UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas
de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao
tratamento da trombose venosa profunda**

Samantha Sant' Anna Marotta de Oliveira

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas de
heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da
trombose venosa profunda**

Samantha Sant' Anna Marotta de Oliveira

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas de
heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da
trombose venosa profunda**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Samantha Sant' Anna Marotta de
Oliveira.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Maldonado
Marchetti.

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Samantha Sant' Anna Marotta de.

Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda. Ribeirão Preto, 2009.

82 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Sistemas de liberação de fármacos. 2. Micropartículas poliméricas. 3. Heparina fracionada. 4. PLGA. 5. Dupla emulsificação e evaporação do solvente.

Samantha Sant' Anna Marotta de Oliveira

Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado
Marchetti.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti, pela orientação, dedicação, confiança, amizade, exemplo profissional e contribuição científica ao longo da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho, da Universidade Federal de Juiz de Fora, quem me incentivou a vir para a USP para a realização desta importante etapa da minha vida. Agradeço também ao exemplo profissional, amizade, “puxões de orelha” nas horas certas e por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa.

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo auxílio na metodologia analítica por CLAE, pela participação e contribuição em meu exame de qualificação, pela orientação no estágio supervisionado em docência, e pela grande experiência que adquiri durante sua disciplina da pós-graduação. Desde então, os artigos científicos foram estudados com um olhar muito mais crítico e objetivo.

À Profa. Dra. Ivone de Carvalho, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela disponibilização do aparelho de CLAE com detector por refração, e ao Luiz Otávio, técnico do laboratório de química farmacêutica, pelo auxílio durante as análises.

À Dra. Fabiana de Souza Oliveira, pós-doutoranda do laboratório de tecnologia farmacêutica, que tanto contribuiu com suas idéias, sugestões, críticas etc. Também pela amizade e pelo auxílio na revisão desta dissertação.

À Dra. Juliana Saraiva, pós-doutoranda do laboratório de tecnologia farmacêutica, pela amizade, contribuição e pelo companheirismo nas inusitadas viagens à UFSCar, em busca de uma boa microscopia eletrônica de varredura.

Ao farmacêutico José Orestes Del Ciampo, do laboratório de tecnologia farmacêutica, pela contribuição e pelas análises de tamanho das partículas no analisador de partículas por difusão a laser Beckman Coulter. À MSc. Fabíola Garcia, especialista de laboratório, e ao biólogo Henrique Diniz, pela amizade e por todas as contribuições diretas e indiretas ao meu trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Silva, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos, colegas e agregados do laboratório de tecnologia farmacêutica, pelo empenho de cada um em manter um ambiente de trabalho muito agradável. Aos companheiros Marina, Gilsane, Fábila, Aline, Lívia, Letícia, Dani, Alyne, Renata, Fernando Armani e todos que estiveram nesta jornada compartilhando os momentos difíceis e outros tantos agradáveis, muito obrigada!

Às instituições de fomento CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

À Kin Master Produtos Químicos Ltda. pelo fornecimento da enoxaparina sódica utilizada neste trabalho.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, especialmente à Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca, à chefe da seção Rosana Florêncio, às secretárias Ana Lúcia Turatti e Rossana Ribeiro, por terem sido compreensivas e pacientes quando eu precisei e pelo carinho com que sempre me atenderam.

Agradecimentos especiais

Ao Daniel Sabino de Oliveira, meu marido, amor e companheiro de todas as horas. Agradeço toda a dedicação, meus cafezinhos na cama e a luta para me acordar todos os dias e não me deixar perder meus compromissos. Agradeço as noites que foi dormir sozinho sem reclamar porque eu tinha que estudar os intermináveis artigos, os momentos que não me deixou estudar e me levou pra divertir, todas as vezes que nosso doce lar ficou inabitável com minha bagunça “organizada” e não implicou. Agradeço por me ajudar a revisar meus textos e os “pitacos” importantes e até mesmo os impertinentes. Você é parte muito importante desta conquista.

Aos meus pais Sãozinha e Baião pelo amor incondicional, por se empenharem tanto em me proporcionar uma educação de qualidade e por nunca me deixarem desanimar. À minha avó Elza por todo carinho com que me acompanhou, sempre rezando por mim e enchendo de alegria a minha vida. Aos meus irmãos Giuliano e Sarah pela força e companheirismo e que, mesmo distantes, eu sempre pude contar. À minha tia Aparecida que acompanhou todas as etapas não só desta conquista, mas de toda a minha vida. Aos meus sogros Gilberto e Mirinha pelo apoio e incentivo.

A todos os familiares e amigos que sempre torceram por mim.

Obrigada meu Deus, por mais esta conquista.

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais
volta ao seu tamanho original"*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e símbolos.....	vii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	01
1.1. Trombose venosa profunda.....	01
1.2. Tratamento daTVP: fármacos anticoagulantes mais utilizados.....	03
1.2.1. Heparina não fracionada (HNF).....	04
1.2.2. Heparina fracionada (HF).....	06
1.2.3. Varfarina.....	09
1.2.4. Novos anticoagulantes.....	09
1.3. Desenvolvimento de novas terapias.....	10
1.4. Sistemas de liberação de fármacos.....	11
1.4.1. Sistemas microparticulados.....	12
1.4.2. Polímeros como sistemas de liberação.....	14
1.4.2.1. Copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA).....	15
1.5. Turbidimetria e nefelometria.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Material.....	20
3.1.1. Matérias-primas e solventes.....	20
3.1.2. Colunas cromatográficas e colunas de guarda.....	20
3.2. Métodos e equipamentos.....	21
3.2.1. Análise da enoxaparina sódica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	21
3.2.2. Análise da enoxaparina sódica por turbidimetria.....	22
3.2.2.1. Validação do método analítico.....	23
3.2.3. Obtenção das micropartículas de PLGA.....	25
3.2.3.1. Rendimento do processo.....	29

3.2.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação.....	29
3.2.4. Caracterização morfológica das partículas.....	30
3.2.4.1. Microscopia Óptica.....	30
3.2.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30
3.2.4.3. Análise do tamanho e distribuição de tamanhos das partículas.....	31
3.2.5. Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de liberação.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Metodologia analítica para a quantificação da enoxaparina sódica.....	34
4.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	34
4.1.2. Método turbidimétrico.....	43
4.1.2.1. Validação do método.....	45
4.2. Obtenção das micropartículas.....	52
4.3. Caracterização morfológica das partículas.....	57
4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
4.3.2. Análise do tamanho e da distribuição de tamanho das partículas.....	59
4.3.3. Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de liberação.....	62
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

OLIVEIRA, S.S.M. **Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda.** 2009. 98f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A trombose venosa profunda (TVP) é uma patologia grave de alta incidência mundial. Quando não diagnosticada precocemente e tratada adequadamente pode evoluir causando sérias complicações, como a embolia pulmonar e insuficiência venosa crônica, as quais são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade. Seu tratamento utiliza terapia com anticoagulantes pelas vias parenteral e oral (para manutenção) que estão associadas a prejuízos bem documentados limitando seu uso, além de resultar em baixa adesão do paciente ao tratamento. Os sistemas de liberação modificada de fármacos, tais como as micropartículas poliméricas, representam uma grande área em desenvolvimento, a qual tem recebido atenção de pesquisadores e indústrias de todo o mundo e recebido investimentos crescentes nas últimas três décadas. As micropartículas poliméricas possuem grande estabilidade, capacidade industrial e possibilitam ajustes para alcançar o perfil de liberação adequado e/ou o direcionamento para determinado sítio de ação. O estudo teve início com o desenvolvimento e validação do método analítico para a quantificação da enoxaparina sódica. A turbidimetria foi a técnica de escolha, pois os resultados utilizando CLAE não foram satisfatórios. Este estudo teve como objetivo a obtenção e caracterização físico-química de um sistema de liberação microparticulado para veiculação de uma heparina fracionada (HF), a enoxaparina sódica, muito utilizada no tratamento da TVP, visando um aumento da biodisponibilidade do fármaco com controle da sua biodistribuição. As micropartículas contendo a enoxaparina sódica foram preparadas utilizando o copolímero dos ácidos láctico e glicólico (50:50) (PLGA), biodegradável, através do método da dupla emulsificação/ evaporação do solvente. As partículas obtidas foram caracterizadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e apresentaram forma esférica com superfície lisa e regular. As análises do tamanho e distribuição dos tamanhos de partícula foram realizadas por dispersão de luz laser e apresentaram perfil monomodal para a maioria das formulações. O perfil de liberação *in vitro* do fármaco encapsulado foi avaliado por 35 dias e apresentou cinética de liberação de pseudo ordem zero, modelo de Higuchi (1961), indicando que a difusão foi o principal mecanismo de liberação. A velocidade de degradação das micropartículas é, através da difusão do fármaco, um parâmetro muito importante e determinante da liberação *in vivo*.

