct_2$)	0,10 ± 0,14
Efeitos secundários de interação	
12	0,95 ± 0,14
13	– 0,05 ± 0,14
23	– 0,15 ± 0,14
Efeito trifatorial	
123	0,40 ± 0,14

Foi possível definir que o efeito principal da variável **1** (tempo reacional), o efeito de interação **12** e o efeito trifatorial representam condições estatisticamente significativas, uma vez que o valor absoluto para cada um desses efeitos foi superior a 0,32 mg de KOH g^{-1}, produto calculado entre o valor do ponto da distribuição de Student com oito graus de liberdade (2,306), ao intervalo de 95 % de confiança, e o erro padrão para cada resposta (0,14 mg de KOH g^{-1}). Nesse nível de confiança, os efeitos principais para as variáveis **2** e **3**, anidrido succínico e catalisador $SnOct_2$, respectivamente, e os efeitos de interação **13** e **23** não foram avaliados como significativos.

Dessa forma, o tempo reacional, isoladamente, acarretou um efeito negativo na resposta, o que permite estabelecer que a mudança do nível negativo (8 horas) para o nível positivo (16 horas), conduziu à diminuição do índice de carboxila dos materiais em estudo. Considerando o efeito de interação **12**, o resultado analítico pode ser ainda otimizado, com a obtenção de um maior de índice de carboxila no tempo de 16 horas, desde que se trabalhe com a condição de maior massa de anidrido succínico (1,84 g ou 18,35 mmol). Com base na literatura (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003), o efeito menos importante nesta hierarquia é a interação **123** que, embora significativo para o planejamento fatorial em discussão, não foi considerado, portanto, como passível de argumentação.

Nesse contexto, o *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) PAL_b#1, sintetizado no tempo de reação de 8 horas, com uma massa de anidrido succínico de 0,75 g (7,5 mmol) e na ausência de $SnOct_2$, que revelou o maior valor de índice de acidez, foi o produto selecionado como material polimérico de terminações carboxila para a encapsulação posterior da heparina.

Por outro lado, na Tabela 11, é possível verificar uma diminuição no número de carboxila para os produtos designados como *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), após as reações do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 com o dietilenoglicol, nas condições experimentais previamente estabelecidas. Esses resultados podem ser considerados como um importante indicativo da reação entre os grupos carboxila terminais do polímero de partida e os grupamentos hidroxila do diol. Em média, foi verificada uma redução do número de carboxila de 52 % para esses materiais sintetizados.

TABELA 11 – Índice de carboxila do *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) e o seu percentual de redução em função do número de carboxila do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) de partida

Material	**Índice de carboxila (mg KOH g^{-1})**	**Diminuição do número de carboxila em relação ao polímero de partida (%)***
PAL_c#1	14,1	54,1
PAL_c#2	15,1	50,9
PAL_c#3	10,6	65,5
PAL_c#4	14,1	54,0
PAL_c#5	15,6	49,1
PAL_c#6	15,9	48,3
PAL_c#7	19,4	36,8
PAL_c#8	13,2	57,1

***** os cálculos referentes ao percentual de redução do número de hidroxila tiveram como base o polímero de partida PAL_a#4, com índice de carboxila igual a 30,7 mg KOH g^{-1}

A partir das respostas de índice de carboxila para o planejamento fatorial 2^3 elaborado para os polímeros com a estrutura *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), representadas na Tabela 12, foi possível indicar como estatisticamente significativos o efeito principal da variável tempo reacional, o efeito de interação **13** e o efeito trifatorial, em função do valor absoluto para cada um desses efeitos ter sido superior a 1,47 mg de KOH g^{-1}, produto calculado a partir do valor do ponto da distribuição de Student com oito graus de liberdade (2,306), ao intervalo de 95 % de confiança, e o erro padrão para cada resposta (0,64 mg de KOH g^{-1}). Nesse nível de confiança, os efeitos principais para as variáveis **1** e **2**, respectivamente DEG e catalisador $SnOct_2$, e os efeitos de interação **12** e **23** não foram estabelecidos como significativos.

Portanto, o tempo reacional, de forma isolada, ocasionou um efeito positivo na resposta, o que permitiu estabelecer que a mudança do nível inferior (5 horas) para o nível superior (10 horas), levou ao aumento do índice de carboxila dos

produtos em avaliação, circunstância não desejada para esses polímeros *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático).

TABELA 12 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3, a partir das respostas de índice de carboxila dos produtos designados como *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático)

Média (mg de KOH g^{-1})	**14,75 ± 0,32**
Efeitos principais	
variável **1** (DEG)	– 0,35 ± 0,64
variável **2** ($SnOct_2$)	– 0,85 ± 0,64
variável **3** (tempo de reação)	2,55 ± 0,64
Efeitos secundários de interação	
12	– 1,00 ± 0,64
13	– 2,60 ± 0,64
23	1,40 ± 0,64
Efeito trifatorial	
123	– 2,25 ± 0,64

Por outro lado, o índice de acidez do complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) foi de 7,82 mg KOH g^{-1} do produto. Esse valor, muito inferior ao do polímero de partida (30,7 mg KOH g^{-1}), denota o envolvimento dos grupamentos carboxila do PAL_a#4 na obtenção do material resultante, com a possível formação dos grupamentos amida e/ou éster com a heparina.

5.3.2 Determinação do índice de hidroxila

A determinação do índice de hidroxila é uma etapa fundamental para a caracterização de polímeros hidroxilados, para o monitoramento de reações de policondensação entre ácidos dicarboxílicos e dióis e para o controle da qualidade de processos de polimerização (SADEGHI; BARIKANI, 2003; KEMPER *et al*. 2001; HEIKKA *et al*., 1997). O procedimento recomendado para essa determinação consiste na esterificação de grupos hidroxila com uma solução de piridina e de anidrido ftálico ou anidrido acético, com posterior titulação do excesso desse reagente com uma solução de hidróxido de sódio (ASTM *designation*: 4274-94).

Esse método é amplamente utilizado para a determinação do índice de hidroxila em poliésteres e polióis. Entretanto, é um método que demanda um período de tempo extenso, quantidades razoáveis de amostra e expõe o operador a reagentes de alta toxicidade, em especial, a piridina.

No presente trabalho, a determinação do índice de hidroxila por meio do procedimento padrão preconizado pela ASTM se mostrou inviável para os polímeros sintetizados, devido à instabilidade apresentada por esses materiais frente à piridina. Provavelmente, nesse meio, ocorre a hidrólise por clivagem das ligações éster presentes na cadeia polimérica, conduzindo à liberação de ácido lático.

Considerando que esse método ASTM pressupõe a titulação do excesso de reagente com uma solução de hidróxido de sódio, a liberação de ácido lático proveniente da hidrólise do polímero ocasiona um erro na determinação do índice de hidroxila, impossibilitando a utilização desse procedimento para os materiais em estudo.

Dessa forma, esses fatores estabeleceram a necessidade do desenvolvimento e da validação analítica de um método alternativo para a determinação do índice de hidroxila, especialmente para os polímeros sintetizados, mas que também pudesse ser efetivo para outros poliésteres e poliéteres com terminação hidroxila.

O desenvolvimento desse método foi fundamentado na reação de oxidação do reativo de Jones, na qual o ácido crômico promove a oxidação de álcoois primários e secundários a ácidos carboxílicos e cetonas, respectivamente. Álcoois terciários não reagem (Figura 16). A oxidação é acompanhada pela formação da cor verde-azulada, característica do sulfato crômico em solução, a qual pode ser medida por espectrometria na região do visível, em 600 nm.

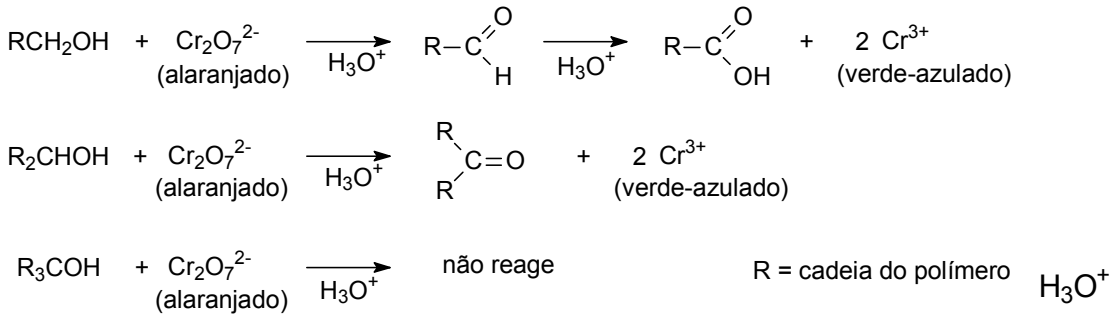


FIGURA 20 – Representação esquemática da reação de oxidação do dicromato de potássio em meio ácido

5.3.2.1 Validação analítica do método colorimétrico para a determinação do índice de hidroxila

O estudo da linearidade (Figura 17) foi conduzido com uma poli(ε-caprolactona) com terminação diol, comercialmente conhecida como CAPA 2085, resultando na equação de regressão y = 0,5526x + 0,0284. O coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido foi de 0,9988, valor esse que se encontra em conformidade com o recomendado pela ANVISA (2003) e por Currie e Svehla (1994). Esses dados demonstraram que há uma correlação direta entre a concentração do polímero utilizado como padrão e as absorbâncias determinadas experimentalmente.

Com os dados provenientes da avaliação de linearidade, foram calculados os limites de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Os valores obtidos foram de 0,0278 e 0,0925 mg KOH mL^{-1} para LD e LQ, respectivamente.

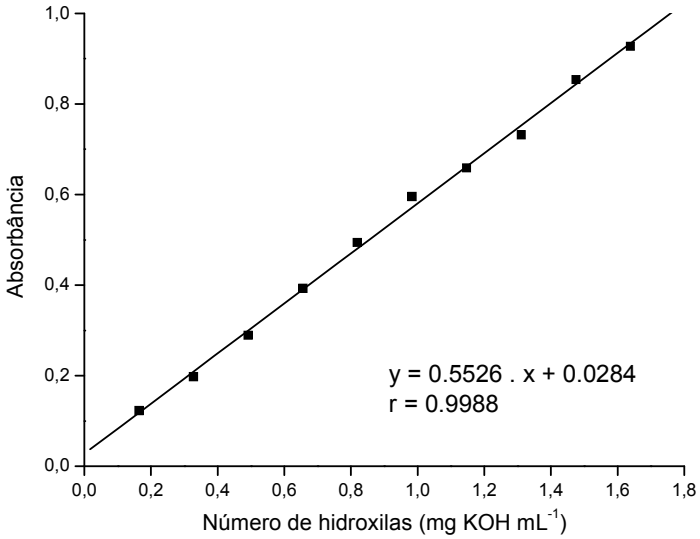


FIGURA 21 – Curva analítica média para a determinação do índice de hidroxila em poliésteres e poliéteres (polímero utilizado como padrão: CAPA 2085)

A precisão foi analisada a partir da repetibilidade ou precisão intra-dia e da precisão intermediária ou precisão inter-dias. Para a repetibilidade, as determinações foram realizadas nas mesmas condições de operação (analista,

equipamento e condições ambientais), dentro do mesmo dia, em um período de tempo curto (BRITO *et al*., 2003). Para a precisão intermediária ou precisão inter-dias, que expressa as variações analíticas no mesmo laboratório, as determinações foram realizadas em dias sucessivos e alternados, conforme o indicado por Brito *et al*. (2003).

A Tabela 13 resume os valores obtidos para a repetibilidade e para a precisão intermediária. Considerando ambos os parâmetros, o desvio padrão relativo obtido foi inferior a 5,0 %, demonstrando uma precisão adequada ao procedimento analítico em estudo. No que diz respeito à avaliação da exatidão, o método permitiu a recuperação de 98,7 ± 1,4, 100,1 ± 0,8 e 101,7 ± 1,8 %, respectivamente para as concentrações de 0,6147, 0,98352 e 1,35234 mg KOH mL^{-1}, o que caracteriza o método como exato, segundo os preceitos do ICH (1996) e da ANVISA (2003).

TABELA 13 – Repetibilidade e precisão intermediária obtidas no estudo de validação do método colorimétrico para a determinação do índice de hidroxila em poliésteres e poliéteres (polímero utilizado como padrão: CAPA 2085)

Concentração (mg KOH mL^{-1})	**DPR dia 1 (%)**	**DPR dia 2 (%)**	**DPR dia 3 (%)**	**Média (%)**
0,53274	1,42			
0,90156	0,56	1,02	0,86	0,81
1,27038	3,51			
Média (%)	1,83			

* Legenda: DPR: desvio padrão relativo

Para efeito de comparação, os polímeros CAPA 2043, CAPA 2085, DEG, PEG 400, PET descarte, PET virgem e PPG foram testados pelo método colorimétrico em proposição e pelo procedimento padrão recomendado pela ASTM.

Os resultados estão listados na Tabela 14, incluindo o desvio padrão (DP) para cada material polimérico, obtido a partir dos valores de índice de hidroxila verificados em ambos os métodos analíticos. A comparação desses resultados por meio do teste *t* de Student mostrou que não há diferença significativa (p = 0,9593) entre os grupos, confirmando que o método proposto apresenta resultados compatíveis ao de referência.

TABELA 14 – Valores médios obtidos para o índice de hidroxila de poliésteres e poliéteres comerciais, obtidos pelo método colorimétrico em estudo e pelo método de referência

Polímero	Método colorimétrico mg KOH g^{-1}	Método de referência mg KOH g^{-1}	DP mg KOH g^{-1}
CAPA 2043	285,1	282,3	1,3
CAPA 2085	150,0	140,8	1,4
DEG	391,2	368,8	1,8
PEG 400	142,6	153,2	4,4
PET descarte	107,8	104,3	3,4
PET virgem	114,2	111,6	4,4
PPG	54,0	47,3	4,6

* Legenda: método de referência: ASTM 4274-94; DP: desvio padrão

Vários autores, como Blanco *et al*. (2004) e Marengo *et al*. (2004), têm preconizado métodos alternativos para a determinação do número de hidroxilas em polímeros, empregando a espectroscopia no infravermelho próximo. Embora esse método apresente diversas vantagens, também possui algumas limitações, em especial no que se refere à viabilidade para a maioria dos laboratórios, em função do custo e da disponibilidade do equipamento. Por outro lado, o método colorimétrico recomendado utiliza o espectrofotômetro na região do visível, tornando o procedimento mais acessível aos laboratórios de pesquisa e à indústria, que requerem a realização constante dessa determinação. Além disso, outras vantagens podem ser apontadas, como a diminuição do tempo de reação, a facilidade de execução do procedimento, a quantidade de amostra necessária para a execução do teste e o pequeno volume de reagente, reduzindo assim o volume de descartes em relação ao método padrão e, principalmente, sendo uma alternativa ao uso da piridina, que é reconhecidamente um reagente de alta toxicidade.

5.3.2.2 Índice de hidroxila determinado pelo método colorimétrico para os materiais com estrutura química baseada no poli(ácido lático)

Utilizando o método colorimétrico previamente validado, foi possível determinar o índice de hidroxila dos polímeros sintetizados a partir da reação de policondensação do ácido lático e dos resultantes de modificações químicas do poli(ácido lático).

O *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, que foi utilizado como polímero de partida para os demais materiais, apresentou um índice de hidroxila de 9,6 mg de KOH g^{-1}.

Os valores referentes ao índice de hidroxila do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), bem como o percentual de variação desse valor em relação ao polímero de partida, estão representados na Tabela 15. Foram observados dados contraditórios, com algumas situações que conduziram ao aumento do índice de hidroxila e com outras condições que acarretaram a redução dessa resposta.

TABELA 15 – Índice de hidroxila do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e o seu percentual de variação (aumento ou redução) em função do número de hidroxila do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) de partida

Material	Índice de hidroxila (mg de KOH g^{-1})	Variação do número de hidroxila em relação ao polímero de partida (%)*
PAL_b#1	11,0	+ 14,6
PAL_b#2	10,0	+ 4,2
PAL_b#3	8,2	– 14,6
PAL_b#4	9,7	+ 1,0
PAL_b#5	10,5	+ 9,4
PAL_b#6	10,2	+ 6,2
PAL_b#7	12,6	+ 31,2
PAL_b#8	9,3	– 3,1

* os cálculos referentes ao percentual de variação do número de hidroxila tiveram como base o polímero de partida PAL_a#4, com índice de hidroxila igual a 9,6 mg KOH g^{-1}

Considerando ainda esses dados, provenientes do planejamento fatorial 2^3 proposto, foi possível estabelecer o efeito principal para cada variável analisada (anidrido succínico, $SnOct_2$ e tempo de reação) e os efeitos de interação resultantes, como sumarizado na Tabela 16.