Palavras-chave: sistemas de liberação de fármacos; micropartículas poliméricas; heparina fracionada; PLGA; dupla emulsificação e evaporação do solvente.

ABSTRACT

OLIVEIRA, S.S.M. **Preparation and *in vitro* characterization of microparticles containing fractionated heparin potentially applicable to treatment of deep vein thrombosis.** 2009. 98f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Deep vein thrombosis (DVT) is a severe disease with high incidence worldwide. When it is not early diagnosed and properly treated it can develop and to cause serious complications, such as pulmonary embolism and chronic venous insufficiency, which are responsible for high morbidity and mortality rates. The treatment of DVT is accomplished with parenteral and oral (for maintenance) anticoagulants. They are associated to damage well documented that limit their use resulting in poor adherence of patients to treatment. Drug delivery systems, such as polymeric microparticles, represent a significant development area. It has received attention of researchers and industries around the world and increased investments in last three decades. The polymeric microparticles have great stability, industrial capacity and they allow adjustments to achieve the suitable release profile and / or direction for a particular site of action. The study started with development and validation from the analytical method to quantification of enoxaparin sodium. Turbidimetric technique was used because the results by HPLC were not satisfactory. The aim of this work was the preparation and physical-chemical characterization of a microparticle release system for delivery of a fractionated heparin (FH), enoxaparin sodium, widely used to the treatment of DVT to increase the drug bioavailability and control their biodistribution. The microparticles containing enoxaparin sodium were prepared from a biodegradable polymer poly (lactic-co-glycolic acid) (50:50) (PLGA) using double emulsification / evaporation of the solvent method. The particles obtained were characterized by scanning electron microscopy technique (SEM) and showed spherical shape with smooth and regular surface. The analysis of the size and distribution of particle sizes were performed by scattering of laser light and showed unimodal profile for the most of formulations. *In vitro* drug release profile from the microparticles was evaluated in 35 days showing pseudo zero order kinetics, Higuchi model (1961). This indicated that main mechanism of drug release was diffusion.

Keywords: drug delivery system, polymeric microparticles, fractionated heparin, PLGA; double emulsification/solvent evaporation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural da heparina.....	04
Figura 2.	Mecanismos de ação de (A) heparina não fracionada e (B) heparina fracionada.....	07
Figura 3.	Representação esquemática: (A) micro/ nanoesfera; (B) micro/ nanocápsula.....	13
Figura 4.	Estrutura química do PLGA.....	16
Figura 5.	Representação esquemática da técnica de preparação de micropartículas pelo método da dupla emulsificação evaporação do solvente.....	26
Figura 6.	Microscópio eletrônico de varredura (A) e metalizador utilizado para o recobrimento das micropartículas com ouro(B).....	31
Figura 7.	Fotografias de (A) aparelho de dissolutor e (B) saco de diálise contendo as micropartículas, posicionado no interior do dispositivo “sinker” (âncora).....	32
Figura 8.	Cromatograma da análise da enoxaparina 1.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cromatografia de exclusão (Coluna Bio-Gel® SEC 30-XL, fase móvel NaCl 0,1M, temperatura de 40°C, vazão 1 mL min^{-1} , detecção por IR).....	42
Figura 9.	Curva de calibração da enoxaparina sódica em solução aquosa, no intervalo de concentrações de 40,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (leitura em 500 nm).....	44
Figura 10.	Curva de calibração da enoxaparina em solução tampão fosfato salino 10 mM, no intervalo de concentrações de 40,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (leitura em 500 nm).....	44
Figura 11.	Curva de calibração para a análise do intervalo linear da enoxaparina sódica em 290 nm.....	46
Figura 12.	Curva de calibração para a análise do intervalo linear da enoxaparina sódica em 500 nm.....	47

Figura 13.	Fotografias das micropartículas de PLGA contendo enoxaparina sódica, tamanho médio 64,4 µm, obtidas pela formulação 09 (Tabelas 3 e 15). Aumento de 20x (A) e 32x (B).....	53
Figura 14.	Fotomicrografias das micropartículas de PLGA, contendo enoxaparina sódica, obtidas por: (A) formulação 11 (10 KV; aumento de 7.000x); (B) formulação 01 (20KV; aumento de 10.000x); (C) formulação 01 (20 KV; aumento de 5.000x) e (D) formulação 20 (5 KV; aumento de 5.000x).....	58
Figura 15.	Fotomicrografia da enoxaparina sódica: aumento de 500x (5 KV)....	59
Figura 16.	Gráfico da distribuição de tamanho da enoxaparina sódica.....	60
Figura 17.	Gráfico da distribuição de tamanho das partículas de PLGA contendo enoxaparina sódica (formulação 9).....	61
Figura 18.	Gráfico da distribuição de tamanho das partículas de PLGA contendo enoxaparina sódica (formulação 20).....	61
Figura 19.	Perfil de liberação <i>in vitro</i> da enoxaparina sódica (meio tampão fosfato salino pH 7,4, 37°C, 150 rpm, n=5).....	63
Figura 20.	Perfil de liberação <i>in vitro</i> da enoxaparina sódica microencapsulada em PLGA (meio tampão fosfato salino pH 7,4, 37°C, 150 rpm, n=5).....	63
Figura 21.	Cinética de liberação da enoxaparina sódica microencapsulada em PLGA, modelo de Higuchi.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Métodos de obtenção das heparinas fracionadas.....	08
Tabela 2-	Parâmetros avaliados na preparação das micropartículas obtidas a partir do método da emulsão múltipla.....	27
Tabela 3-	Modificações realizadas no processo de preparação de micropartículas de PLGA contendo enoxaparina sódica.....	28
Tabela 4-	Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de par-iônico em coluna Licrospher® RP 18 (5 µm; 125 x 4 mm) e detector UV-Vis (232nm).....	36
Tabela 5-	Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de par-iônico e coluna Purospher star® RP 18e (5 µm; 250 x 4 mm) e detector UV-Vis (232nm).....	38
Tabela 6-	Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de fase reversa e coluna Licrospher® 100 NH ₂ (5 µm; 250 x 4 mm) e detector UV-Vis (232nm).....	39
Tabela 7-	Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de troca iônica em coluna Exsil® SAX (5 µm; 250 x 4,6 mm) e detector UV-Vis (232 nm).....	40
Tabela 8-	Análise da enoxaparina por cromatografia de exclusão utilizando coluna Bio-Gel® SEC 30-XL (300 x 7,8 mm), detector IR e temperatura do forno de 40 ± 0,1 °C.....	41
Tabela 9-	Resultados obtidos nos estudos de avaliação da precisão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando λ=290 nm.....	48
Tabela 10-	Resultados obtidos nos estudos de avaliação da precisão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando λ=500 nm.....	48
Tabela 11-	Resultados obtidos nos estudos de avaliação da exatidão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando λ=290 nm.....	49