TABELA 16 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3, a partir das respostas de índice de hidroxila dos produtos designados como *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático)

Média (mg de KOH g^{-1})	**10,19 ± 0,26**
Efeitos principais	
variável **1** (anidrido succínico)	– 0,78 ± 0,51
variável **2** ($SnOct_2$)	– 0,48 ± 0,51
variável **3** (tempo)	0,92 ± 0,51
Efeitos secundários de interação	
12	– 0,12 ± 0,51
13	– 1,02 ± 0,51
23	1,08 ± 0,51
Efeito trifatorial	
123	– 1,38 ± 0,51

Foi possível verificar que apenas o efeito trifatorial foi considerado significativo, uma vez que o seu valor absoluto (1,38 mg de KOH g^{-1}) foi superior a 1,18 mg de KOH g^{-1}, produto calculado entre o valor do ponto da distribuição de

Student com oito graus de liberdade (2,306), ao intervalo de 95 % de confiança, e o erro padrão para cada resposta (0,51 mg de KOH g^{-1}). Nesse nível de confiança, os efeitos principais para cada variável isolada e os efeitos de interação entre dois fatores não foram avaliados como significativos.

A Tabela 17 fornece os resultados do número de hidroxila para os polímeros denominados genericamente como *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) e o percentual de aumento do índice de hidroxila em relação ao polímero de partida, *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4. Para esses polímeros, foi possível observar que houve uma expressiva variação entre as respostas de índice de hidroxila, em função das variáveis estabelecidas no planejamento fatorial 2^3.

TABELA 17 – Índice de hidroxila do *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) e o seu percentual de aumento em função do número de hidroxila do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) de partida

Material	Índice de hidroxila (mg de KOH g^{-1})	Aumento do número de hidroxila em relação ao polímero de partida (%)
PAL_c#1	16,6	72,8
PAL_c#2	55,6	478,6
PAL_c#3	19,6	103,7
PAL_c#4	78,3	715,4
PAL_c#5	18,8	95,8
PAL_c#6	18,1	88,8
PAL_c#7	11,0	14,5
PAL_c#8	44,4	320,9

* os cálculos referentes ao percentual de variação do número de hidroxila foram baseados no polímero de partida PAL_a#4, com índice de hidroxila igual a 9,6 mg KOH g^{-1}

A Tabela 18 resume os valores dos efeitos principais e dos efeitos de interação para esse planejamento fatorial, em função das respostas obtidas como índice de hidroxila.

TABELA 18 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3, a partir das respostas de índice de hidroxila dos produtos denominados como *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático)

Média (mg de KOH g^{-1})	**32,29 ± 3,67**
Efeitos principais	
variável **1** (DEG)	31,61 ± 7,33
variável **2** ($SnOct_2$)	10,04 ± 7,33
variável **3** (tempo)	– 20,46 ± 7,33
Efeitos secundários de interação	
12	12,46 ± 7,33
13	– 17,24 ± 7,33
23	– 2,81 ± 7,33
Efeito trifatorial	
123	2,58 ± 7,33

Por meio da análise dos dados, foi verificado que o efeito principal para a variável DEG e para a variável tempo de reação, além do efeito de interação **13**, podem ser considerados como estatisticamente significativos, uma vez que o valor absoluto para cada um desses efeitos foi superior a 16,91 mg de KOH g^{-1}, produto calculado entre o valor do ponto da distribuição de Student com oito graus de liberdade (2,306), ao intervalo de 95 % de confiança, e o erro padrão para cada resposta (7,33 mg de KOH g^{-1}). Nesse nível de confiança, o efeito principal da variável $SnOct_2$, os efeitos de interação **12** e **23** e, ainda, o efeito trifatorial não foram estabelecidos como significativos.

A variável que exerceu a maior influência no valor do índice de hidroxila foi a massa de DEG, enquanto que o tempo reacional apresentou efeito, porém com menor intensidade. Foi possível constatar que o efeito do DEG foi positivo, o que permite estabelecer que a mudança do nível negativo (18,6 mL ou 0,196 mol) para o nível positivo (46,5 mL ou 0,490 mol) melhora o valor da resposta. Porém, para o tempo de reação foi observado um efeito negativo, o que indica que a modificação do nível negativo (5 h) para o nível positivo (10 h) reduziu o resultado do número de hidroxila.

Nesse contexto, o *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) PAL_c#4, sintetizado com um volume de DEG de 46,5 mL (0,490 mmol), na presença de $SnOct_2$ e no tempo de reação de 5 horas, indicou o maior valor de índice de hidroxila, sendo, portanto, o produto escolhido como material polimérico de terminações hidroxila para a encapsulação posterior da heparina.

5.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho

De forma geral, os produtos denominados por *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) apresentaram espectros de IVTF como o representado na Figura 18 para o PAL_a#4. Esse espectro revelou sinais característicos do grupamento éster, com uma banda em 1753 cm^{-1} referente ao estiramento de C=O; em 1184 cm^{-1}, assinalada para o estiramento assimétrico de C–O; e, em 1091 cm^{-1}, decorrente do estiramento simétrico de C–O–C.

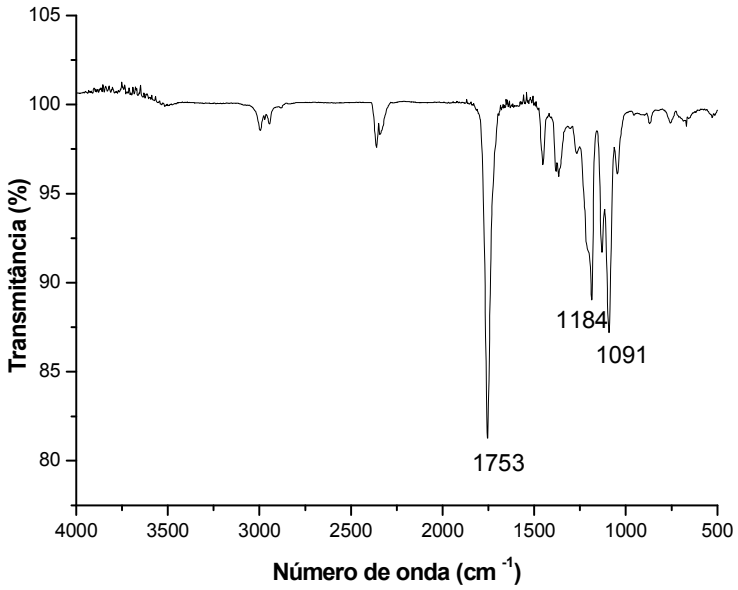


FIGURA 22 – Espectro de IVTF do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 (4 cm^{-1}, 32 scans, em pastilha de KBr)

Segundo a literatura (DRUMOND *et al*., 2004; YAO *et al*., 2004; MOTTA; DUEK, 2007), o poli(ácido lático) possui sinais fortes de absorção em três regiões, devido às vibrações do grupo CCOOC: em 1751 cm^{-1}, representando o estiramento de C=O; em 1195 cm^{-1}, devido ao estiramento assimétrico de C–O; e em 1110 cm^{-1}, decorrente ao estiramento simétrico de C–O–C, conforme a Figura 19. Confrontando esses relatos com o espectro destacado no presente trabalho, é possível verificar uma elevada semelhança, o que comprova a formação do poli(ácido lático).

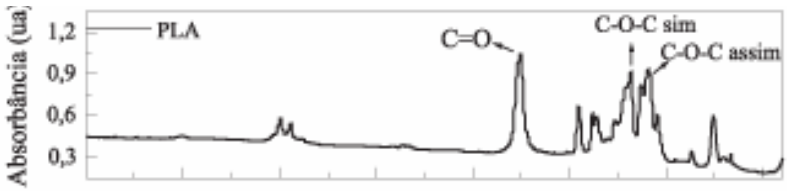
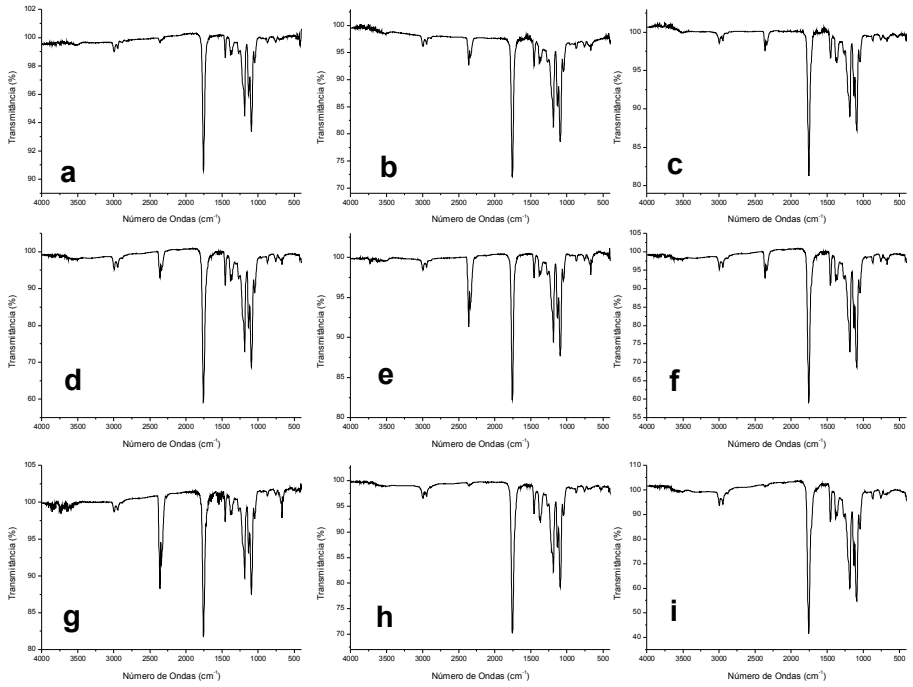


FIGURA 23 – Espectro de infravermelho para o homopolímero de poli(ácido lático) (DRUMOND *et al*., 2004)

Os materiais com terminações carboxila, de estrutura geral *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), sintetizados em diferentes condições, apresentaram espectros de

IVTF semelhantes ao do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) de partida, como mostrado na Figura 20. Dessa forma, a presença de grupamentos carboxila terminais não acarretou diferenças passíveis de observação por IVTF, o que concorda com os resultados apontados pela determinação do índice de carboxila, na qual foram verificados aumentos pouco pronunciados desses valores.

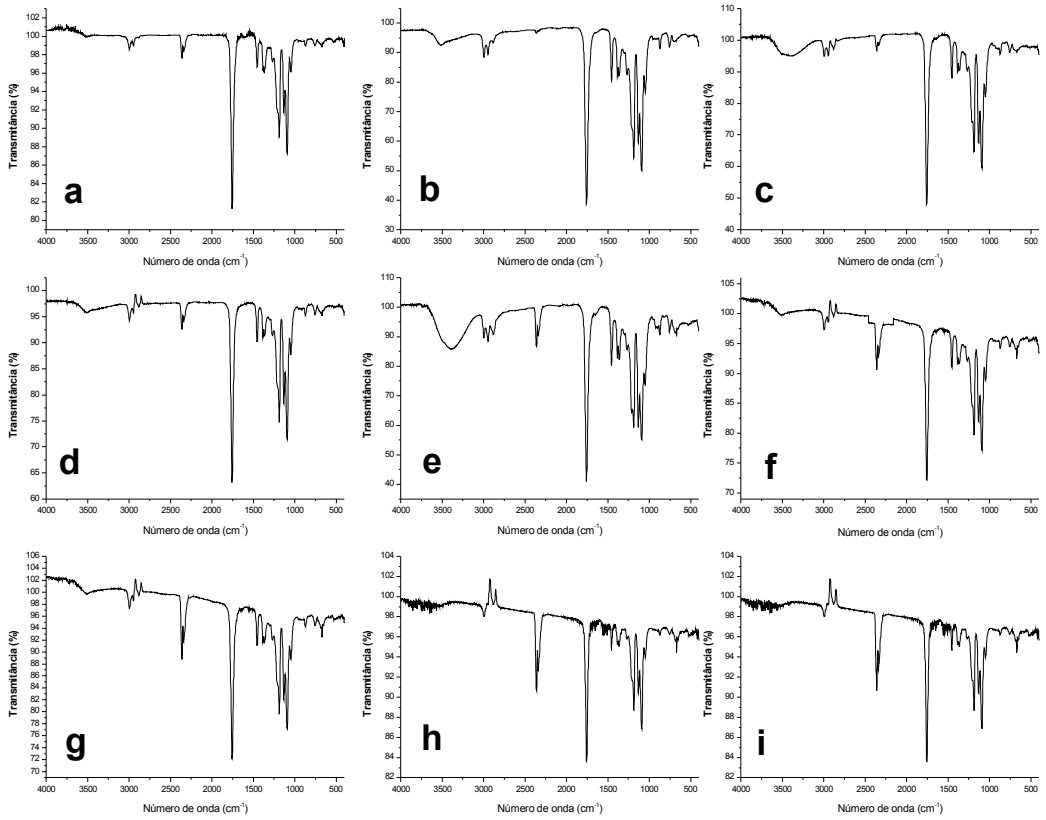


* **a** = PAL_a#4, **b** = PAL_b#1, **c** = PAL_b#2, **d** = PAL_b#3, **e** = PAL_b#4, **f** = PAL_b#5, **g** = PAL_b#6, **h** = PAL_b#7 e **i** = PAL_b#8

FIGURA 24 – Espectros de IVTF dos polímeros *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), sintetizados em diferentes condições experimentais, frente ao *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 (4 cm^{-1}, 32 scans, em pastilha de KBr)

Os polímeros com terminações hidroxila, designados como *α*-*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), também revelaram espectros de IVTF semelhantes, indicando todas as bandas características do espectro de IVTF do PAL_a#4. Entretanto, para a maioria das condições experimentais (Figura 21), foi verificado um aumento perceptível da banda presente na região entre 3200 e 3500 cm^{-1}, que pode ser atribuída ao aumento no número de grupamentos hidroxila terminais nesses

materiais. De forma particular, é importante destacar que o produto PAL_c#4, selecionado para a encapsulação da heparina, apresentou uma banda mais pronunciada nessa região de número de onda, o que condiz com os resultados encontrados na determinação do índice de hidroxila.



* **a** = PAL_a#4, **b** = PAL_c#1, **c** = PAL_c#2, **d** = PAL_c#3, **e** = PAL_c#4, **f** = PAL_c#5, **g** = PAL_c#6, **h** = PAL_c#7 e **i** = PAL_c#8

FIGURA 25 – Espectros de IVTF dos polímeros *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), sintetizados em diferentes condições experimentais, frente ao *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 (4 cm^{-1}, 32 scans, em pastilha de KBr)

O espectro de IVTF do conjugado formado entre o poli(ácido lático) e a heparina está representado na Figura 22, de forma comparativa ao espectro de IVTF do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4.

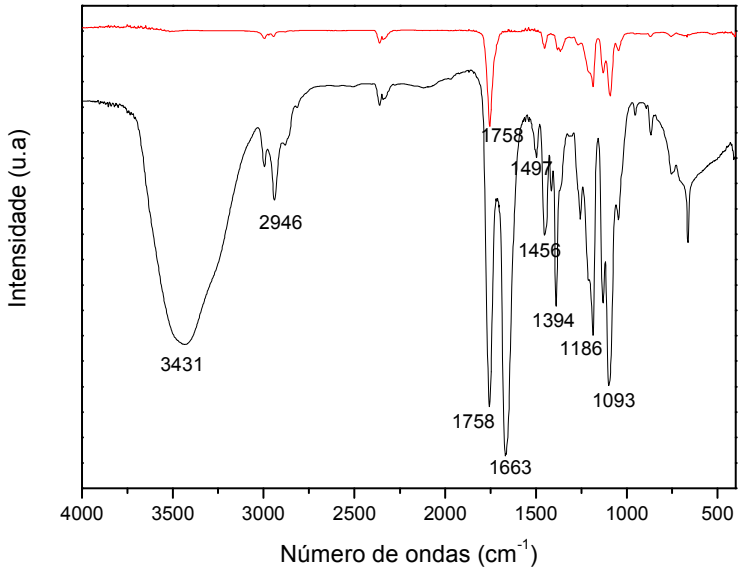


FIGURA 26 – Espectro de IVTF do complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) sintetizado, frente ao *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4 (4 cm^{-1}, 32 scans, em pastilha de KBr)

Foi possível verificar o surgimento de uma banda de elevada intensidade em 1663 cm^{-1}, que foi atribuída ao estiramento do grupo C=O presente na função amida, decorrente da reação entre a amina secundária da heparina e o grupo ácido carboxílico terminal do poli(ácido lático). Ainda assim, pode ter ocorrido a formação de grupamentos ésteres, a partir da reação entre grupos hidroxila e grupos carboxila que compõem ambas as estruturas químicas, heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático). Entretanto, considerando que o espectro do polímero de partida já revelava uma banda de elevada intensidade de absorção em 1758 cm^{-1}, associada ao estiramento C=O existente na ligação éster, não foi possível verificar modificações no espectro de IVTF do conjugado nessa região de número de onda, embora essa hipótese de complexação não tenha sido descartada. Também, a presença de uma banda alargada em 3431 cm^{-1}, ausente no poli(ácido lático) denota a incorporação da molécula de heparina no produto final, uma vez que o estiramento de grupos O–H e N–H que compõem o anticoagulante podem ser assinalados como os responsáveis pela formação desse sinal de absorção. As bandas verificadas em 1093 e 1186 cm^{-1} podem ser decorrentes, respectivamente, ao estiramento simétrico de C–O–C e ao estiramento assimétrico de C–O,

verificados anteriormente no polímero de partida e que, também, estão presentes na estrutura da heparina. As bandas em 1394 e 1456 cm^{-1} foram atribuídas como absorções típicas provenientes de deformações simétricas e assimétricas de ligações C–H, presentes nas moléculas da heparina e do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático).

5.3.4 Massa molar numérica média

Utilizando os resultados de índice de carboxila e de índice de hidroxila anteriormente determinados, a massa molar numérica média ($\overline{M_n}$) de todos os polímeros sintetizados foi calculada, conforme Lucas, Soares e Monteiro (2001). A massa molar numérica do polímero de partida, *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, foi de 2275 g mol^{-1}. Os resultados de $\overline{M_n}$, obtidos para os produtos genericamente denominados por *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), estão expressos nas Tabelas 19 e 20, respectivamente. Em geral, os polímeros sintetizados revelaram uma baixa massa molar, podendo ser classificados como materiais oligoméricos.

Os materiais com grupamentos carboxila terminais, para todas as condições de reação empregadas, indicaram $\overline{M_n}$ ligeiramente superior ao do poli(ácido lático) de partida, com valores variando de 2363 g mol^{-1} para o PAL_b#7 a 2642 g mol^{-1} para o PAL_b#3. Em função da proximidade entre os valores de $\overline{M_n}$ verificados para esses polímeros, não foi possível estabelecer uma correlação com as variáveis utilizadas no planejamento fatorial proposto.

TABELA 19 – Massa molar numérica média calculada para os polímeros *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático), com base nos respectivos valores de índice de carboxila

Material	$\overline{M_n}$ (g mol^{-1})
PAL_b#1	2416
PAL_b#2	2568
PAL_b#3	2642
PAL_b#4	2497
PAL_b#5	2468
PAL_b#6	2533
PAL_b#7	2363
PAL_b#8	2528

* o polímero de partida foi o PAL_a#4, com $\overline{M_n}$ de 2275 g mol^{-1}

TABELA 20 – Massa molar numérica média calculada para os polímeros *α*-*ω*-hidroxi-poli(ácido lático), com base nos respectivos valores de índice de hidroxila

Material	$\overline{M_n}$ (g mol^{-1})
PAL$_c$#1	3583
PAL$_c$#2	1621
PAL$_c$#3	3822
PAL$_c$#4	1236
PAL$_c$#5	3308
PAL$_c$#6	3335
PAL$_c$#7	3580
PAL$_c$#8	2082

* o polímero de partida foi o PAL$_a$#4, com $\overline{M_n}$ de 2275 g mol^{-1}

Para os polímeros estruturalmente definidos como *α*-*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), foram obtidos valores de $\overline{M_n}$, em geral, superiores a 3308 g mol^{-1}. Entretanto, três materiais apresentaram uma redução da massa molar em relação ao polímero de partida (PAL$_a$#4), revelando valores de 1621, 1236 e 2082 g mol^{-1}, respectivamente para os produtos PAL$_c$#2, PAL$_c$#4 e PAL$_c$#8.

Dessa forma, é possível sugerir que paralelamente à reação do DEG com os grupamentos carboxila terminais do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL$_a$#4, podem ter ocorrido outros processos, como a degradação desses materiais poliméricos, ocasionando a discrepância com os outros resultados obtidos.

A massa molar de algumas amostras dos produtos denominados como *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) foram também analisadas por meio da cromatografia por exclusão de tamanho (CET), para a avaliação da massa molar ponderal média ($\overline{M_w}$) e da distribuição da massa molar ($\overline{M_w}/\overline{M_n}$). Os resultados estão expressos na Tabela 15.

TABELA 21 – Valores de massa molar para os polímeros *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho

Materiais	$\overline{M_w}$ (g mol^{-1})	$\overline{M_w}/\overline{M_n}$
PAL$_a$#4	3349	1,3
PAL$_b$#1	1683	1,9
PAL$_b$#3	1766	1,9
PAL$_b$#5	1894	1,9
PAL$_b$#7	1827	1,9

Dentro da faixa de grandeza verificada para esses polímeros, a CET forneceu informações relevantes sobre à distribuição de massa molar ($\overline{M_w}/\overline{M_n}$) dos materiais, a qual resultou em uma faixa de 1,6 ± 0,3.

Embora a massa molar de polímeros possa ser considerada como um fator relevante para a sua aplicação, a literatura também considera viável o uso de materiais oligoméricos como matrizes poliméricas para a encapsulação de fármacos (HYON, JAMSHIDI; IKADA, 1997; CHEN *et al*., 2006), como os obtidos no presente estudo.

5.3.5 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

Os polímeros sintetizados a partir do ácido lático, *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático), foram submetidos à análise por RMN de ^{13}C (Figuras 23 a 25). Os espectros desses três polímeros mostraram os mesmos três sinais que caracterizam o mero do poli(ácido lático). Um sinal em 16,7 ppm referente ao grupo CH_3, outro sinal em 69,1 ppm, atribuído ao grupo CH e, por fim, um sinal em 169,7 ppm referente ao C=O. O sinal a 76,5 ppm foi decorrente do uso do solvente clorofórmio deuterado ($CD Cl_3$). Todos esses assinalamentos estão de acordo com a literatura (MOTTA; DUEK, 2006).

A Figura 23 destaca ainda os demais sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C para o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático). Além dos assinalamentos mencionados, pode ser observado um sinal em 20,4 ppm referente a CH_3, outro sinal em 66,8 ppm atribuído ao grupo CH e um sinal em 175,1 ppm decorrente do grupamento C=O. Todos esses sinais estão ligados ao C–OH terminal. Da mesma forma foram evidenciados os sinais em 20,2 ppm, 66,5 ppm e 174,3 ppm referentes às estruturas CH_3, CH e C=O, respectivamente, decorrentes do grupo terminal $C(CH_3)COOH$ da cadeia polimérica, caracterizando o poli(ácido lático) de partida PAL_a#4.

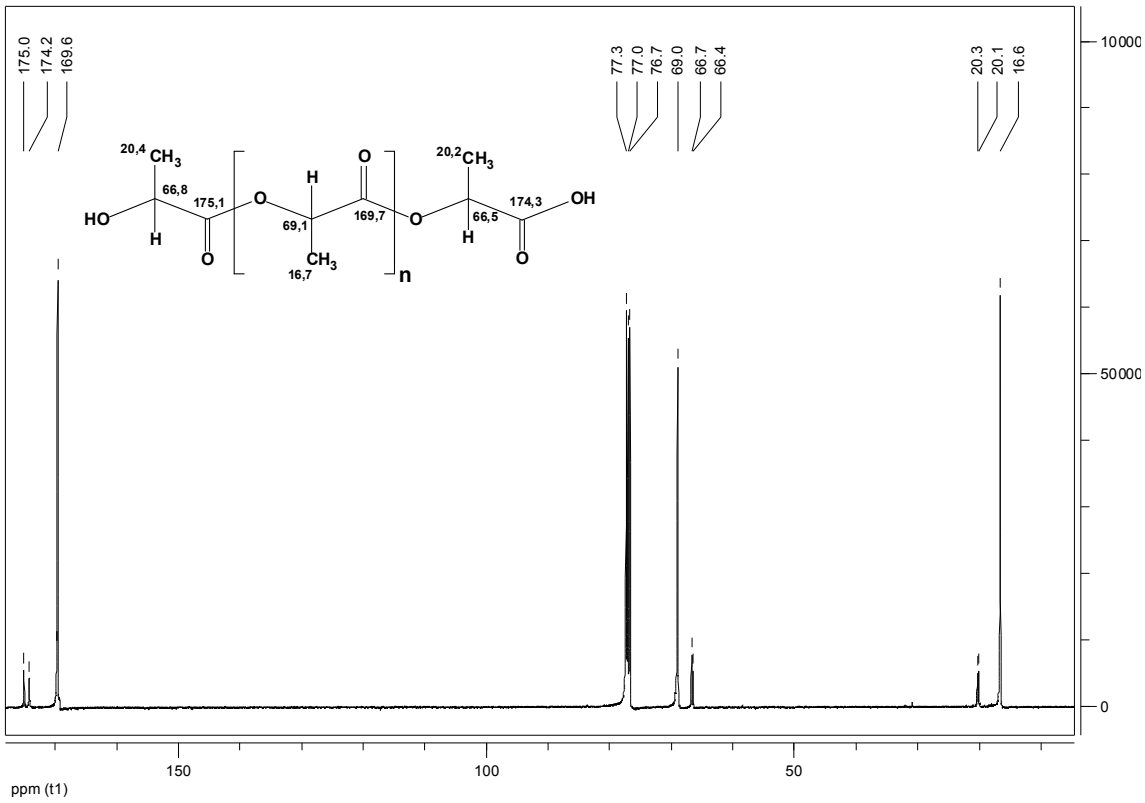


FIGURA 27 – Espectro RMN de ^{13}C do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4

O espectro de RMN ^{13}C do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) está representado na Figura 24. Nesse espectro podem ser observados, além dos sinais característicos do mero do poli(ácido lático), o aparecimento de quatro novos sinais: 171,4 ppm referente a C=O, 28,4 ppm e 28,7 ppm, atribuídos a dois grupamentos CH_2, e um sinal em 177,3 ppm referente ao carbono do grupo terminal COOH. Esses assinalamentos presentes no material PAL_b#1 permitem comprovar a ligação entre o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e o anidrido succínico, como proposto.

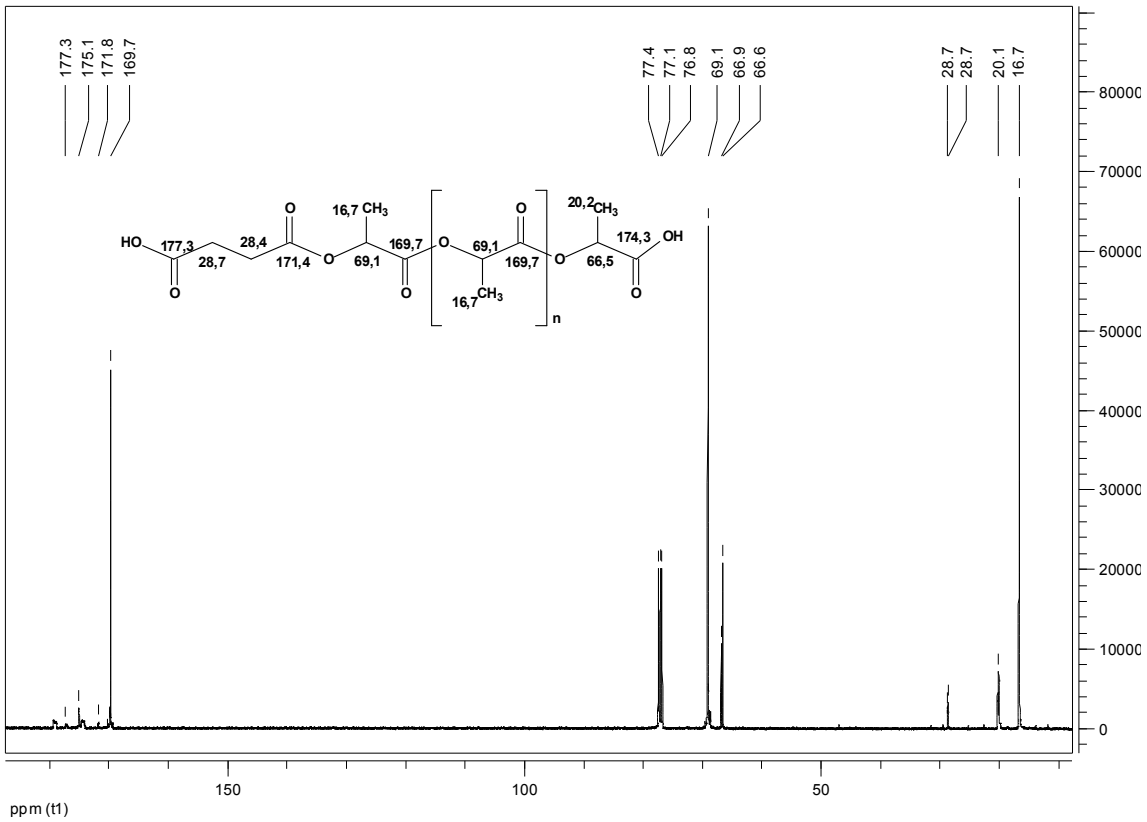


FIGURA 28 – Espectro RMN de ^{13}C do *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) PAL_b#1

A Figura 25 mostra o espectro de RMN do *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático). Nesse espectro também foi possível observar os sinais referentes ao *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) de partida. Entretanto, não foram mais evidenciados os sinais em 20,2 ppm, 66,5 ppm e 174,3 ppm, referentes às estruturas CH_3, CH e a C=O (do grupo terminal COOH da cadeia polimérica), pela qual ocorreu a ligação entre o PAL_a#4 e o DEG. Por outro lado, surgiram novos sinais em 69,5 ppm referente a CH, em 20,3 ppm atribuído a CH_3 e em 172,0 ppm referente a C=O da unidade ácido carboxílico terminal que reagiu com o DEG. Além disso, os grupamentos CH_2, que caracterizam a estrutura desse composto, foram representados pelos sinais em 64,3 ppm, 68,8 ppm, 72,3 ppm e 61,6 ppm, demonstrando a esterificação do DEG na estrutura polimérica do poli(ácido lático).

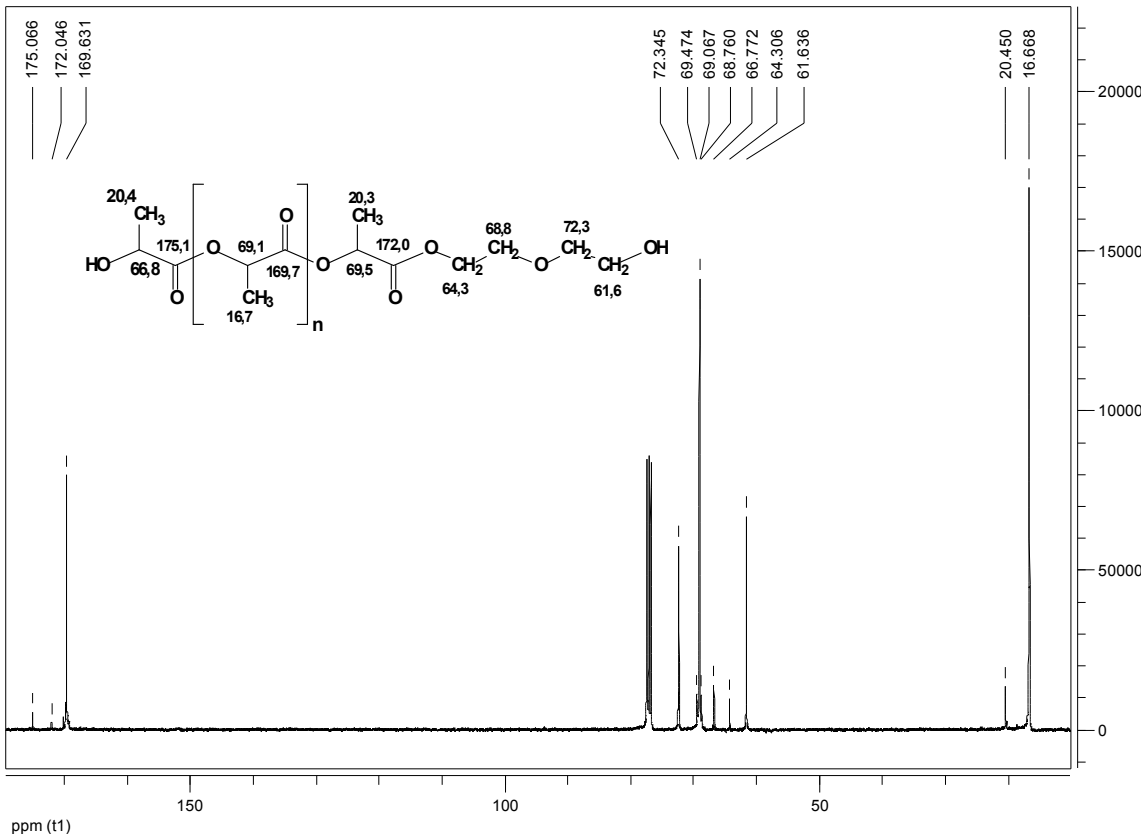


FIGURA 29 – Espectro RMN de ^{13}C do *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) PAL_c#4

5.3.6 Difração de raio-X dos materiais poliméricos

Os três materiais poliméricos previamente selecionados, PAL_a#4, PAL_b#1 e PAL_c#4, apresentaram difratogramas de raio-X com os principais picos de cristalinidade em 2θ = 16,8 ^{o} e em 19,1 ^{o} (Figura 26). A presença de picos na mesma região de 2θ sugere que os padrões de cristalinidade dos polímeros são semelhantes. A presença desses picos assinalados está condizente com as informações disponíveis na literatura (XING, ZANG; TAN, 2007; MOTTA; DUEK, 2006; YAO *et al*., 2004).