Tabela 12-	Resultados obtidos nos estudos de avaliação da exatidão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=500$ nm.....	50
Tabela 13-	Resultados obtidos nos estudos para a avaliação da robustez do método turbidimétrico utilizado para a análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=290$ nm.....	51
Tabela 14-	Resultados obtidos nos estudos para a avaliação da robustez do método turbidimétrico utilizado para a análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=500$ nm.....	51
Tabela 15-	Eficiência de encapsulação, rendimento do processo e tamanho médio das partículas das formulações de micropartículas de PLGA contendo enoxaparina sódica obtidas pela técnica de dupla emulsificação e evaporação do solvente.....	54
Tabela 16-	Principais variáveis do processo de dupla emulsificação evaporação do solvente que podem afetar as características das micropartículas.....	55
Tabela 17-	Parâmetros do processo de dupla emulsão $A_1/O/A_2$ e a influência na eficiência de encapsulação.....	56
Tabela 18-	Parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da enoxaparina sódica à partir das micropartículas de PLGA.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A ₁	fase aquosa interna
A ₂	fase aquosa externa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV	coeficiente de variação
DCM	diclorometano
ENX	enoxaparina sódica
EP	embolia pulmonar
EV	endovenosa (via de administração)
FDA	Food and Drug Administration
O	fase oleosa
HF	heparina fracionada
HNF	heparina não fracionada
IR	índice de refração
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PLA	polímero do ácido láctico
PLG	polímero do ácido glicólico
PLGA	copolímeros dos ácidos láctico e glicólico
RNI	razão normalizada internacional (relacionada ao tempo de trombina)
rpm	rotações por minuto
SAX	coluna de troca iônica forte
SC	subcutânea (via de administração)
TEV	tromboembolismo venoso
T _g	temperatura de transição vítrea
TEV	tromboembolismo venoso
TTPa	tempo de tromboplastina ativado
TVP	trombose venosa profunda
UV-vis	ultravioleta - visível

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A heparina é um polissacarídeo sulfatado usado há mais de 50 anos como fármaco anticoagulante e é indicada para profilaxia e tratamento da trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP). Constitui o segundo fármaco natural mais utilizado no mundo, superado apenas pela insulina. Esse anticoagulante tem as vantagens de ser bastante específico e não produzir alergia, porém, a trombocitopenia é o efeito colateral mais importante (MELO et al., 2008). As heparinas fracionadas (HF), também conhecidas como heparinas de baixa massa molecular ou ainda de baixo peso molecular, têm sido indicadas em inúmeras doenças tromboembólicas por possuírem características como: (i) esquema de administração mais fácil, (ii) relação dose-resposta mais confiável, (iii) não necessita de ajustes de dose e monitoramento laboratorial constantes, (iv) menor incidência de trombocitopenia, (v) menor custo global do tratamento e (vi) possibilidade de tratamento domiciliar (WANNMACHER, 2007).

A incidência mundial da TVP foi estimada em 50 casos por 100.000 habitantes/ano e em 200 casos por 100.000 habitantes em pacientes idosos (FOWKES, F.J.; PRICE; FOWKES, F.G., 2003; WHITE, 2003).

Os esforços realizados para o desenvolvimento de uma terapia oral com a heparina até hoje não resultaram em efeito anticoagulante satisfatório. A administração subcutânea (SC) é uma alternativa menos invasiva que a endovenosa (EV) e permite o desenvolvimento de formulações de liberação prolongada da HF, o que dispensaria sua administração diária.

Os sistemas de liberação sustentada de fármacos têm sido muito pesquisados. As nano/micropartículas são amplamente utilizadas nas áreas farmacêutica e cosmética como veículos para liberação modificada de uma grande variedade de compostos.

1.1. TROMBOSE VENOSA PROFUNDA

A trombose venosa profunda (TVP) é caracterizada pela presença de trombos (coágulos) dentro de uma veia profunda acompanhada de resposta inflamatória na parede vascular (CREAGER; DZAU, 2002).

Depois das veias varicosas, a TVP é a doença venosa mais comum (CREAGER; DZAU, 2002) e sua fisiopatologia está relacionada a três fatores: (i) lesão do epitélio da veia; (ii) hipercoagulabilidade e (iii) estase, caracterizados como “Tríade de Virchow” (CREAGER; DZAU, 2002; LENSING et al., 1999). Os fatores de risco incluem idade acima de 40 anos, neoplasias, cirurgia, imobilização no leito, paraplegia, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, infecção grave, fraturas, pós-parto, paralisia e uso de estrógenos e quimioterapia para câncer. Anomalias trombóticas hereditárias também constituem outro importante fator de risco (ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2005; LENSING et al., 1999; WANNMACHER, 2007).

Habitualmente a TVP é benigna, mas podem ocorrer complicações imediatas ou agudas evoluindo para embolia pulmonar (EP), ou complicações mais tardias como a insuficiência venosa crônica (CREAGER; DZAU, 2002; HANSSON et al., 1997). A TVP associada à EP, sua complicação mais grave, é caracterizada como tromboembolismo venoso (TEV). É responsável por 300.000 a 600.000 hospitalizações anualmente (PEREIRA et al., 2008) e constitui a causa mais comum de mortalidade hospitalar e de morbimortalidade em pacientes cirúrgicos (ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2005; PEREIRA et al., 2008).

A TVP e a EP constituem graves problemas de saúde pública, especialmente em idosos. A TVP pode ocorrer em mais de 50% dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos ortopédicos e em 10 a 40% dos indivíduos submetidos a cirurgias torácicas ou abdominais (CREAGER; DZAU, 2002). A incidência mundial foi estimada em 50 casos por 100.000 pessoas/ano e mostrou-se ligeiramente maior nas mulheres em relação aos homens, aumentando drasticamente com a idade, de 20 a 30 casos por 100.000 pessoas/ano na faixa etária entre 30 e 49 anos para 200 casos por 100.000 pessoas/ano na faixa etária entre 70 e 79 anos (FOWKES; PRICE; FOWKES, 2003; WHITE, 2003). Já a incidência de TEV é de aproximadamente 7 em 10.000 pessoas/ano (SEGAL et al, 2007). Contudo, de acordo com Wannmacher (2007), em seu trabalho publicado pelo Ministério da Saúde e Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde, a incidência da TVP e EP pode atingir 2% da população/ano e a taxa de recorrência pode chegar a 25%.

1.2. TRATAMENTO DA TVP: FÁRMACOS ANTICOAGULANTES MAIS UTILIZADOS

Os medicamentos antitrombóticos abrangem antiplaquetários, anticoagulantes, fibrinolíticos, antagonistas de trombinas, inibidores de receptores IIb-IIIa e inativadores diretos do fator Xa (WANNMACHER, 2007). A anticoagulação é a principal terapia no tratamento da TVP. Os objetivos são impedir a propagação dos trombos e as recorrências imediatas ou tardias, prevenindo conseqüentemente a embolia pulmonar e a insuficiência venosa crônica (BÜLLER et al., 2004; CREAGER; DZAU, 2002).

Os anticoagulantes incluem a heparina não fracionada (HNF), as heparinas fracionadas (HF) e os heparinóides e anticoagulantes orais (WANNMACHER, 2007). De acordo com Büller et al. (2004) o tratamento da TVP pode ser realizado de três formas: (i) HF ajustada ao peso corporal e administrada por via subcutânea (SC), sem necessidade de monitorização; (ii) HNF por via endovenosa (EV) ou (iii) HNF SC, ambas com necessidade de monitorização constante e ajustes de dose.

Habitualmente, quando se diagnostica a TVP aguda, o paciente deve ser hospitalizado, permanecer em repouso e deve ser heparinizado. A dose usual de HNF é 500UI/kg/24 horas, administrada por infusão EV contínua ou em doses divididas, com injeção EV a cada quatro horas (método intermitente), onde a duração do tratamento pode variar de 7 a 14 dias. O tratamento via oral com um cumarínico é iniciado simultaneamente ao uso da heparina; a varfarina sódica, na dose de 5 a 20 mg/dia pode ser administrada até que o tempo da protrombina se eleve 1,5 a 2,5 vezes os tempos de controle. Quando se atinge este valor, a heparina pode ser suspensa e a dose da varfarina deve ser ajustada para o nível de manutenção (COMP, 2003; CREAGER; DZAU, 2002). Entretanto, segundo Büller et al. (2004), não há um consenso sobre o tempo de heparinização e a dose inicial para a varfarina. O paciente deve ser avaliado continuamente a fim de evitar sangramento.

Estudos têm demonstrado que as HFs são tão eficazes quanto as HNFs no tratamento inicial da TVP. Além disso, possuem vantagens como a diminuição do risco de sangramento e a redução dos custos associados ao tempo de hospitalização, havendo a possibilidade da continuidade da terapia no domicílio, já que o paciente não necessitará de monitorização constante (BÜLLER, et al., 2004;

DU BREUIL; UMLAND, 2007; INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT, 2007).