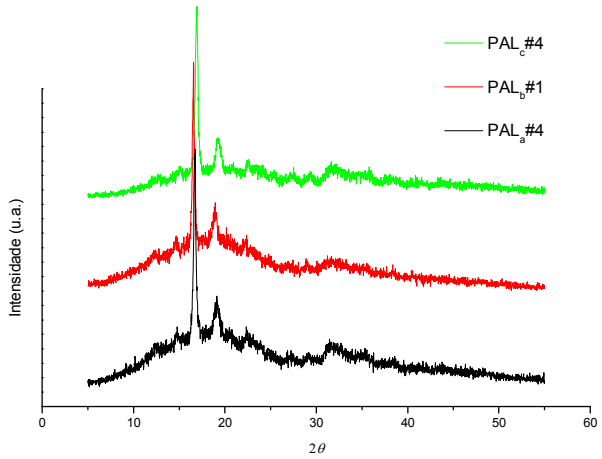


FIGURA 30 – Difratogramas dos materiais poliméricos *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL$_a$#4, *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) PAL$_b$#1 e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) PAL$_c$#4

O complexo *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)-heparina, obtido por meio do uso do sistema DCC/DMAP em temperatura ambiente, revelou a presença de picos indicativos de cristalinidade atribuídos tanto ao *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), como à heparina, como pode ser visualizado na Figura 27. Esse resultado corrobora com os dados verificados por IVTF que indicaram a incorporação da heparina e a formação de ligações amida entre a o fármaco e o poliéster.

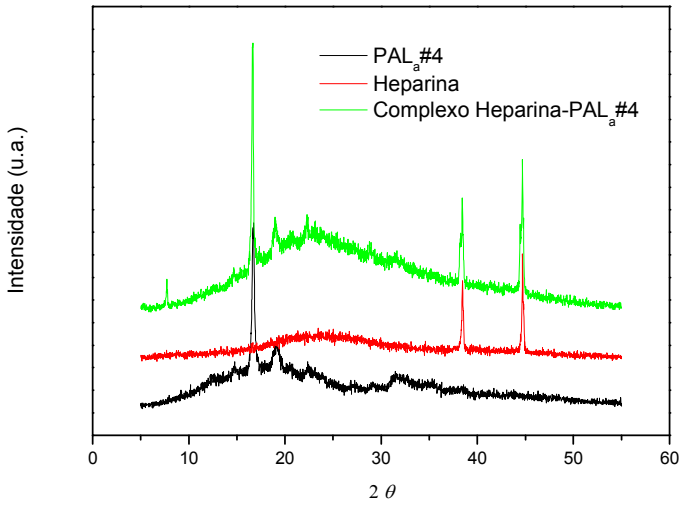


FIGURA 31 – Difratograma do conjugado heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), frente aos difratogramas da heparina e do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL$_a$#4

5.4 ENCAPSULAÇÃO DA HEPARINA EM NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO)

5.4.1 Nanopartículas da heparina obtidas por meio do método de emulsão múltipla e evaporação do solvente

O procedimento de encapsulação da heparina, em matrizes de *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) (PAL_a#4), *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) (PAL_b#1), *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) (PAL_c#4) resultaram em partículas que, imediatamente após a formação da emulsão $A_1/O/A_2$, revelaram um aspecto macroscópico leitoso. Entretanto, depois da evaporação do solvente, a dispersão apresentou um aspecto translúcido. Com a centrifugação e a secagem, o material assumiu uma forma de sólido pulverulento, de coloração branca.

5.4.1.1 Análises morfológicas e de superfície

A Tabela 22 sumariza os valores de tamanho das partículas formadas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente, a partir de formulações constiuídas por heparina como fármaco e PAL_a#4 como matriz polimérica, nas condições experimentais previamente estabelecidas (características do estabilizante da fase aquosa externa e o solvente orgânico empregado).

TABELA 22 – Tamanho das partículas de *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) (PAL_a#4) contendo heparina, formuladas por emulsão múltipla e evaporação do solvente

Formulação	Estabilizante	Massa molar (g mol^{-1})	Concentração do tensoativo estabilizante (%)	Solvente orgânico	Tamanho médio (nm)
1	PVAl	123.000	0,1	DCM	3.630
2	PVAl	123.000	1,0	DCM	2.400
3	PVAl	123.000	2,5	DCM	640
4	PVAl	70.000 a 80.000	2,5	DCM	940
5	PVAl	13.000 a 26.000	5,0	DCM	—
6	PVAl	13.000 a 26.000	10,0	DCM	97,2
7	PVAl	13.000 a 26.000	15,0	DCM	97,6
8	PVP	40.000	1,0	DCM	1.080
9	Polisorbato 80	1.310	1,0	DCM	1.070
10	PVAl	70.000 a 80.000	2,5	$HCCl_3$	1.410

* Legenda: DCM: diclorometano, — não determinado

A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas elaboradas na formulação **1**, na qual o poli(álcool vinílico) (PVAl) de 123.000 g mol^{-1} foi utilizado na concentração de 0,1 % (m/V), indicou um formato esférico em sua maioria e, em alguns casos, uma forma côncava (Figura 28)

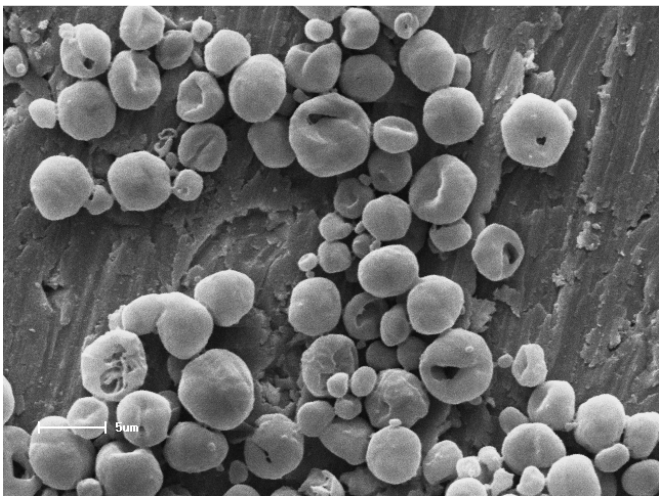


FIGURA 32 – Aspecto morfológico das partículas denominadas como formulação **1** (fotomicrografia obtida por MEV, aumento de 2.000x)

O tamanho médio dessas partículas foi de 3,63 μm, o que as caracteriza como micropartículas.

As partículas obtidas na formulação **2**, com a aplicação de 1 % (m/V) de PVAl de 123.000 g mol^{-1}, também se revelaram como materiais micrométricos, com tamanho médio de 2,4 μm, e com formato esférico, algumas vezes com aspecto côncavo (Figura 29).

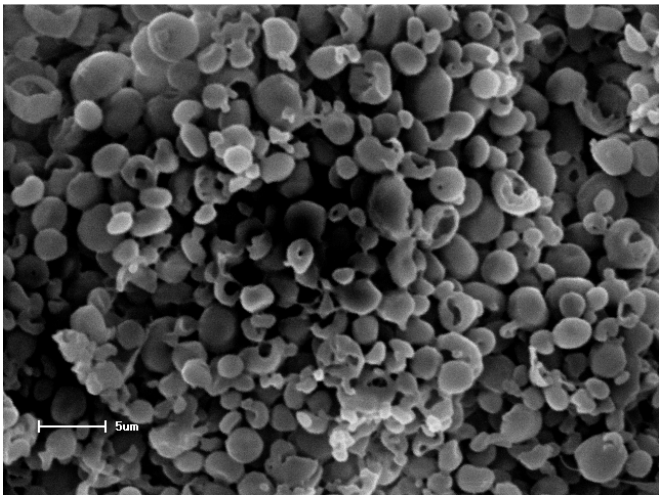


FIGURA 33 – Aspecto morfológico das partículas designadas como formulação **2** (fotomicrografia obtida por MEV, aumento de 2.000X)

Na Figura 30, podem ser observadas as partículas prepararadas na formulação **3**, com o emprego de uma solução de 2,5 % (m/V) de PVAl de 123.000 g mol^{-1}, as quais mostram um aspecto mais homogêneo, com partículas esféricas e de tamanho na escala nanométrica, com valor médio de 640 nm. Embora tenham sido verificadas nanopartículas isoladas, foi possível comprovar a formação de muitos aglomerados de nanopartículas.

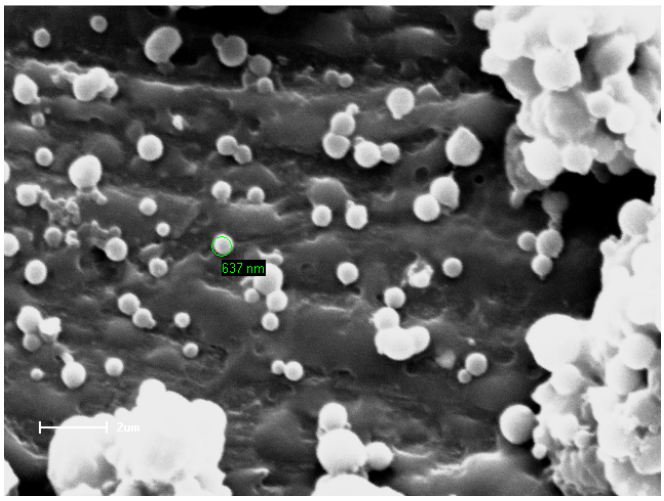


FIGURA 34 – Aspecto morfológico das partículas que constituem a formulação **3** (fotomicrografia obtida por MEV, aumento de 5.000X)

Dessa forma, os resultados verificados para as formulações de número **1**, **2** e **3** demonstraram uma influência positiva da concentração do PVAl na redução do tamanho das partículas, permitindo a obtenção de materiais da ordem micrométrica

até a ordem nanométrica. As variações de tamanho em relação à concentração do PVAl de 123.000 g mol^{-1} podem ser melhor evidenciadas na Figura 31.

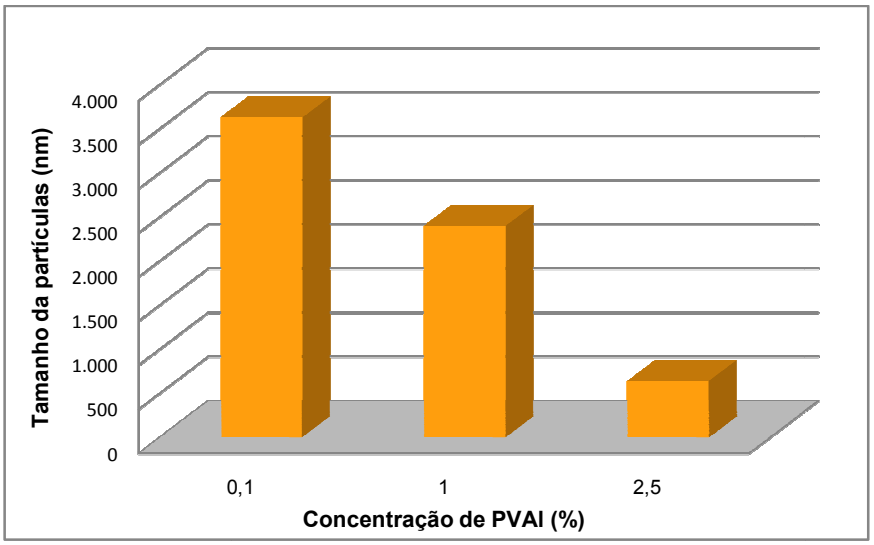


FIGURA 35 – Variação de tamanho das partículas em função da concentração do PVAl com massa molar de 123.000 g mol^{-1}

Além dos experimentos previamente discutidos, ensaios preliminares foram desenvolvidos utilizando o PVAl com massa molar de 130.000 g mol^{-1}, em concentrações na faixa de 3 a 5 % (m/V). Porém, nessas condições, foi observada a formação de uma fase externa muito viscosa, o que impossibilitou a homogeneização adequada do sistema disperso, resultando na formação de partículas de elevado tamanho. Devido a esse fator limitante, para avaliar o efeito de concentrações mais elevadas desse estabilizante, foram utilizadas amostras de PVAl de menores massas molares.

Na formulação **4**, para a qual foi usado um PVAl de massa molar entre 70.000 e 80.000 g mol^{-1}, na concentração de 2,5 % (m/V), também foram obtidas partículas nanométricas, entretanto com tamanho médio de 940 nm, superior ao verificado para a formulação **3**. A morfologia se manteve esférica, com a presença de interligações entre as partículas, conforme pode ser visualizado na Figura 32.

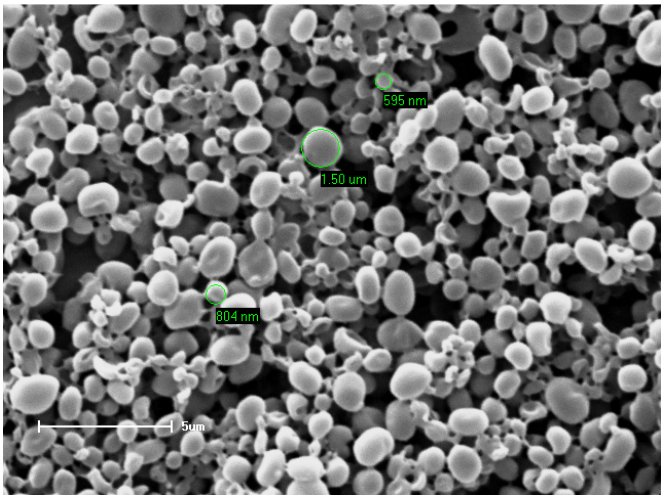


FIGURA 36 – Aspecto morfológico das partículas que compõem a formulação **4** (fotomicrografia obtida por MEV, aumento de 5.000X)

A Figura 32 apresenta a análise morfológica por MEV para as formulações de número **5**, **6** e **7**, que foram desenvolvidas com diferentes concentrações do PVAl de baixa massa molar, entre 13.000 e 23.000 g mol^{-1}. Na formulação em que foi usado o PVAl a 5 % (m/V), não foi possível visualizar a presença das nanopartículas, sendo que a imagem revelou um aspecto de aglomerados de material polimérico (Figura 33a). Porém, para as formulações contendo PVAl a 10 e 15 % (m/V), foi observada a formação de nanopartículas esféricas e homogêneas (Figuras 33b e 33c), com tamanhos médios bastante próximos, respectivamente, de 97,2 e 97,6 nm.

Justificativas para a redução de tamanho das partículas com o aumento da concentração do PVAl na fase aquosa externa foram apresentadas por Namur *et al*. (2006) e por Sahoo *et al*. (2002). De acordo com esses autores, o aumento na concentração desse polímero promoveu uma maior estabilidade da emulsão formada. Em concentrações superiores a 2,5 %, o PVAl revelou uma melhor atividade tensoativa, reduzindo a coalescência das gotículas, com a obtenção de dispersões mais estáveis e de nanopartículas de tamanhos mais uniformes.

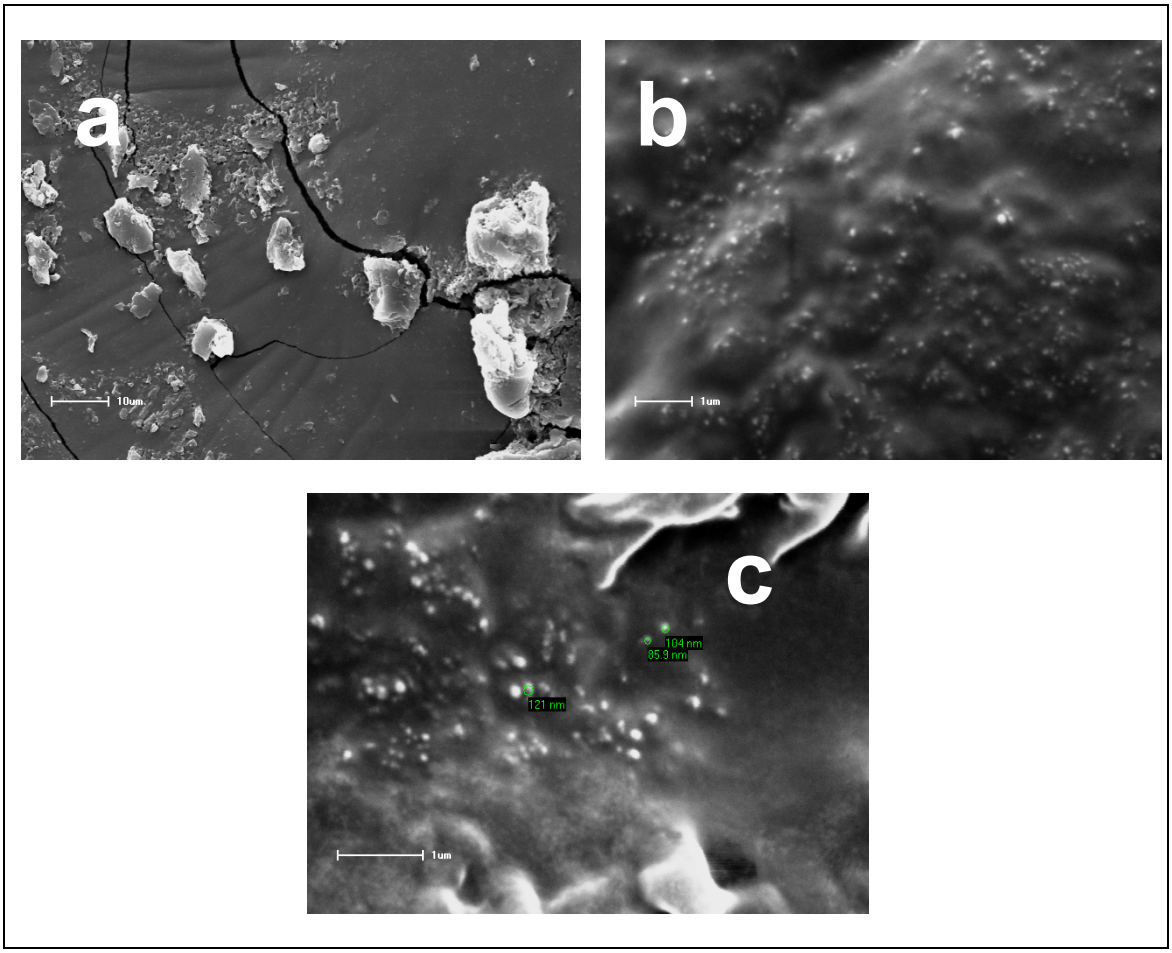


FIGURA 37 – Aspectos morfológicos das nanopartículas obtidas com a utilização do PVAl de baixa massa molar, (**a**) PVAl a 5 % (aumento 1.000 X), (**b**) PVAl a 10 % (aumento 10.000 X) e (**c**) PVAl a 15 % (aumento 10.000 X)

Nesse contexto, a produção de nanopartículas com dimensões próximas a 100 nm também foi estabelecida em vários outros estudos. Quintanar-Guerrero *et al.* (1996) apontaram a influência da concentração desse estabilizante no tamanho das partículas. Esses autores observaram uma redução pronunciada no tamanho das nanopartículas com o aumento na concentração do tensoativo de 0,5 a 5 %, quando utilizaram tanto o PVAl de massa molar 26.000 g mol^{-1}, quanto o polímero de massa molar entre 30.000 e 70.000 g mol^{-1}. Couvreur *et al*. (1997) ressaltam que o aumento da concentração desse tensoativo estabilizante na fase aquosa externa conduz a uma significativa redução no tamanho das nanopartículas.

Galindo-Rodriguez *et al*. (2004), estudando alguns parâmetros físico-químicos associados à formação de nanopartículas, avaliaram a aplicação de uma

ampla faixa de concentração de PVAl (7 a 21 %), com massa molar entre 13.000 e 26.000 g mol^{-1}. Nesse trabalho, os pesquisadores obtiveram nanopartículas de menores tamanhos (diâmetro médio de 116 nm), empregando 19 % de PVAl na fase aquosa. Outros estudos mostraram resultados semelhantes (FECZKÓ; TÓTH; GYENIS, 2007; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; SAHOO *et al*., 2002; LEMOINE; PRÉAT, 1998).

Entretanto, Moinard-Chécot *et al.* (2008) apontaram resultados discordantes aos dos autores anteriormente citados, bem como aos encontrados no presente trabalho. Esses autores não observaram a diminuição do tamanho das partículas com o aumento da concentração do PVAl; ao contrário, obtiveram partículas maiores com a elevação da concentração desse estabilizante. Também não observaram diferença quanto à aplicação de polímeros de diferentes massas molares.

Embora o PVAl seja o tensoativo mais amplamente utilizado na preparação de micropartículas e/ou nanopartículas, outros estabilizantes têm sido propostos, especialmente a poli(vinilpirrolidona) (FECZKÓ; TÓTH; GYENIS, 2007) e o polisorbato 80 (BECK *et al*., 2003).

Considerando esses antecedentes verificados na literatura, também foi estudada a utilização desses tensoativos na fase aquosa externa da emulsão múltipla, para a encapsulação de heparina em nanopartículas baseadas no poli(ácido lático).

A Figura 34 revela o aspecto morfológico das partículas produzidas utilizando-se o poli(vinilpirrolidona) (PVP) como tensoativo no processo de encapsulação. Com a utilização de PVP, houve a formação de partículas com tamanho médio de 1,08 μm, as quais revelaram algumas interligações e um aspecto bastante heterogêneo. Pode ser observada, ainda, a presença de material polimérico sem a morfologia característica de partículas. Com isso, nas condições experimentais propostas, o PVP não se mostrou um estabilizante adequado à formação de nanopartículas. Essa afirmação é concordante com Feczkó, Tóth e Gyenis (2007), que só conseguiu produzir materiais microparticulados, com diâmetro médio de 90 μm, a partir do uso do PVP na fase aquosa.

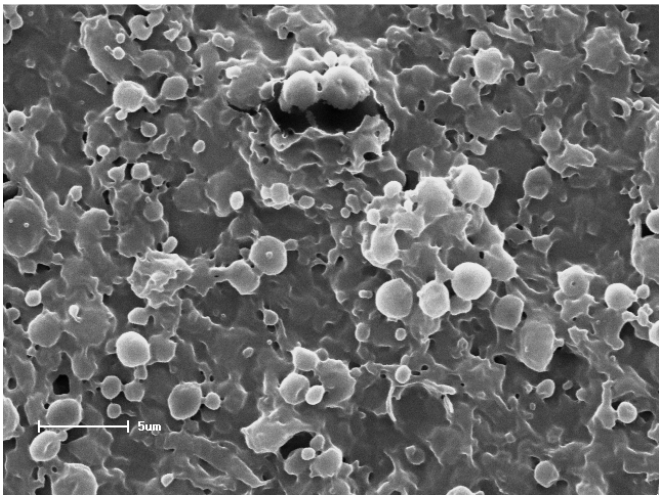


FIGURA 38 – Aspecto morfológico das partículas elaboradas com o emprego de PVP na fase aquosa externa (fotomicrografia obtida por MEV, aumento de 5.000 X)

Considerando a utilização do polisorbato 80 como estabilizante no processo de encapsulação, ocorreu a obtenção de partículas esféricas (Figura 35), com tamanho médio de 1,07 μm, mostrando um aspecto bastante heterogêneo, da mesma forma que para as partículas da formulação contendo PVP. Entretanto, essas partículas se apresentam completamente separadas, sem qualquer sinal de aglomeração e/ou interligação (Figura 35).

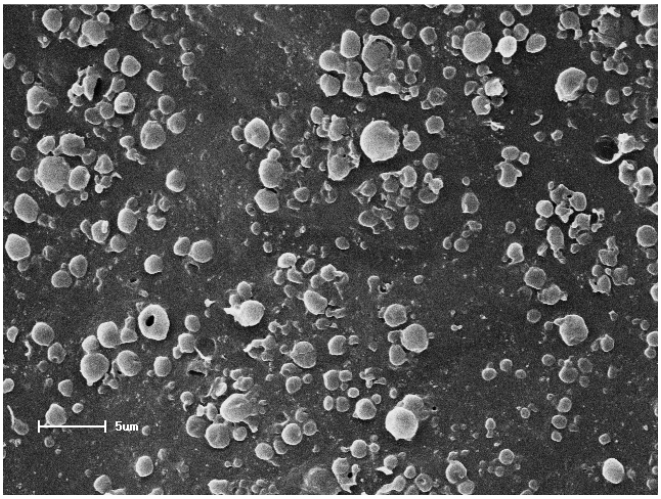


FIGURA 39 – Aspecto morfológico das partículas obtidas com a utilização de polisorbato 80 na fase aquosa externa (fotomicrografia visualizada por MEV, aumento de 2.000 X)

A encapsulação da heparina realizada pelo uso do clorofórmio como solvente orgânico (formulação **10**), em substituição ao diclorometano, revelou a

formação de materiais micrométricos, com tamanho médio de 1,41 μm (Figura 36a).

Essas partículas apresentaram aspecto esférico e distribuição heterogênea. Dessa forma, a mudança de solvente não acarretou a melhoria das características morfológicas das partículas obtidas. Pode ser observado, ainda, na Figura 36b, de forma bastante evidente, a presença de interligações unindo as partículas.

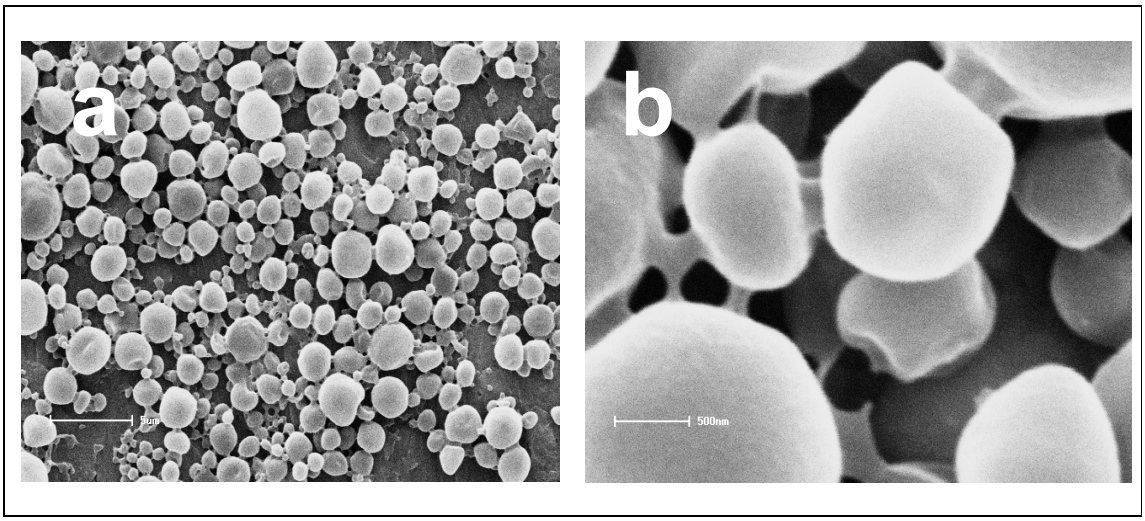


FIGURA 40 – Aspectos morfológicos das partículas produzidas com a utilização do clorofórmio como solvente orgânico (fotomicrografias obtidas por MEV, (**a**) aumento de 3 .000x e (**b**) aumento de 27.000 X)

Com exceção das partículas produzidas a partir de altas concentrações de PVAl, as demais formulações apresentaram a formação de aglomerados e de interligações. Resultados semelhantes foram encontrados por Feczkó *et al*. (2007) que, embora trabalhando com PLGA, também obtiveram nanopartículas interligadas, de difícil resuspensão.

Considerando esses resultados, também foram elaboradas nanopartículas contendo heparina a partir dos polímeros com diferentes grupos terminais: α,ω-di-carboxi-poli(ácido lático) PAL_b#1 e α,ω-di-hidroxi-poli(ácido lático) PAL_c#4. Para tanto, foram empregadas as condições experimentais da formulação **6** (Tabela 22), em função dessa preparação ter revelado o melhor desempenho nos testes preliminares,

Conforme pode ser verificado na Figura 37, as nanopartículas produzidas a partir dessas diferentes matrizes poliméricas indicaram um aspecto morfológico

similar. Essas partículas revelaram aspecto esférico, uniformes e de tamanho médio de 97,2, 118,1 e 90 nm, respectivamente para os materiais denominados como *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) PAL_b#1 e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) PAL_c#4. Portanto, é possível afirmar que as modificações químicas realizadas nos grupos terminais do poli(ácido lático) de partida não conduziu a diferenças morfológicas nas nanopartículas obtidas.

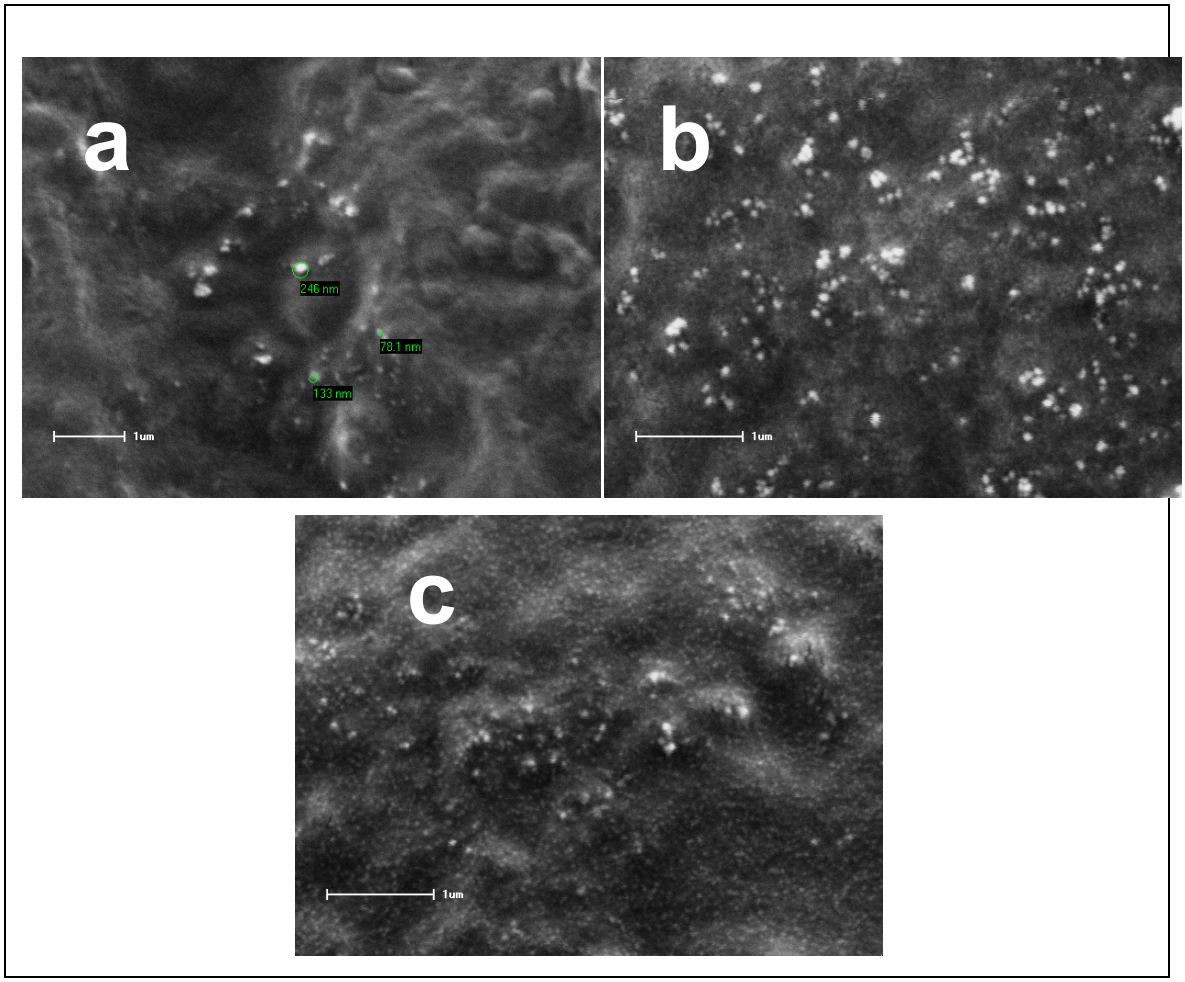


FIGURA 41 – Aspecto morfológico das nanopartículas baseadas no (**a**) PAL_a#4 (aumento 12.000 X), no (**b**) PAL_b#1 (aumento 18.000 X) e no (**c**) PAL_c#4 (aumento 18.000 X) (fotomicrografias obtidas por MEV)

5.4.1.2 Avaliação por difração de raio-X

Os difratogramas de raio-X para as amostras de nanopartículas contendo heparina, elaboradas por emulsão múltipla e evaporação do solvente, a partir do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) PAL_b#1 e *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) PAL_c#4 apresentaram perfis de difração similares, como representados nas Figuras 38, 39 e 40. Foi observado que os difratogramas dos materiais nanoparticulados possuem picos indicativos de cristalinidade provenientes da heparina e também, dos polímeros usados na preparação dos produtos nanoestruturados, de forma análoga às respectivas misturas físicas.