1.2.1. HEPARINA NÃO FRACIONADA (HNF)

A HNF é uma glicosaminoglicana composta de cadeias de resíduos alternados de D-glicosaminoglicana e um ácido urônico, normalmente extraída da mucosa intestinal de suínos e do pulmão bovino (HIRSH; RASCHKE, 2004; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2007; PAGE et al., 1999). Sua molécula é sulfatada, ácida e carregada negativamente, conforme estrutura apresentada na Figura 1.

Figura 1. Fórmula estrutural da heparina.

Fonte: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap01/01_01_06.htm (11/08/2008).

Como resultado do processo de extração, os polissacarídeos são degradados em uma mistura de fragmentos com massas moleculares bem variáveis (5.000 a 30.000 Da), originando uma preparação heterogênea (HIRSH; RASCHKE, 2004; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2007; PAGE et al., 1999). Como o tamanho das cadeias moleculares interfere na atividade e depuração, sua atividade anticoagulante também é variável (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2007; PAGE et al., 1999).

As propriedades anticoagulantes se caracterizam pela neutralização acelerada das proteases séricas XIIa, XIa, IXa, Xa e da trombina pela antitrombina III (AT III) após a ligação com a heparina (HIRSH; RASCHKE, 2004; MULLER;

SCHEIDT, 1994). Sua principal ação terapêutica é devida à ligação específica da AT III ao único pentassacarídeo encontrado na molécula de heparina. Após essa ligação, a AT III sofre uma alteração conformacional aumentando sua capacidade de ligação aos fatores de coagulação intrínsecos e extrínsecos acelerando, deste modo, sua atividade (HIRSH; RASCHKE, 2004; WESSLEN; SANFORD, 1986).

A heparina não é bem absorvida por via oral, sendo administrada por via EV ou SC (MAFFEI, 2002) e suas propriedades farmacocinéticas são complexas. A ligação não específica da HNF às proteínas plasmáticas limita sua quantidade disponível para interagir com a antitrombina em aproximadamente um terço do total administrado (HIRSH, 1991b; HIRSH; RASCHKE, 2004). A rápida degradação pelos macrófagos do fígado e pelas células endoteliais resulta em um “clearance” dose dependente (HIRSH et al., 1995; HIRSH; RASCHKE, 2004; PAGE et al., 1999). Devido a este mecanismo de saturação dose-dependente, sua meia-vida biológica com uma dose EV de 25 UI/Kg é de 30 minutos, atingindo 60 minutos com 100 UI/Kg e 150 minutos com 400 UI/Kg. Sua depuração também ocorre mais lentamente com a cinética de primeira-ordem, especialmente através dos rins (PAGE et al., 1999). Deve-se considerar ainda que nos pacientes portadores de tromboembolismo, a quantidade de heparina ligada às proteínas está sempre aumentada. Portanto, a HNF apresenta uma relação dose-resposta bem variável e uma janela terapêutica estreita (HIRSH, 1991a; HIRSH; RASCHKE, 2004).

A HNF é geralmente administrada em “bolus” de 7500 a 10000 UI, seguida de uma infusão contínua de 1000 a 1500 UI/h (CREAGER; DZAU, 2002), que deve ser ajustada para que o tempo de tromboplastina ativado (TTPa) seja de aproximadamente 1,5 vezes o valor de referência. A faixa terapêutica encontra-se entre 1,5 a 2,5 vezes o valor de referência da TTPa (INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT, 2007).

A HNF pode ocasionar alteração no equilíbrio hemostático e causar sangramento, sua principal complicação, especialmente quando utilizada em doses maiores do que as utilizadas para a profilaxia. Isso explica a necessidade de hospitalização e monitorização laboratorial constante para manter um nível ideal de anticoagulação, a fim de obter um efeito antitrombótico sem aumentar o risco de hemorragia. Em suspeita de trombocitopenia a medicação deve ser suspensa (DU BREUIL; UMLAND, 2007; HIRSH; RASCHKE, 2004; MEFFEI, 2002). A terapia

prolongada, geralmente acima de 3 meses, está associada à incidência de patologias secundárias, como a osteoporose (MEFFEI, 2002).

Assim, a administração EV da heparina possui muitas desvantagens como a necessidade de hospitalização do paciente com monitorização laboratorial constante, a aplicação de injeções dolorosas, o risco de hemorragia e a teratogenicidade (MONEY; YORK, 2001).

1.2.2. HEPARINA FRACIONADA (HF)

Por definição as HFs são sais de glicosaminoglicanas sulfatadas com massa molecular inferior a 8.000 Da (60% da molécula) e diferente estrutura química na extremidade da cadeia do polissacarídeo (reduzida ou não reduzida) (LAGE et al., 2007). São obtidas a partir da HNF extraída da mucosa intestinal porcina, por degradação química ou enzimática (HIRSH; BATES, 2000; LENSING et al., 1999; WEITZ, 1997) e possuem massa molecular mais homogênea. As preparações comerciais possuem uma massa molecular média de 4.000 a 5.000 Da, podendo variar entre 2.000 a 9.000 Da (DU BREUIL; UMLAND, 2007; HIRSH; BATES, 2000; PAGE et al, 1999; YOUNG et al., 1993).

A HF é administrada por via SC, em doses fixas ajustadas em relação ao peso do paciente, a cada 8 ou 12 horas (CREAGER; DZAU, 2002; WANNMACHER, 2007). A dose usual de enoxaparina SC, aprovada pelo FDA, é de 1 mg/kg no tratamento da TVP e 1,5 mg/kg no tratamento do TEV (INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT, 2007).

O mecanismo de ação das HFs difere da HNF, pois a razão antitrombina/antifator Xa é reduzida de 1:1 para 1:4 (PAGE et al., 1999). Assim como a HNF, a HF exerce sua atividade anticoagulante ativando a AT III, mediada por uma sequência de pentassacarídeos distribuída de forma aleatória ao longo de sua cadeia. Esta interação entre pentassacarídeos e AT III é responsável pelo efeito anticoagulante por inibição do fator Xa. A principal diferença entre o mecanismo de ação das HFs e HNF se dá por outra via de ação, a inibição direta da trombina. Para isto, é necessário que as cadeias de heparina tenham, além da sequência comum de pentassacarídeos, pelo menos mais 18 unidades de sacarídeos, ou seja, sequências de sacarídeos longas suficientes para formarem um complexo terciário: [AT III – longa cadeia de sacarídeos – trombina]. A maior parte das cadeias de

sacarídeos das HFs não são suficientemente longas para inibir diretamente a trombina, por isso as HFs têm maior atividade apenas pelo fator Xa, o que reduz consideravelmente o risco de sangramento (Figura 2) (STAICO et al., 2004).

Figura 2. Mecanismos de ação de (A) heparina não fracionada e (B) heparina fracionada. Fonte: Staico et al., 2004.

As HFs se ligam menos às proteínas plasmáticas e às células endoteliais e, por isso possuem taxa de eliminação, resposta à dose e bioatividade mais previsíveis em comparação com a HNF, além de maior absorção subcutânea. Também possuem menor interação com as plaquetas, fator de von Willebrand, endotélio e atuam menos intensamente sobre a permeabilidade vascular (PAGE et al., 1999; STAICO et al., 2004). Page et al. (1999) e Lensing et al. (1999) descreveram outras vantagens da HF em relação à HNF como: (i) meia-vida duas vezes maior, correspondente a 4 (quatro) horas; (ii) biodisponibilidade de aproximadamente 90%, contra 20% da HNF; (iii) não necessita de monitoramento laboratorial constante para a maioria dos pacientes e (iv) eficácia comparável na prevenção e no tratamento das trombooses, com menor risco de complicações por sangramento.

As HFs disponíveis no mercado, dentre elas a enoxaparina sódica, a dalteparina sódica e a nadroparina cálcica, são produzidas por diferentes métodos (Tabela 1) e são consideradas agentes farmacológicos individuais, possuindo propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas diferentes entre si. Elas diferem consideravelmente em composição e não permitem a intercambialidade. (HIRSH; RASCHKE, 2004; INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT, 2007; PAGE et al, 1999), pois não se pode pressupor que as preparações com atividade anti-Xa semelhante produzam efeitos antitrombóticos semelhantes (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2007; PAGE et al, 1999).

Tabela 1- Métodos de obtenção das heparinas fracionadas.

Fármaco	Método
Nadroparina cálcica (Fraxiparin®)	despolimerização por ácido nítrico
Enoxaparina sódica (Levenox® / Clexane®)	benzilação seguida de despolimerização alcalina
Dalteparina (Fragmin®)	despolimerização por ácido nítrico
Tinzaparina (Innohep®)	despolimerização enzimática com heparinase

Fonte: Hirsh e Raschke (2004).

A enoxaparina sódica é uma HF com massa molecular entre 3.500 a 5.500 Da (valor médio 4.500 Da.). O valor relativo da massa molecular da cadeia inferior a 2.000 Da. varia entre 12% e 20% e da massa molecular de 2.000 até 8.000 varia entre 68% e 88%. O grau de sulfatação é cerca de dois por unidade dissacarídea. A potência pode variar de 99 a 125 UI de atividade anti-fator Xa por miligrama, calculada com referência à substância seca (LAGE et al., 2007). Seu fator limitante é a sua administração apenas pela via parenteral (HIRSH; BATES, 2000; YOUNG et al., 1993).

1.2.3. VARFARINA

Os anticoagulantes de uso oral possuem ação indireta e são geralmente utilizados na profilaxia por tempo mais prolongado. Atuam inibindo a biossíntese hepática dos fatores de coagulação II, VII, IX e X, dependentes da vitamina K, prejudicando a coagulação sanguínea. Esta inibição resulta em formas biologicamente inativas destas proteínas coagulantes e, assim, o desenvolvimento da ação terapêutica ocorre lentamente. Por isso, o tratamento com um anticoagulante oral é inicialmente realizado simultaneamente ao uso da heparina (COMP, 2003; CREAGER; DZAU, 2002).

A varfarina sódica é a mais utilizada e deve ser administrada em doses ajustadas (5 a 20 mg/dia) para manter o tempo de protrombina em um índice internacional terapêutico (RNI de 2,0 a 3,0). Ao atingir este valor, que pode levar até três dias, a heparina é suspensa e a dose da varfarina é ajustada para o nível de manutenção (COMP, 2003; CREAGER; DZAU, 2002).

Dentre as limitações com relação ao uso da varfarina estão o seu efeito imprevisível na coagulação sanguínea e a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos graves como a hemorragia digestiva e cerebral. Seu efeito anticoagulante é mediado pelo fator de coagulação dependente da vitamina K (HIRSH, 1991a). Consequentemente, variações na ingestão ou desequilíbrios que reduzem a absorção de vitamina K podem causar flutuações no efeito anticoagulante. Outros fatores contribuem para o efeito irregular da varfarina tais como a sua afinidade pelos receptores hepáticos e as interações comuns com outros fármacos administrados concomitantemente. A estreita janela terapêutica, a necessidade de ajustes constantes na dose e monitoramento, o custo e a complexidade de cuidados com o paciente resultam em baixa adesão ao tratamento (ELG; GUSTAFSSON; CARLSSON, 1999).

1.2.4. NOVOS ANTICOAGULANTES

Novos anticoagulantes têm sido desenvolvidos para atingir sítios específicos na cascata de coagulação. Estes anticoagulantes podem ser divididos em inibidores diretos da trombina ou inibidores do fator Xa (DU BREUIL; UMLAND, 2007).

Hirudina, lepirudina, bivalirudina, desirudina e argatroban são exemplos de inibidores diretos da trombina. Entretanto, em 2004 não foram aprovados pela “U.S. Food and Drug Administration” (FDA) devido aos efeitos adversos cardiovasculares inesperados e a toxicidade hepática relacionada com o uso contínuo (DU BREUIL; UMLAND, 2007).

A fondaparinux, um pentassacarídeo sintético análogo da heparina, é inibidor do fator Xa (DU BREUIL; UMLAND, 2007). É administrado por via subcutânea (SC) por pelo menos cinco dias até que a varfarina sódica, iniciada geralmente em 72 horas, estabeleça seu efeito anticoagulante (RNI 2,0 a 3,0) (INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT. 2007). Sua limitação principal é a ausência de reversibilidade do efeito anticoagulante após administração de protamina (DU BREUIL; UMLAND, 2007).

1.3. DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS

Considerando a incidência de TVP (250.000 pacientes/ano), o número de hospitalizações (300 a 600.000/ano), o número de óbitos (50.000/ano) e um gasto de aproximadamente \$2,5 milhões por ano, esforços vêm sendo feitos para o desenvolvimento de uma terapia mais facilmente tolerada pelos pacientes (MONEY; YORK, 2001).

Pesquisadores e indústrias farmacêuticas estão em busca de uma substância anticoagulante ideal. Para tanto, tal substância deverá apresentar o máximo de atividade antitrombótica e o mínimo de risco hemorrágico e de efeitos colaterais; ser passível de administração por qualquer via, dependendo do estado clínico do paciente; não necessitar de monitorização laboratorial; ser de fácil neutralização em caso de complicação ou urgência; ser cômoda para o paciente e para a equipe de saúde; e apresentar baixo custo, para permitir sua aquisição e uso pela grande maioria dos pacientes (MAFFEI, 2002). Muitas medicações estão em teste no momento, esperando cumprir ao máximo tais exigências, mas ainda sem respostas definitivas. Alguns desses novos anticoagulantes, como a hirudina e o argatroban, chegaram a ser lançados, mas ainda estão longe de constituir terapias melhores que as atuais, apenas podendo substituí-las em casos especiais, como na trombocitopenia induzida pela heparina (LAGE et al, 2007; WEITZ; HIRSH, 2001).

Todos os esforços realizados para o desenvolvimento de uma terapia oral com a heparina até hoje não resultaram em absorção consistente ou em efeito anticoagulante satisfatório. Devido à impermeabilidade do epitélio intestinal a moléculas grandes e carregadas, bem como a sensibilidade destas às variações de pH e à degradação enzimática durante o trânsito intestinal, a administração oral de peptídeos, proteínas e macromoléculas polares resulta em uma disponibilidade biológica muito baixa (LEE et al., 1991; SMITH et al., 1992).

A administração SC é uma alternativa menos invasiva que a EV e permite o desenvolvimento de formulações de liberação prolongada da HF, o que dispensaria sua administração diária. Além disso, não possui o problema de baixa biodisponibilidade enfrentado pela terapia oral com a heparina (FALKON et al., 1995).

1.4. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A descoberta de um novo medicamento é resultado de um longo e incessante trabalho que exige um alto investimento. De acordo com a Febrapharma (2007), para a obtenção um novo fármaco, são gastos cerca de US\$ 900 milhões e 15 anos de pesquisas até o medicamento inovador. Em média, de cada 10 mil moléculas ativas analisadas, apenas uma se torna medicamento. Ranade e Hollinder (2004) destacam um declínio substancial no desenvolvimento de novos fármacos nas últimas três décadas, o que impulsionou avanços significativos na tecnologia dos sistemas de liberação de fármacos. A busca intensa para a apresentação de fármacos convencionais em novas formas também é justificada pelo fato de grandes companhias farmacêuticas terem perdido parte desse mercado para os genéricos. Além disso, os benefícios obtidos com a nova tecnologia têm sido aliados a um bom retorno dos investimentos.

Nas formas farmacêuticas convencionais, os princípios ativos são liberados rapidamente necessitando da administração reiterada do medicamento para atingir e manter a concentração plasmática do fármaco dentro do intervalo terapêutico. Isso resulta em uma flutuação significativa nos níveis plasmáticos numa fase inicial, representando ainda um risco potencial de superdosagem após o uso continuado (DANCKWERTS; FASSIHI, 1991).

Os sistemas de liberação sustentada de fármacos têm sido muito pesquisados pois são capazes de: (i) manter os níveis terapêuticos ótimos com um mínimo de flutuação; (ii) predizer e reproduzir os níveis de liberação; (iii) prolongar o tempo de ação de fármacos com meia vida curta; (iv) reduzir os efeitos colaterais e a frequência de dosagem e (v) otimizar a terapia e melhorar a aceitação pelo paciente (DANCKWERTS; FASSIHI, 1991; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006a; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006b).