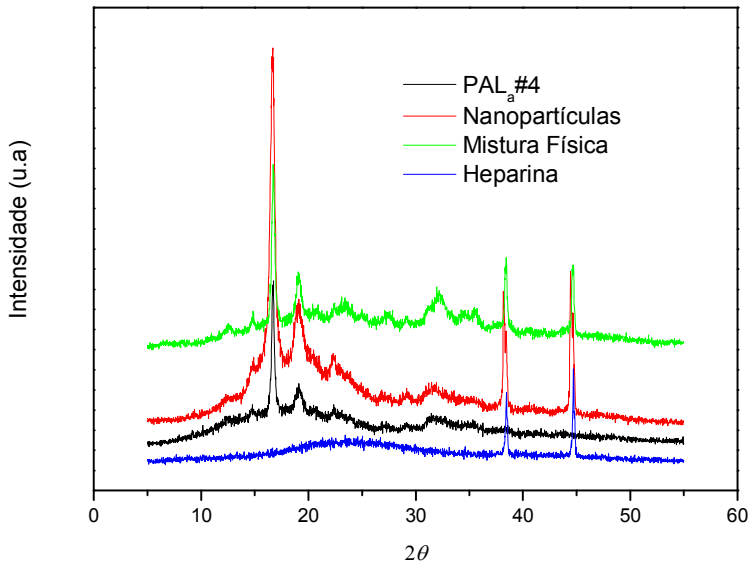


FIGURA 42 – Difratogramas da heparina, do polímero de partida PAL_a#4, da mistura física (heparina:PAL_a#4, 1:1 m/m) e das nanopartículas obtidas a partir do *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático)

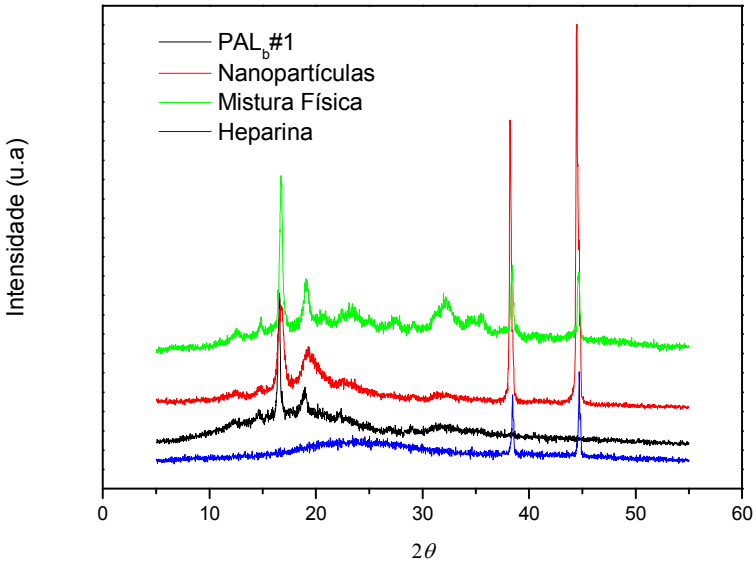


FIGURA 43 – Difratogramas da heparina, do polímero de partida PAL$_b$#1, da mistura física (heparina:PAL$_b$#1, 1:1 m/m) e das nanopartículas obtidas a partir do *α,ω*-di-carboxi-poli(ácido lático)

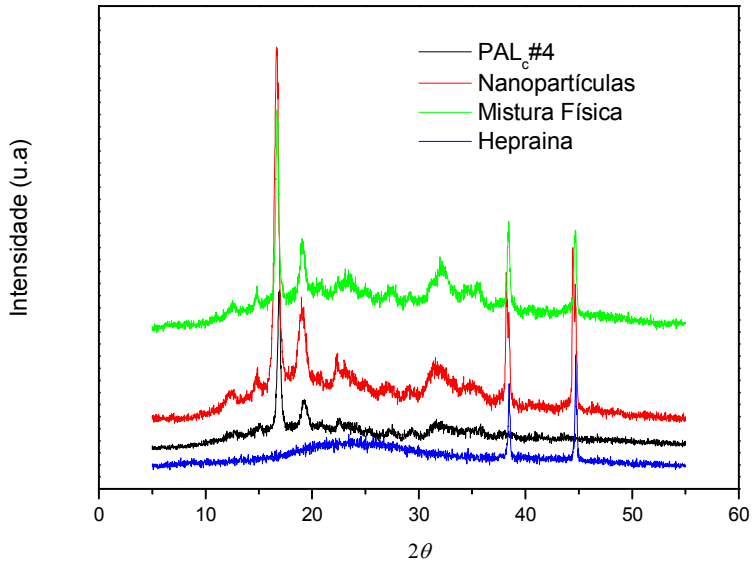


FIGURA 44 – Difratogramas da heparina, do polímero de partida PAL$_c$#4, da mistura física (heparina:PAL$_c$#4, 1:9 m/m) e das nanopartículas obtidas a partir do *α,ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático)

Assim, é possível sugerir, para as três situações experimentais, que a heparina preservou os seus picos de cristalinidade, o que denota a presença de nanodomínios nos materiais poliméricos, compondo estruturas particuladas denominadas como nanocápsulas.

5.4.2 Quantificação da heparina encapsulada nas partículas

Os resultados da eficiência de encapsulação da heparina para as formulações de **1** a **7** estão representados na Tabela 23.

TABELA 23 – Eficiência de encapsulação da heparina em diferentes concentrações de PVAl

Formulação	Massa molar ($g\ mol^{-1}$)	Concentração (%)	Eficiência de encapsulação (%)
1	123.000	0,1	54,9
2	123.000	1,0	57,2
3	123.000	2,5	58,2
4	70.000 a 80.000	2,5	59,3
5	13.000 a 26.000	5,0	58,3
6	13.000 a 26.000	10,0	55,1
7	13.000 a 26.000	15,0	55,6

Conforme pode ser observado, a utilização do PVAl, com massas molares variáveis e em diferentes concentrações, não influenciou de forma expressiva na eficiência de encapsulação da heparina. As maiores taxas de encapsulação obtidas foram próximas a 59 %.

O desempenho dessas formulações, utilizando o poli(ácido lático) como matriz polimérica, foi superior ao relatado por Jiao e colaboradores (2002) para diferentes poliésteres. Esses autores verificaram que a eficiência de encapsulação da heparina em nanopartículas, elaboradas a partir do PLGA e/ou da PCL, revelaram taxas de incorporação baixas, não ultrapassando 15 %. Da mesma forma, Yildiz *et al*. (2005) encontraram uma eficiência de encapsulação da heparina de 37 %, empregando o PVAl a 2,5 % na fase externa. Entretanto, Jiao *et al*. (2002) observaram uma taxa de incorporação superior a 97 %, quando do uso de um meta(acrilato) denominado Eudragit® RL, polímero que apresenta característica fortemente catiônica, o que pode justificar uma interação entre esse material polimérico e a heparina, um glicosaminoglicano com caráter fortemente aniônico.

Em todas as formulações desenvolvidas nessa fase do presente trabalho foi empregado o polisorbato 20 como agente estabilizante na fase aquosa interna. Estudos têm demonstrado que o uso desse tensoativo apresenta uma influência positiva na eficiência de encapsulação da heparina. Segundo Freitas *et al*. (2005), tem sido relatado por vários autores a utilização de tensoativos, como esse emulsionante não iônico, para a estabilização da emulsão primária, água em óleo.

Analisando-se a eficiência de encapsulação quando o PVAl foi substituído pelo PVP ou pelo polisorbato 80, foi possível constatar que houve uma diminuição da taxa de encapsulação. Nessas condições, o resultado mais elevado foi verificado com a utilização do PVP (39,9 %), conforme mostrado na Tabela 24.

TABELA 24 – Eficiência de encapsulação da heparina a partir do uso de diferentes tensoativos na fase aquosa externa

Formulação	Estabilizante	Eficiência de encapsulação (%)
8	PVP	39,9
9	polisorbato 80	32,1

Também, quando da avaliação da eficiência de encapsulação da heparina em partículas obtidas com o uso do clorofórmio como solvente orgânico, notou-se que esse solvente, comparativamente ao DCM, mantendo as mesmas condições experimentais, conduziu a resultados inferiores, mostrando uma taxa de incorporação de 45,2 %.

A Tabela 25 sumariza os resultados da eficiência de encapsulação da heparina, considerando a aplicação dos materiais baseados no poli(ácido lático), com diferentes grupos terminais. A maior taxa de encapsulação foi encontrada para a formulação **11,** constituída pelo *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, com uma incorporação de 58,7 % do fármaco anticoagulante. Ainda, não foi possível verificar variações expressivas na eficiência de encapsulação, em função do uso desses polímeros.

TABELA 25 – Eficiência de encapsulação da heparina em matriz polimérica de poli(ácido lático) com diferentes grupos terminais

Formulação	Poli(ácido lático) empregado	Eficiência de encapsulação (%)
11	*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4	58,7
12	*α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) PAL_b#1	57,1
13	*α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático) PAL_c#4	56,4

Dessa forma, a hipótese de diferentes interações entre a heparina e os grupos terminais desses materiais poliméricos acarretar uma maior encapsulação da heparina não pôde ser comprovada, já que não foi observada uma variação expressiva no percentual de encapsulação do anticoagulante para as três formulações em questão.

5.4.3 Avaliação da ação anticoagulante das nanopartículas de heparina obtidas por emulsão múltipla e evaporação do solvente

O ensaio biológico efetuado para a formulação **11**, que apresentou uma eficiência de encapsulação de 58,7 % e morfologia esférica, como partículas isoladas e homogêneas, permitiu comprovar a ação anticoagulante dessas nanopartículas de heparina, elaboradas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente, quando administradas por via oral, durante o período de teste (Figura 41). Considerando os animais em estudo (n = 3), o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) médio foi de 32 segundos no tempo 0, ou seja, antes da administração do material nanoestruturado, aumentando para 43 segundos, após 2 horas de avaliação. Transcorrido o período de 4 horas da administração, foi observado um declínio do TTPa, apresentando um valor médio de 37 segundos, sendo que, transcorridas 6 horas da administração, esse parâmetro hematológico retornou a níveis próximos aos basais.

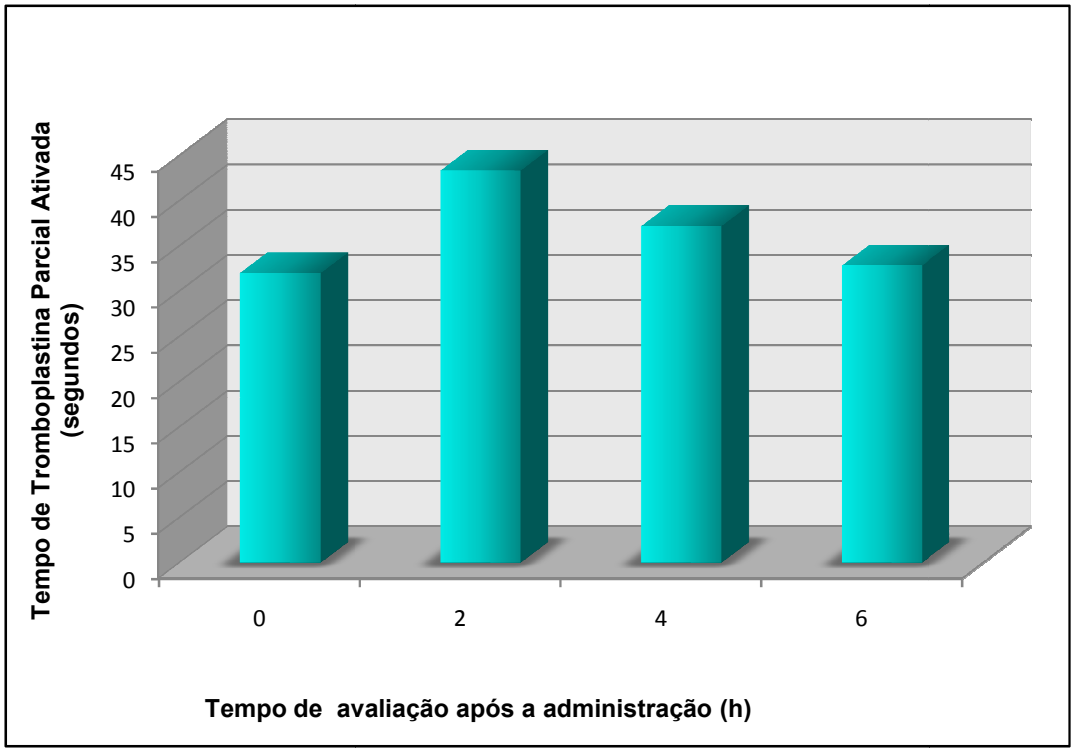


Figura 45 – Representação gráfica da atividade anticoagulante das nanopartículas de heparina, produzidas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente

Diversos estudos têm destacado que a heparina possui pouca viabilidade para a administração oral (LAMPRECHT; UBRICH; MAINCENT, 2007; LEE *et al*., 2007; KIM *et al*., 2005; JIAO *et al*., 2002; LEE; KIM; BYUN, 2000; BAUGHMAN *et al*., 1998). Particularmente, esse anticoagulante tem restrições de absorção no trato gastrintestinal (TGI) superior, devido a sua massa molar relativamente elevada, à presença de cargas negativas na sua estrutura química e as suas propriedades altamente hidrofílicas, que conduzem a uma baixa permeabilidade através do tecido epitelial. Além disso, esse fármaco pode ser despolimerizado em moléculas com atividade anticoagulante baixa e/ou ausente, após a ingestão oral. Isso porque, a heparina é rapidamente degradada pela remoção dos grupamentos sulfatos em condições ácidas e/ou pela ação de enzimas proteolíticas presentes no TGI.

Dessa forma, os resultados verificados no presente estudo demonstram a viabilidade farmacoterapêutica das nanopartículas baseadas no *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) PAL_a#4, material oligomérico de baixo custo para a obtenção e de fácil purificação, como alternativa para a administração oral da heparina, em

substituição as vias parenterais clássicas, garantindo a absorção pelo TGI e, o mais relevante, assegurando a atividade anticoagulante do fármaco.

5.5 NANOPARTÍCULAS DE HEPARINA PREPARADAS POR MEIO DO MÉTODO DE NANOPRECIPITAÇÃO

O complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), diferente da heparina empregada na reação de conjugação, se mostrou insolúvel em água e solúvel em acetona, o que permitiu a aplicação do método de nanoencapsulação para a produção dos materiais nanoestruturados.

5.5.1 Análise morfológica e de superfície

A análise por MEV do produto elaborado por nanoprecipitação está representada na Figura 42. As partículas apresentaram formato esférico, com aspecto homogêneo e com tamanho médio de 97,3 nm. Nessas condições experimentais, também não foi observada a formação de aglomerados de partículas, o que contempla as características morfológicas adequadas ao uso desse material como sistema nanoestruturado de liberação modificada do fármaco heparina.

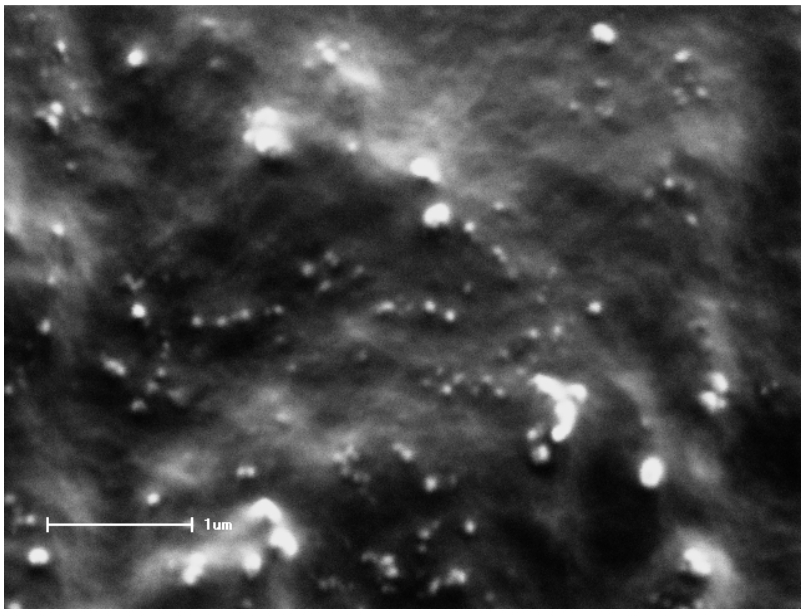


FIGURA 46 – Aspecto morfológico das nanopartículas obtidas por nanoprecipitação (fotomicrografia visualizada por MEV, aumento de 18.000 X)

O difratograma de raio-X obtido para as nanopartículas obtidas por nanoprecipitação (Figura 43), a partir do conjugado entre heparina e *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), permitiu verificar que esse material nanoestruturado conservou os mesmos picos indicativos de cristalinidade do complexo utilizado na nanoencapsulação.