Durante o desenvolvimento de um sistema de liberação, vários aspectos devem ser considerados como: (i) a via de administração, (ii) a dose total a ser administrada, (iii) as propriedades físico-químicas do fármaco (solubilidade, estabilidade, potência, tamanho molecular, difusividade, coeficiente de partição, pKa), (iv) as características farmacocinéticas (absorção, meia-vida, distribuição corporal, metabolismo), (v) a duração necessária da ação e (vi) o tipo de patologia (aguda, crônica) (ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007; RANADE; HOLLINGER, 2004).

Os avanços em nanobiotecnologia tem resultado na evolução de novos sistemas carreadores coloidais como os lipossomas, micelas poliméricas, micro/nanoemulsões e micro/nanopartículas para alcançar estes objetivos. O efeito de fármacos veiculados em diferentes formas farmacêuticas pode ser bastante distinto (RANADE; HOLLINGER, 2004; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006a; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006b).

As micro/nanopartículas têm sido muito pesquisadas na última década, mostrando serem capazes de manter níveis terapêuticos adequados de fármacos no organismo e direcionados a órgãos-alvo (RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006a; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006b), e já estão sendo amplamente utilizadas nas áreas farmacêutica e cosmética como veículos para liberação modificada de uma grande variedade de compostos, inclusive de fármacos biofarmacêuticos como insulina, heparina, proteínas e peptídeos.

1.4.1. SISTEMAS MICROPARTICULADOS

O termo micro/nanopartícula é definido de acordo com o tamanho das partículas obtidas. As nanopartículas se caracterizam pelo tamanho inferior a 1 µm, enquanto as micropartículas geralmente apresentam diâmetro médio que pode

variar de 1 μm a 500 μm (MAGILL, 1990; RANADE; HOLLINGER, 2004). Este termo pode se referir a dois tipos de estruturas, as micro/nanoesferas e as micro/nanocápsulas. As micro/nanoesferas são caracterizadas como sistemas matriciais, onde o fármaco está homogeneamente disperso no interior de uma matriz polimérica ou cerosa. Já as micro/nanocápsulas constituem sistemas reservatórios, onde é possível identificar o núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido (Figura 3) (ANDRÉO-FILHO; OLIVEIRA, 1999).

Figura 3. Representação esquemática: (A) micro/nanoesfera; (B) micro/nanocápsula.

Fonte: http://www.metalmat.ufrj.br/escolanano/Nanomedicina_nanofarmacos_BartiraRossiBergmann.pdf (11/08/2008).

O método ideal de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido, fácil de transpor à escala industrial (KISSEL et al., 2006).

Muitos fármacos têm sido encapsulados por diferentes técnicas, que englobam processos químicos, físico-químicos, ou mecânicos. Os métodos físico-químicos compreendem a coacervação simples, a coacervação complexa e a evaporação do solvente após emulsificação, já os métodos químicos compreendem a condensação ou a polimerização interfacial e geleificação. Os métodos mecânicos referem-se, geralmente, aos processos industriais de microencapsulação tais como, o revestimento com leite fluidizado, a centrifugação e spray drying (EVANGELISTA, 2000; QUINTANAR-GUERRERO, 1998). A encapsulação pode ocorrer por dois métodos onde: (i) o fármaco é incorporado ao polímero durante a preparação das partículas; (ii) o fármaco é adsorvido ao polímero após a preparação da partícula, ou

seja, as partículas são imersas em uma solução contendo o fármaco (SOPPIMATH et al., 2001).

Na escolha do processo de microencapsulação devem ser considerados: (i) rendimento adequado das micropartículas (partículas livres de aglomeração), (ii) taxa de encapsulação do fármaco, (iii) reprodutibilidade do perfil de liberação, e (iv) habilidade de modificar as taxas de liberação *in vitro* através da variação de parâmetros no processo durante preparo da partícula (DEAN, 1988). O sucesso do sistema está relacionado à alta eficiência de encapsulação e à redução da quantidade de fármaco veiculado necessário para administração (FREITAS; MARCHETTI, 2005; SOPPIMATH et al., 2001). Para a encapsulação de macromoléculas hidrofílicas poucas técnicas podem ser utilizadas devido a alguns pontos críticos, que incluem a relação entre o rendimento e a encapsulação, como também a alta sensibilidade de biomoléculas com relação a solventes, estresse e aquecimento. A técnica mais utilizada e de escolha para esse estudo é a dupla emulsificação e evaporação do solvente.

1.4.2. POLÍMEROS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

O estudo das propriedades físicas, químicas e biológicas dos polímeros antes da formulação dos sistemas de liberação modificada também é de suma importância. As propriedades do polímero e do fármaco encapsulado influenciam diretamente a seleção do processo de microencapsulação, o mecanismo de liberação do fármaco a partir do dispositivo polimérico, o direcionamento a locais específicos e outras. Uma variedade de polímeros biodegradáveis de origem natural ou sintética tem sido descritos para utilização em sistemas de liberação sustentada, entretanto, poucos são biocompatíveis. (JAIN et al., 1998). A biodegradabilidade dos polímeros tem recebido atenção especial por prevenir a toxicidade crônica encontrada após a administração parenteral de polímeros não biodegradáveis (FREITAS; MARCHATTI, 2005). Polímeros biodegradáveis naturais como a soro albumina bovina e humana, o colágeno, a gelatina e a hemoglobina têm sido avaliados, mas seu uso é limitado pelo alto custo e/ou dificuldade de reprodutibilidade de lotes. Uma alternativa consiste no uso de polímeros biodegradáveis sintéticos tais como poli(amidas), poli(aminoácidos), poli(orto-esteres), poli (uretanos) e poli (acrilamidas). Dentre polímeros sintéticos, os poli

(ésteres) alifáticos como o ácido láctico (PLA), o ácido glicólico (PGA) e seu copolímero ácido láctico-co-glicólico, (PLGA) têm sido alvo de muitos estudos devido a sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (JAIN, 2000). Além disso, estão sendo muito utilizados por mais de duas décadas em formulações de administração parenteral e demonstraram controlar a biodistribuição e eliminação de fármacos padrão seguido de administração parenteral (FREITAS; MARCHETTI, 2005).

Um polímero biodegradável deve ser de fácil manuseio, leve e flexível para minimizar a irritação do tecido, possuir cristalinidade baixa e temperatura de transição vítrea (T_g) não muito maior que a temperatura corpórea, além de apresentar compatibilidade com o fármaco veiculado (FORD; TIMMINS, 1989). As propriedades de superfície tais como a hidrofília, a homogeneidade e a energia de superfície determinam a biocompatibilidade com tecidos e sangue, e influenciam nas propriedades físicas tais como a durabilidade, a permeabilidade e a degradabilidade. As propriedades gerais que influenciam diretamente no mecanismo de liberação do fármaco, incluem a massa molecular, a adesividade, a solubilidade baseada nos mecanismos de liberação (difusão ou dissolução) e o sítio de ação (PILLAI, 2001).

1.4.2.1. Copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA)

PLGAs são poliésteres relativamente hidrofóbicos, instáveis na presença de umidade e biodegradáveis a subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água), produzidos a partir de recursos renováveis (MOTTA; DUEK, 2006; RAMCHANDANI; ROBINSON, 1998). São fisiologicamente inertes e biocompatíveis, uma vez que degradam no meio fisiológico, por hidrólise, gerando metabólitos semelhantes aos que ocorrem naturalmente no organismo, e por isso têm recebido muita atenção, principalmente para estudos de sistemas de liberação por via parenteral (MANO et al., 2004). Além disso, já estão aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) (KISSEL et al., 2006).