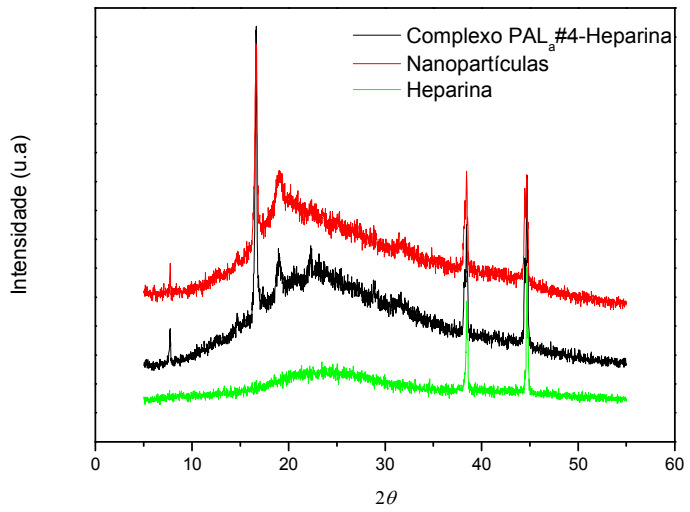


FIGURA 47 – Difratogramas da heparina, do pró-fármaco heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e das nanopartículas produzidas por nanoprecipitação

5.5.2 Avaliação da ação anticoagulante do complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) e das nanopartículas obtidas por nanoprecipitação

Considerando a necessidade de demonstrar, inicialmente, que a complexação da heparina com o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) não ocasionou a perda da atividade farmacológica, o produto resultante foi administrado intraperitonialmente em ratos da linhagem Wistar.

Conforme pode ser visualizado na Figura 44, a ação anticoagulante *in vivo* do complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) foi preservada ao longo do período de avaliação. Em comparação ao grupo controle, os animais do grupo teste (n = 3) revelaram um tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) médio

expressivamente mais elevado nos tempos de 2, 4 e 6 horas, o que comprova a manutenção do efeito biológico esperado a esse pró-fármaco sintetizado.

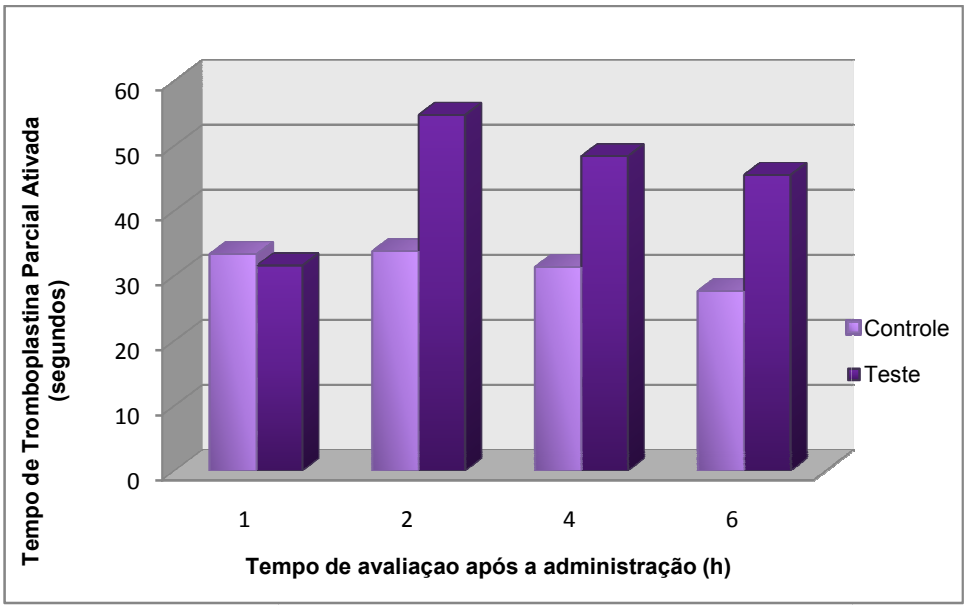


FIGURA 48 – Representação gráfica da ação anticoagulante do conjugado heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) administrado intraperitonialmente em ratos Wistar

Também, foi possível verificar que na primeira hora após a aplicação intraperitoneal do complexo, o TTPa não sofreu alteração em relação ao controle. Isso indica que a ativação do pró-fármaco demanda um tempo determinado, retardando o início do efeito farmacológico em relação à heparina livre. Porém, a partir de 2 horas, foi evidenciado um aumento do TTPa para o grupo teste (54,8 segundos), em função do grupo controle (33,8 segundos). Essa tendência também se manteve no tempo de 4 horas após a administração, com uma discreta diminuição dos valores de TTPa depois de transcorrido o tempo de 6 horas de avaliação.

A partir dos resultados positivos encontrados na avaliação anticoagulante do complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) por via intraperitonial, foi realizado o teste biológico desse produto, na forma de nanopartículas, administradas por via oral.

Conforme pode ser verificado na representação gráfica desse ensaio (Figura 45), as nanopartículas apresentaram ação anticoagulante quando administradas por via oral, a qual se manteve durante todo o período em que o teste foi realizado

(24 horas). Esses resultados podem ser justificados por três diferentes hipóteses: (a) absorção das nanoesferas pelos enterócitos (DESAI *et al*., 1996), com a posterior hidrólise enzimática sistêmica do conjugado de heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático); (b) absorção dessas nanopartículas pelas células do intestino delgado, com o próprio conjugado mantendo a sua atividade anticoagulante na corrente sangüínea; e (c) hidrólise do pró-fármaco em condições colônicas, permitindo a absorção da heparina livre nessa região distal do TGI.

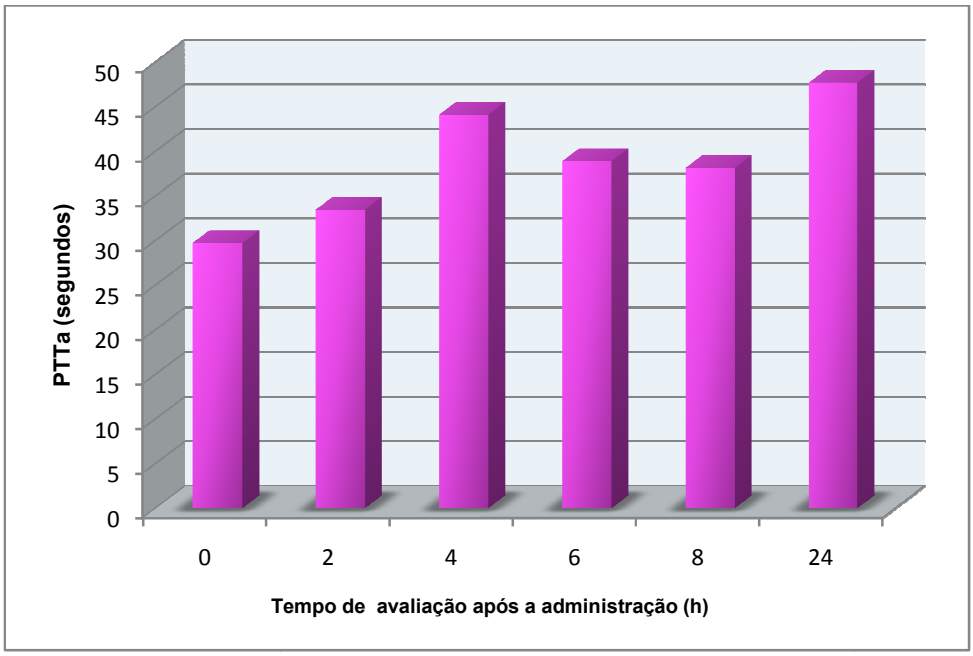


FIGURA 49 – Representação gráfica da ação anticoagulante das nanopartículas elaboradas com o complexo heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) após a administração oral

De acordo com a literatura, a heparina apresenta um pico plasmático rápido e uma meia-vida curta, quando da administração endovenosa (KIM *et al*., 2005). Porém, a conjugação da heparina com o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático) conduziu a uma modificação desse comportamento, que nas condições de administração por via oral, resultou na obtenção de uma forma farmacêutica de liberação modificada, do tipo prolongada.

Lee, Kim e Byun (2000), com o intuito de desenvolver uma nova estratégia para a absorção oral da heparina, propuseram a reação desse fármaco com ácidos biliares, como o ácido deoxicólico. Uma das justificativas estabelecidas por esses autores para a maior absorção da heparina foi que o conjugado revelou um caráter

menos hidrofílico, com uma melhor permeabilidade através da membrana celular dos enterócitos.

De forma similar, outros autores obtiveram êxito em produzir derivados de heparina de baixa massa molar conjugados com o ácido deoxicólico (KIM *et al*., 2005; LEE *et al*., 2001) ou por meio da complexação desse tipo de heparina com um derivado do ácido deoxicólico, a deoxicolietilamina (LEE *et al*., 2007).

Entretanto, esses trabalhos relataram que o pico de ação ocorreu após 1 hora da administração, o que difere dos resultados encontrados no presente estudo, no qual foi verificado o início da ação após 2 horas da administração das nanoesferas, com a manutenção do efeito por 24 horas.

Dessa forma, considerando o conjunto de resultados discutidos para as nanoesferas de heparina-*α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), especialmente a manutenção da atividade biológica *in vivo*, é possível propor que essas partículas têm emprego promissor como sistema de liberação modificada desse fármaco anticoagulante.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, a proposta de síntese de poliésteres a partir do ácido lático foi concretizada, por meio da obtenção de três polímeros de poli(ácido lático) com grupos terminais diferentes, o *α*-hidroxi-*ω*-carboxi-poli(ácido lático), o *α*,*ω*-di-carboxi-poli(ácido lático) e o *α*,*ω*-di-hidroxi-poli(ácido lático). Esses materiais variaram de aspecto físico, revelando uma baixa massa molar, mesmo em presença de catalisador.

Esses materiais se mostraram adequados como matrizes oligoméricas para a encapsulação da heparina, por meio do método de emulsão múltipla e evaporação do solvente, o que conduziu à formação de micro e nanopartículas de poli(ácido lático) contendo esse anticoagulante. Foi possível observar que a utilização do poli(álcool vinílico) com massa molar entre 13.000 e 26.000 $g.mol^{-1}$, em concentrações elevadas, foi um fator determinante para a redução do tamanho das partículas poliméricas. Dessa forma, esse estabilizante se mostrou essencial para a produção de nanocápsulas isoladas, com formato esférico e aspecto homogêneo.

Essas nanopartículas, quando administradas por via oral, permitiram a absorção da heparina, sendo que o efeito anticoagulante foi efetivamente mantido por um período de 6 horas.

Também, foi sintetizado com êxito um novo polímero resultante da conjugação da heparina com o poli(ácido lático), a partir da provável formação de grupamentos amida e/ou éster. Esse conjugado, diferente da heparina, foi solúvel em acetona, o que possibilitou sua utilização na produção de nanopartículas por meio do método de nanoprecipitação. Esse procedimento foi notadamente mais simples de execução e seu emprego resultou na formação de nanoesferas constituídas pelo conjugado heparina-poli(ácido lático). Os testes de coagulação realizados a partir desse produto, após a administração por via intraperitoneal, comprovaram a manutenção do efeito terapêutico da heparina. O conjugado administrado por via oral, apresentou atividade anticoagulante por um período de 24 horas, ficando evidente a sua ação prolongada.

Dessa forma, o presente trabalho atingiu, com sucesso, os objetivos propostos de síntese e de caracterização das matrizes poliméricas derivadas do ácido lático e das nanopartículas contendo heparina, sendo que esses materiais

nanoestruturados podem ser considerados como estratégias farmacoterapêuticas viáveis e promissoras para a administração oral desse anticoagulante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. **Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 365- 380, 1992.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.

AJIOKA, I; ENOMOTO, K.; SUZUKI, K.; YAMAGUCHI, A. The basic properties of poly(lactic acid) produced by the direct polycondensation of lactic acid. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, v. 3, p. 225-234, 1995.

ALLÉMANN, E., LEROUX, J-C.; GURNY, R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. **Advanced Drug Delivery Reviews** n.34, p.171-189, 1998.

American Society for testing and materials. **Standard test methods for testing polyurethane raw materials: determination of number of polyols**. ASTM designation: 4274-94

ANDREOPOULOS, A.G., HATZI, E.C.; DOXASTAKIS, M. Controlled released of salicylic acid from poly(D,L-lactide). **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.12, n.3, p.233-239, 2001.

ANDREOPOULOS, A.G., HATZI, E.C.; DOXASTAKIS, M. Synthesis and properties of poli(lactic acid). **Journal of Materials Science: Materials in Medice**, v.10, n.1, p.22-33, 1999.

ARSHADY, R. **Microspheres, Microcapsules and Liposomes**. London: Citrus Books, 1999.

ASHAN, F.; RIVAS, I.P. KHAN, M.A.; SUÁREZ, A.I.T. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers – liposomes and microspheres – on the phagocytosis by macrophages. **Journal of Controlled Release**, v.79, p.29-40, 2002.

BACHTSI, A. R.; KIPARISSIDES, C. Synthesis and Release Studies of Oil-Containing Poly(vinyl alcohol) Microcapsules Prepared by Coacervation. **Journal of Controlled Release**, v. 38, p. 49-58, 1996.

BAIN, B. Blood Coagulation, Fibrinolysis and Their Disorders. In: WICKRAMASINGUE, S.N. **Blood and Bone Marrrow**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1986. p.317-338.

BAUGHMAN, R.A., KAPOOR, S.C., AGARWAL, R.K., KISICKI, J., CATELLA-LAWSON F.; FITZGERALD, G.A. Oral delivery of anticoagulant doses of heparin a randomized, double blind, controlled study in humans. **Circulation**, v.98, p. 1610-1615, 1998.

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; FREDDO, R. J.; MICHALOWSKI, C. B.; BARCELLOS, I.; FUNCK, J. A.B. Nanoparticles Containing Dexamethasone: Physicochemical Properties and Anti-Inflammatory Activity. **Acta Farm. Bonaerense**, v. **22, n.**1,:p. 11-5, 2003.

BILATI, U; ALLÉMANN,E; DOELKER,E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 67-75, 2005.

BIRNBAUM, D.T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticle drug delivery systems, In: BROWN, D.M. **Drug delivery systems in cancer therapy**. Totowa: Humana Press, p.117-135, 2003.

BITHELL, T.C. Blood Coagulation. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe´s Clinical Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.566-615

BLANCO, M.; BENEYTO, R.; CASTILLO, M.; PORCEL, M. Analytical control of an esterification batch reaction between gkycerine and fatty acids by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta,** v. 521, p.143-148, 2004.

BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in controlled drug delivery. **Medical Plastics and Biomaterials Magazine**, v.4, p.34-44, 1997.

BREUNING, M.; BAUER, S.; GOEPFERICH, A. Polymer and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, n. 58, p. 112-128, 2008.

BRIGER, I., DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in câncer terapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.54, p.631-651, 2002

BRITO, N, M.; AMARANTE JR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, 2003.

BRUNTON, L.; LAZO, J. S.; PARKER, K.L.; **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2006.

CAI, Q.; WAN, Y.; BEI, J.; WANG, S. Synthesis and characterization of biodegradable polylactide-grafted dextran and its application as compatilizer. **Biomaterial**, v.24, p.3555-3562, 2003.

CHEN, G.; KIM, H.; KIM, E.; YOON, J. Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactic acid through the direct condensation polymerization of lactic acid in bulk state. **European Polymer Journal**, v.42, p.468-472, 2006

CHEN, G. Q.; WU, Q., The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v.26, p. 6565–6578, 2005.

CHHABRA, S., SACHDEVA, V.; SINGH, S. Influence of end groups on in vivo release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 342, p. p. 72-77, 2007

COUVREUR, P., BLANCO-PIETRO,M.J., PUISIEUX, F., ROQUES, B., FATTAL, E. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.28, p.85-96, 1997.

CURRIE, L.A.; SVEHLA, G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. **Pure & Applied. Chemistry**, v.66, n.3, p.595-908, 1994.

D´AMICO, E. A.; VILLAÇA, P.R. Fisiologia da Hemostasia. In: LORENZI, T.F. **Atlas de Hematologia:** Clínica Hematológica Ilustrada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.139-163.

DAILEY, L.A; KISSEL, T. New poli(lactic-*co*-glycolic acid) derivatives: modular polymers with tailored properties. **Drug Delivery/Formulation and Nanotechnology**, v.2, p.7-13, 2005.

DELIE, F.; BERTON, M.; ALLÉMANN, E.; GURNY, R. Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly(D,L-lactic acid) particles. International Journal of Pharmaceutics, v.214, p. 25-30, 2001.

DESAI, M.; LABHASETWAR, V.; AMIDON, G.; LEVY, R. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. **Pharmaceutical** Research, v. 13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.

DING, H.; WU, F.; HUANG, Y; ZHANG, Z.; NIE, Y. Synthesis and characterization of temperature-responsive copolymer of PELGA modified poly(N-isopropyllacrylamide). **Polymer**, p. 1-9, article in press, 2006.

DRUMOND, W.S.; WANG, S.H. Síntese e caracterização do copolímeros poli(ácido lático-*b*-glicol etilênico). **Polímeros:** Ciência e Tecnologia, v.14, n.2, p.74-79, 2004.

EDLUND, U; ALBERTSSON, A.C. Polyesters based on diacid monomers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p.585-609, 2003.

FARAGO, P.V.; RAFFIN,R.P.; POHLMANN, R.P.; GUTERRES, S.S.; ZAWADZKI, S.F. Physicochemical Characterization of a Hydrophilic Model Drug-Loaded PHBV Microparticles Obtained by the Double Emulsion/Solvent Evaporation Technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p.1298-1305, 2008.