Além da biodegradabilidade, os copolímeros de PLGA apresentam resistência e flexibilidade. A degradação destes polímeros ocorre por hidrólise randômica (não-enzimática), o que resulta em decréscimo da massa molecular, seguido da redução das propriedades mecânicas, da fragmentação e perda de massa até que o polímero seja totalmente degradado (GÖPFERICH, 1997; NETZ, 2004). Os PLGA preparados

na razão molar de 50:50 são hidrolisados mais rapidamente do que aqueles em que a proporção de qualquer um dos monômeros é maior. A taxa de liberação também pode ser manipulada pelo percentual ou quantidade do fármaco em relação ao polímero (MOTTA; DUEK, 2006; SINHA; KHOSLA, 1998).

A principal vantagem do PLGA sobre outros polímeros biodegradáveis, como o poli (L-ácido láctico), PLA, por exemplo, é o fato do copolímero PLGA necessitar de um menor tempo para sua completa degradação, implicando menor probabilidade de reações adversas, as quais decorrem, muitas das vezes, de fragmentos cristalinos liberados por polímeros, cujo tempo de degradação seja excessivamente longo.

Figura 4. Estrutura química do PLGA.

A estrutura química do PLGA (Figura 4) é mais suscetível à reação de hidrólise, pois em sua cadeia polimérica há presença do ácido glicólico, que possui um impedimento menor ao ataque das moléculas de H_2O quando comparado ao PLA, cuja cadeia polimérica é formada exclusivamente por ácido láctico. Após a hidrólise do polímero, a degradação prossegue através da eliminação metabólica dos produtos e subprodutos de reação, onde o ácido láctico entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos sendo metabolizado e posteriormente eliminado na forma de CO_2 e H_2O . Já o ácido glicólico, além de entrar no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, seguindo o mesmo comportamento que o ácido láctico, pode ser excretado diretamente na urina (MOTTA; DUEK, 2006).

1.5. TURBIDIMETRIA E NEFELOMETRIA

Turbidimetria e nefelometria consistem em métodos relacionados à colorimetria, capazes de medir a turbidez de uma amostra, e possuem aplicação restrita à quantificação de substâncias que podem ser precipitadas em forma de suspensão suficientemente estável (CHARLOT, 1964).

A turbidimetria é uma expressão da propriedade ótica de uma amostra que faz com que a radiação seja dispersa e absorvida antes de ser transmitida em linha reta através da amostra (WILLARD et al., 1988).

Quanto à instrumentação, o turbidímetro mede a quantidade de radiação que passa através de uma amostra, análogo à espectrofotometria de absorção (WILLARD et al., 1988) e pode ser realizada em colorímetros e espectrofotômetros sem nenhuma modificação (CHARLOT, 1964). Já o nefelômetro mede a quantidade de radiação dispersada por uma amostra turva. Estas medidas são feitas em um ângulo ao sentido do feixe da radiação através da amostra, geralmente 45° e 90°, análogos à fluorimetria. (WILLARD et al., 1988), e podem ser realizadas em um fluorímetro, no qual a luz difundida é observada lateralmente (CHARLOT, 1964).

A determinação analítica deve ser empírica, pois diferenças no projeto físico de um instrumento causam diferenças nos valores medidos para a turbidez, ainda que o mesmo material de calibração seja usado para cada instrumento (WILLARD et al., 1988).

De acordo com Charlot (1964), a sensibilidade destes métodos pode ser alta, especialmente para as partículas que absorvem luz (coloridas) ou são opacas, e pode ser aumentada modificando o comprimento de onda (λ) utilizado para a leitura. Entretanto, a exatidão das técnicas nefelométricas e turbidimétricas pode ser comprometida, pois é difícil assegurar que o tamanho de partícula seja o mesmo durante cada medida como durante a calibração. Vários fatores estão relacionados: (i) concentração do material a ser estimada, (ii) taxa de adição do reagente, (iii) agitação, (iv) temperatura, (v) presença de impurezas, etc. Além disso, o tamanho de partícula pode variar no decorrer do tempo. Para minimizar as variáveis os procedimentos utilizados para a preparação dos padrões e das soluções a serem analisadas devem ser padronizados e realizados nas condições mais idênticas possíveis. Os erros que ocorrem durante a medida são geralmente insignificantes em comparação com aqueles devido à falta de reprodutibilidade das propriedades

da suspensão por falha na padronização. A realização da curva de calibração para todas as análises tem grande importância para a minimização das variáveis.

A análise da heparina fracionada por nefelometria foi descrita por Ardry (1967) e mais recentemente a turbidimetria foi utilizada por Hoffart et al. (2003; 2006), Lamprecht, Ubrich e Maincent (2007) e Ubrich e Maincent (2006), devido à dificuldade no desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando CLAE.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste trabalho são o desenvolvimento e a caracterização de micropartículas de PLGA para a veiculação da heparina fracionada, utilizada no tratamento da trombose venosa profunda.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e validação de metodologia para análise da enoxaparina sódica.
- Encapsulação da heparina fracionada em micropartículas de PLGA pelo método de dupla emulsificação/ evaporação do solvente.
- Determinação do rendimento do processo e eficiência de encapsulação.
- Otimização da técnica para aumentar a taxa do fármaco encapsulado.
- Caracterização físico-química das partículas: análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura, determinação do tamanho e distribuição do tamanho pela técnica de espalhamento de luz.
- Avaliação *in vitro* do perfil de liberação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATÉRIAS-PRIMAS E SOLVENTES

- Acetonitrila, grau cromatográfico (lote: C03C51 - J.T. Baker, EUA)
- Acetato de amônio, grau cromatográfico, $\geq 99\%$ (lote: 15006052 – Fluka, Alemanha)
- Acetato de sódio, P.A. (lote: 7364MVAG - Mallinckrodt LabGuard, México)
- Acetato de tetrabutylamônio (TBA) 97% (lote: 030022LE-466 – Aldrich, Alemanha)
- Ácido acético, grau cromatográfico (lote: 044058 – VETEC, Brasil)
- Ácido poli-(D, L láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50 (Resomer RG 502) (lote: 206727 – Boehringer Ingelheim, Alemanha)
- Álcool polivinílico (PVA) hidrolisado MM 85.000 – 146.000, 98-99% (lote: 07609KE – Sigma-Aldrich, EUA)
- Brometo de tetraetilamônio (TEA), 98% (lote: 53891247-335 – Merck, Alemanha)
- Cloreto de cetilpiridínio, USP (lote: 42953 – Dishman, Índia)
- Cloreto de potássio, P.A. (lote: 105703 – Synth, Brasil)
- Citrato de sódio, P.A. (lote: 104246 – Synth, Brasil)
- Cloreto de sódio, P.A. (lote: 112987 – Synth, Brasil)
- Diclorometano, P.A. (lote: 31167 – Dinâmica, Brasil)
- Enoxaparina sódica (lote: 034/07 – cedida pela Empresa Kin Master, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico anidro, P.A. (lote: 105427 – Synth, Brasil)
- Fosfato de sódio bibásico heptahidratado, P.A. (lote: 93438 – Synth, Brasil)
- Metanol, grau cromatográfico (lote: C5093 – Burdick & Jackson, EUA)

3.1.2. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS E COLUNAS DE GUARDA

- Coluna cromatográfica Lichrospher® 100 RP 18 (5 μm) 125 x 4 mm (Merck, Alemanha)

- Coluna cromatográfica Purospher star[®] RP 18e (5 µm) 250 x 4 mm (Merck, Alemanha)
- Coluna cromatográfica Lichrospher[®] 100 NH₂ (5 µm) 250 x 4 mm (Merck, Alemanha)
- Coluna cromatográfica Exsil[®] SAX (5 µm) 250 x 4,6 mm (SGE, Austrália)
- Coluna cromatográfica Bio-Gel[®] SEC 30-XL 300 x 7,8 mm (Bio Rad, Japão)
- Coluna de guarda RP 18 (5 µm) 4 x 4 mm (Merck, Alemanha)

3.2. MÉTODOS E EQUIPAMENTOS

3.2.1. ANÁLISE DA ENOXAPARINA SÓDICA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise da enoxaparina foi inicialmente realizada em equipamento de cromatografia líquida marca SHIMADZU, equipado com uma bomba modelo LC-10AT, um detector por absorção no UV-vis modelo SPD-10A, operando em 232 nm e um integrador modelo CR8-A. O volume de injeção das análises foi de 20 µL. O desenvolvimento da metodologia analítica para enoxaparina por CLAE em fase reversa foi inicialmente baseado no método proposto por Thanawiroon e Linhardt (2003) e Karamanos et al. (1997) utilizando reagente de par iônico para a análise e detecção UV-vis com leitura em 232 nm.