FECZKÓ, T.; TÓTH, J.; GYENIS, J. Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 2007, article in press.

FESSY, H; PUSIEUX, F; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. International Journal of Pharmaceuticals, v.55, 1989.

FLORENCE, A., HILLERY, A.M, HUSSAIN, N; JANI, P.U. Nanpoarticles as carriers for oral peptide absorption: studies particle uptake and fate. **Journal of Controller Release**, v.36, p.39-46, 1995.

FLORENCE, A.T. Nanoparticles uptake by the oral route: Fulfilling its potential? **Drug Delyvery Today: Technologies**, v. 2, p.75-80, 2005

FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.282, n.1-2, p.1-18, 2004.

FREITAS, S.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviwing the state of art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313-332, 2005.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H; DOELKER, E.;. Physicochemical parameters associated with nanoparticles formation in the salting-

out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1429-1439, 2004.

GONZE, M.; MANORD, J.D.; LEONE-BAY, A.; BAUGHMAN, R.A.; GARRARD, C.L.; STERNBERGH, W.C. & MONEY, S.R. Orally administered heparin for preventing deep venous thrombosis. **The American Journal of Surgery** v.176, p.176-178, 1998.

GRANT, A.C.; LINHARDT, R.J. FITZGERALD, L. G.; PARK, J.J.; LANGER, R. Metachromatic activity of heparin and heparin fragments. **Analytical Biochemistry**, v.137, p.25-32, 1984.

HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science,** v.6, p.319-327, 2002.

HEIKKA, R. A.; IMMONEN, K.T.; MINKKINEN, P.O.; PAATERI, E.Y.O.; SALMI, T.O. Determination of acid value, hydroxyl value and water content in reactions between dicarboxylic acids and diols using near-infrared spectroscopy and non-linear partial least regression. **Analytica Chimica Acta**, v.349, p.287-294, 1997.

HIEBERT, L.M.; WICE, S. M; PING, T. Increased plasma anti-Xa activity and recovery of heparin from urine suggest absorption of orally administered unfractionated heparin in human subjects. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v.145, p.151-155, 2005.

HIEBERT, L.M.; WICE, S. M.; PING, T. Tissue distribution of the low molecular weight heparin, tinzaparin, following administration to rats by the oral route. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p.372-380, 2004.

HIRSJARVI, S., PELTONEN, L., HIRVONEN, J. Surface pressure measurements in particle interaction and stability studies of poly(lactic acid) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceuticals**, article in press, 2007.

HOFFART, V.; LAMPRECHET, A.; MAINCENT, P.; LECOMPTE, T.; VIGNERON, C.; ULBRICH, N. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. **Journal of Controlled Release**, n. 113, p. 38-42, 2006

HUANG, M., LI, S; VERT, M. Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of e-caprolactone and DL-lactide. **Polymer**, v.45, p.8675-8681, 2004.

HYON, S.; JAMSHIDI, K.; IKADA, Y. Synthesis of polilactides with different molecular weight. **Biomaterials**, v.18, p.1503-1508, 1997.

International Conference on Harmonisation "Validation of Analytical Procedures: text and methodology", ICH, London, p. 1-10, 1996.

ITO, Y., KUSAWAKE, T., RAMA PRASAD, Y.V., SUGIOKA, N., SHIBATA, N., TAKADA, K. Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for *in vitro* and *in vivo* studies. **International Journal of Pharmaceuticals** v.317, p. 114-119, 2006.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Eletronic Version. Disponível em: http://goldbook.iupac.org/C01116.html . Acesso em junho de 2008.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, n. 21, p. 2475-2490, 2000.

JIAO, Y.; UBRICH, N.; MARCHAND-AVIER, M.; VIGNERON, C.; HOFFMAN, M.; LECOMPTE, T.; MAINCENT, P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. **Circulation**, v.105, p.230-235, 2002.

JOBE, M. I. Mechanisms of Coagulation. In: STIENE-MARTIN, E.A.; LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; KOEPKE, J.A. **Clinical Hematology**: principles, procedures, correlations. Philadelphia: Lippincott, 1998. p. 612-634.

JONG, S.J., ARIAS, E.R., RIJKERS, D.T.S., NOSTRUM, C.F.V., BOSH, J.J.K.B.; HENNINK, W.E. New insights into the hydrolytic degradation os poly(lacic acid): participation of alcohol terminus. **Polymer**, v. 42, p. 2795-2802, 2001.

JUNG, T.; BREITENBACH, A.; KAISERLING, E.; XIAO, J.X.; KISSEL, T. biodegradable nanoparticles for oral delivery of pepitides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? **European Journal of Pharmaceuticals and Boipharmaceutics**, v.50, p.147-160, 2000.

KELLER, B.C. Liposomes in nutrition. **Trends in Food & Technology**, v.12, p.25-31, 2001.

KEMPER, M.S.; MCCARTHY, J.W.; NUNN, N. S; LOWRY, S. R. The use of fourrier transform near-infrared spectroscopy of measure hydroxyl value, acid number and other parameters important to polyol production. **Thermo Nicolet Industrial Solutions Note**, 2001.

KIM, S. K.; VAISHALI, B.; LEE, E.; LEE, S.; LEE, Y.; KUMAR, T.S.; MOON, H.T. & BYUN, Y. Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. **Thrombosis Research**, *in press***,** 2005**.**

KONAN, Y.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanopartiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, p. 239-252, 2002.

KÖSE, G.T.; KORKUSUK, F.; OZKUL, A.; SOYSAL, Y.; OZDEMIR, T.; YILDIZ, C.; HASIRCI, V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. **Biomaterials**, v. 26, n. 25, p. 5187-5197.

KRANZ, H. & BODMEIER, R. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics** v.332, p.107-114, 2007.

KUMAR, N.R.K. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v.3, n.2, p.134-258, 2000.

LAFFAN, M.A.; BRADSHAW, A.E. Investigation of haemostasis. In: DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**, 8th ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1985, p.297-315.

LAM, L. H.; SILBERT, J.E.; ROSENBERG, R.D. The separation active and inactive forms of heparin. **Biochemical And Biophysical Research Communications** B, v.69, n.2, p.570-577, 1976.

LAMPRECHT, A.; ULBRICH, N.; MAINCENT, P.; Oral molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. **European Journal of Pharmaceuticals and Boipharmaceutics**, v. 67, p.632-638, 2007.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, n. 392 p. 5-10, 1998.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W. & LUKENS, J.N. **Wintrobe´s clinical hematology.** Philadelphia: Lee & Febiger, 1993.

LEE, S.H., ZHANG, Z.; FENG, S.S. Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyrthylene (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery. **Biomaterials**, v.28, p.2041-2050, 2007.

LEE, S.H., KIM, S.H., HAN, Y.K.; KIM, Y.H. Synthesis and degradation of end-group-functionalized polylactide. **Journal of Polymer Science: part A:** Polymer Chemistry, v.39, p. 973-985, 2001.

LEE; Y.K.; KIM, S.H.; BYUN, Y. Oral Delivery of new heparin derivatives in rts. **Pharmaceutical Research**, v.17, n. 10, p. 1259-1264, 2000.

LEE, T.W.; ROBINSON, J.R. Controlled-release drug-delivery systems. In: GENNARO, A.R. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins, 2000, p.903-929.

LEIVA, A.; GARGALLO, A.; GONZÁLEZ, E.; ARANEDA, E.; RADIC, D. Biodegradable poly(DL-Lactide)/poly(caprolactone) mixtures: miscibility at the air/ water interface. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 316-321, 2006.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharides-decoated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.327-341, 2004.

LEMOINE, D.; PRÉAT, V. Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza vírus glycoproteins. **Journal of Controlled Release**, v. 54, p. 15-27, 1998.

LOTSPEICH-STEININGER, C.A. Introduction To Hemostasis In STIENE-MARTIN, E.A.; LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; KOEPKE, J.A. **Clinical Hematology**: principles, procedures, correlations. Philadelphia: Lippincott, 1998. p.599-611.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**, 1 ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais LTDA, 2001.

MANO; E. B.; DIAS, M.L. **Química experimental de polímeros**. 1 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2005.

MARCOS-FERNANDEZ, A.; ABRAHAM, G.A.; VALENTÍN, J.L.;SAN ROMAN, J. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester-urethane-urea)s based on poly(e-caprolactone) and amino acid derivatives. **Polymer**, v. 47, p.785-798, 2006.

MIDDELDORP, S. Heparin: From Animal Organ Extract to Designer **Drug Thrombosis Research**, 2007, *article in press.*

MARENGO, E.; BOBBA, M.; ROBOTTI, E; LENTI, M. Hydroxyl and acid number prediction in polyesters resins by near infrared spectroscopy and artificial neural networks. **Analytica Chimica Acta**, v.511, p 313-322, 2004.

MCKENZIE, S. **Textbook of hematology**. 2 ed. Texas: Williams & Wilkins, 1996.

MOINARD-CHÉCOT, D., CHEVALIER, Y, BRIANÇON, S., BENEY, L., FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 317, p. 458-468, 2008.

MONEY,S.; YORK, J.W. Development of oral heparin therapy for prophylaxis and treatment of deep venous thrombosis. **Cardiovascular Surgery** v.9, p.211-218, 2001.

MOON, S.; LEE, C.W.; TANIGUCHI, I.; MIYAMOTO, M.; KMURA, Y. Melt/solid polycondensation of L-lactic acid: an alternative route to poly(L-lactic acid) with high molecular weight. **Polymer**, v.42, p. 5059-5062, 2001a.

MOON, S.; TANIGUCHI, I.; MIYAMOTO, M.; KMURA, Y.; LEE, C.W. Synthesis and properties of high molecular weight poly(L-lactic acid) by melt/solid polycondensation under different reaction conditions. **High Perform Polymer**, v.13, p. 189-196, 2001b.

MORISHITA, M.; GOTO, T. PEPPAS, N.A.; JOSEPH, J.I.; TORJMAN, M.C.; MUNSICK, C.; NAKAMURA, K.; YAMAGATA, T.; TAKAYAMA, K. & LOWMANM A.M. Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle size on insulin enteral absorption. **Journal of Controlled Release**, v.97, p.115-124, 2004.

MOTLEKAR, N.A.; YOUAN, B.C. The quest for non-invasive delivery of bioactive macromolecules:A focus on heparins. **Journal of Controlled Release**, n.113, p. 91–101, 2006.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese e caracterização do copolímero poli (L-co-D,L Ácido Láctico). **Polímeros:** Ciência e Tecnologia, v. 16, n.1, p.26-32, 2006.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação "*in vitro*" do poli (L- Ácido Láctico). **Polímeros**, v. 17, n.2, p.123-129, 2007.

NAMUR, J.A.M.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.M.; QUINTILIO, W.; SANTANA, M.H.A.; POLITI, M.J.; ARAÚJO, P.S.; LOPES, A.C.; COSTA, M.H.B. Poly-lactide-co-glycolide microparticle sizes: A rational factorial design and surfacee response analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, p.2403-2407,2006.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angew Chem. Inst. Ed. Engl**,. v. 17, n.7, 1978.

NORI, A.; KOPECEK, J. Intracellular targeting of polymer-boud drugs for cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.609-636, 2005.

OLIVEIRA, R.B.; LIMA, E.M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.1, p.29-35, 2006.

OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke´s Analysis of Drugs and Poisons**. 3. ed. Pharmaceutical press, v.1, 2004.

PANYAN, J. & LABHASTWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene

PANZERI, H. *et al*. Avaliação de parâmetros físico-químicos de géis e pastas dentais. **Odontólogo Moderno**, v.5, p.4-10, 1979.

PAULA,J.P.; FARAGO,P.V.; BINHARA, P.B; SILVA, S.A;.ZAWADZKI, S.F. Determination of hydroxyl number in aliphatic polyesters and polyethers using a colorimetric method. **Polymer Testing**, n.27, p. 675–678, 2008.

PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L.F., **Purification of laboratory chemicals**. 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1988.

PINEO, G.; HULL, R. & MARDER, V. oral delivery of heparin: SNAC and related formulation. **Best Practice & Research Clinical Haematology** v.17, p.153-160, 2004.

POSTMA, A.; DAVIS, T.P.; DONAVANM A.R.; LI, G.; MOAD, G.; MULDER, R. & O´SHEA, M.S. A simple method for determining protic end-froups of synthetic polymers by ^{1}H NMR spectroscopy. **Polymer** v.47, p.1899-1911, 2006.

PREGO, C.; GARCIA, M.; TORRES, D.; ALONSO, M.J. Transmucosal macromolecular drug delivery. **Journal of Controlled Release** v.101, p.151-162, 2005.

PROIKAKIS, C.S., MAMOUZELOS, N.J., TARANTILI, P.A.; ANDREOPOULOS, A.G. Sweelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid in aqueous solutions. **Polymer Degradation and Stability**, n.91, p.614-619, 2006.

QUINTANAR-GUERRERO, D. ALLÉMANN, E. FESSI, H. DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Dev. Ind. Pharm**, n. 24, p. 1113-1128, 1998.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1990.

SADEGHI, G. M. M.; BARIKANI, J.M. Detrmination of OH-number and functinality of polybutadiene-ol by FTIR and NMR spectroscopy. **Polymer Testing** v. 22, p. 165-168, 2003.

SAHOO, S.K., PANYAM, J., PRABHA, S., LABHASSETWAR, V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (d-l- lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. **Journal of Controlled Release**, v.82, p.105-114, 2002.

SAKUMA, S., HAYASHI, M.; AKASHI, M. Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.47, p.21-37, 2001.

SAVILLE, M; BROWN, V. Clinical aspects of coagulation. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 6, n. 8, p. 234-238, 2007.

SCHOLES, P.D., COOMBES, A.G.A., ILLUM, L., DAVIS, S.S., VERT, M., DAVIES, M.C. The preparation of sub-200nm poly(lactide-co-glycolide) microsphere for site-specific drug delivery**. Journal of Controlled Release** v.25, p.145-153, 1993.

SIEPMANN, J.; FAISANT, N.; AKIKI,J.; RICHARD, J.; BENOIT, J.P. Effect of the size of biodegradable microparticles ondrug release: experiment and theory. **Journal of Controlled Release**, n.96, p.123-134, 2004.

SHEEHAN, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. **Journal of American Chemical Society**, v 77, p. 1067–1068, 1955.

SILVA, P.H. & HASHIMOTO, Y. **Coagulação:** visão laboratorial da hemostasia primária e secundária. 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

SODERGARD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, v.27, p.1123-1163, 2002.

SONG, C.X., LABHASETWAR, V., MURPHY, H., QU, X., HUMPHREY, W.R., SHEBUSKI, R.J.; LEVY, R.J. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.43, p.197-212, 1997.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p.1-20, 2001.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

STIENE-MARTIN, E.A.; LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; KOEPKE, J.A. **Clinical Hematology**: principles, procedures, correlations. Philadelphia: Lippincott, 1998.

SUN, H.; MWI, L.; SONG, C.; CUI, X.; WANG, P. The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, v.27, p. 1735-1740, 2006.

TERSKI, V.; MATZINOS, P.; PAVLIDOU, E. VACHILIOTIS, D.; PANAYIOTOU,C. Biodegaradable aliphatic polyesers. Part I. Properties and biodegradatin of poly (butylene-*co*-butylene adipate). **Polymer Degradation and Stability**, v.91, p. 367-376, 2006.

TOBÍO, M.; SÁNCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, J.; EVORA, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.18, p.315-323, 2000.

United States Pharmacopeial Convention (2005) "The United States Pharmacopoeia", 28th ed., Convention Center, Rockville, on CD-ROM Version.

VILA, A., SÁNCHEZ, M., TOBÍO, M., CALVO,P. & ALONSO, M.J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controller Release** v.78, p.15-24, 2002.

WIGGINS, J.S; HASSAN, M. K.; MAURITZ, K. A, STOREY, R.F. Hydrolytic degradation of poly(D,L-lactide) as a function of end group: Carboxylic acid vs. hydroxyl. **Polymer**, v.47, p.1960-1969, 2006.

XING, J., ZHANG, D. & TAN, T. Studies on the oridonin-loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p.153-158, 2007.

YAO, F., BAI, Y., CHEN, W., AN, X., YAO, K., SUN, P.; LIN, H. Synthesis and characterization of functional L-lactic acid/citric acid oligomer. **European Polymer Journal**, v.40, p. 1895-1901, 2004.

YILDIZ, A.; OKYAR, A.; BAKTIR, G.; ARAMAN, A.; ÖZSOY, Y. Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly(lactic acid). **Il Farmaco**, v. 60, p. 919–924, 2005.

ZAMBAUX, M.F., BONNEAUX, F., GREF, R., MAINCENT, P., DELLACHERIE, E., ALONSO, M.J., LABRUDE, L.; VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, v.50, p.31-40, 1998.

ZHANG, Z.; FENG, S.S. Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: synthesis, formulation, characterization and *in vitro* drug release. **Biomaterials**, n.27, p. 262-270, 2000.