Após a realização de diversas modificações nos parâmetros cromatográficos, utilizou-se a metodologia por troca iônica com o uso de coluna de troca iônica forte (SAX), também baseada nos estudos realizados por Thanawiroon e Linhardt (2003). As variações dos parâmetros cromatográficos, utilizando detecção UV-vis estão apresentadas nas Tabelas 4 a 7. Foram avaliadas alterações na fase móvel, na fase estacionária, na temperatura de análise e no tipo de detector.

Finalmente, as análises foram realizadas por cromatografia de exclusão por tamanho, em um cromatógrafo a líquido marca SHIMADZU modelo LC-6AD equipado com duas bombas, forno modelo CTO- 10AS VP, utilizando detector por índice de refração modelo RID- 10A, com base nos trabalhos de Intes et al. (2001) e Ziegler e Zaia (2006). Os parâmetros cromatográficos foram estabelecidos com o intuito de obter picos simétricos com tempo de retenção adequado. A fase móvel foi

composta de cloreto de sódio 0,1 M, pH 7,0. A temperatura de análise foi de 40°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e o volume de amostra injetado foi de 20 μL .

Para medir o pH das soluções aquosas das fases móveis e soluções tampão foi utilizado pHmetro Digimed modelo DM-20. A água utilizada para o preparo das soluções foi obtida através do Sistema Milli-Q PLUS – Millipore/Millipore Corporation. As fases móveis foram filtradas em membrana Millipore 0,45 μm para a eliminação de partículas que podem danificar a coluna e o sistema cromatográfico e degaseificadas borbulhando gás hélio (AGA AP, 99,995%) durante 20 min., utilizando degaseificador marca SHIMADZU, modelo DGU – 2A.

Uma solução estoque de enoxaparina sódica na concentração de 1 mg mL⁻¹ foi preparada em água milli-Q. As demais soluções-padrão foram preparadas a partir de diluições da solução estoque para a construção da curva de calibração.

3.2.2. ANÁLISE DA ENOXAPARINA SÓDICA POR TURBIDIMETRIA

As análises por turbidimetria foram realizadas adicionando-se, em um tubo de vidro, 0,5 mL da amostra, 0,5 mL de solução tampão acetato 1M pH 4,4 e 2 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio 0,1% e NaCl 0,94%, em triplicata. O branco foi preparado da mesma forma utilizando 0,5 mL do veículo excetuando a adição do fármaco. Os tubos foram incubados a 37°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) por 1 hora em banho termostatizado FANEM 1100 (Brasil). Em seguida as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro FEMTO 800XI, utilizando comprimento de onda (λ) de 290 e 500 nm, dependendo da faixa de concentração linear. Para a construção de uma curva de calibração, inicialmente foi preparada uma solução estoque de enoxaparina sódica na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ em água Milli-Q e as demais soluções-padrão foram preparadas à partir de diluições desta.

A análise também foi realizada e validada utilizando soluções-padrão preparadas em solução isotônica (tampão fosfato salino 10 mM pH 7,4 preparado com cloreto de sódio PA 137 mM, cloreto de potássio PA 2,7 mM, fosfato de sódio bibásico heptahidratado PA 8 mM, fosfato de potássio monobásico anidro PA 2 mM), meio utilizado nos ensaios *in vitro* para a avaliação do perfil de liberação da enoxaparina a partir das micropartículas.

3.2.2.1. Validação do método analítico

Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, intervalo, precisão intra-ensaio, precisão inter-ensaio, exatidão e robustez, seguindo as especificações da ANVISA (BRASIL, 2003).

a) Especificidade e seletividade

A especificidade foi determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras de enoxaparina sódica contaminadas com quantidades apropriadas de adjuvantes utilizados na preparação das micropartículas e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.

b) Linearidade

A partir de diluições da solução estoque da enoxaparina sódica ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas as soluções em 20 concentrações diferentes, compreendendo de $1,0$ a $1.000,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, com leituras em espectrofotômetro em 290 e 500 nm, para a verificação da linearidade. Os intervalos lineares foram calculados e as curvas de calibração para ambos os comprimentos de onda foram construídas.

Os gráficos foram construídos relacionando os valores de concentração das soluções no eixo das abscissas com os valores de absorvância obtidos no eixo das ordenadas. A proporcionalidade entre a concentração e a resposta foi realizada mediante a obtenção de uma curva padrão e do cálculo da inclinação da reta, do coeficiente de correlação linear (r) e da equação da reta (intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos mínimos quadrados). O coeficiente de correlação (r) mínimo aceitável foi de 0,99 (BRASIL, 2003).

c) Precisão e exatidão

Esta validação foi baseada no método de padronização externa. A precisão (CV%) e a exatidão (E%) do método analítico foram testadas por análises inter e intra-ensaios. Para determinação da exatidão e da precisão intra-ensaios, ou repetitividade, foram analisadas três amostras com concentrações diferentes para

cada comprimento de onda: 5,0, 25,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 290 nm e 40,0, 100,0, 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 500 nm. Foram realizadas 10 leituras em um mesmo dia com as mesmas condições de análises.

Os estudos inter-ensaios (exatidão e precisão intermediária) foram realizados em cinco dias consecutivos. As amostras foram analisadas em triplicata.

Os cálculos para avaliar a precisão do método foram realizados utilizando-se os gráficos de calibração. As dispersões em relação aos valores médios foram expressas como coeficiente de variação (CV):

$$CV\% = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

onde:

S = desvio padrão

$\bar{X}$ = média dos valores obtidos

Para os cálculos da exatidão (E) foram utilizadas as medidas das concentrações obtidas nos estudos intra e inter-ensaios e a concentração real presente na amostra, segundo a fórmula:

$$E = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor teórico}}{\text{valor teórico}} \times 100$$

d) Robustez

Para a avaliação da robustez do método, as análises foram submetidas a variações nas condições analíticas. Os parâmetros analisados foram variação do pH e da temperatura da reação e alteração no meio onde o fármaco será determinado. (água, solução tampão e sobrenadante do preparo de micropartículas inertes).

3.2.3. OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA

As partículas foram preparadas utilizando o método clássico de dupla emulsificação e evaporação do solvente (HERRMANN & BODMEIER, 1998; JAIN et al., 1998; KISSEL et al. 2006; NIWA et al., 1993; VENIER-JULIENNE et al., 1996). Para a obtenção da primeira emulsão (água em óleo), o polímero (PLGA) foi solubilizado em diclorometano (DCM) originando a fase oleosa e o fármaco foi dissolvido em solução aquosa de PVA formando a fase aquosa (A_1). A fase aquosa (A_1) foi gotejada na solução do polímero, composta de DCM e PLGA, sob agitação, formando a emulsão primária (A_1/O). A agitação foi realizada com o auxílio de um homogeneizador de alta velocidade (11.000 a 26.000 rpm) tipo ultraturrax, modelo T 25 basic, marca IKA Labortechnik (Alemanha). A emulsão primária foi então gotejada em solução aquosa de PVA (A_2), sob agitação, utilizando agitador magnético HEIDOLPH RZR1 50 Hz (Alemanha) ou ultraturrax, originando a emulsão múltipla água/óleo/água ($A_1/O/A_2$). O DCM foi eliminado por evaporação sob pressão reduzida utilizando-se rotaevaporador IKA Labortechnik RV05-ST2 (Alemanha) acoplado a uma bomba de vácuo, ou evaporação sob agitação branda em pressão atmosférica, ambos à temperatura ambiente controlada ($25,0 \pm 1^\circ\text{C}$), originando as micropartículas. Uma representação esquemática do processo está apresentada na Figura 5. As partículas em suspensão foram centrifugadas a $16000 \times g$ por 30 min utilizando-se centrífuga modelo Excelsa II, marca FANEM (Brasil), e os sobrenadantes foram separados para a análise da eficiência de encapsulação utilizando o método indireto. O sedimento foi ressuspensão em água e novamente centrifugado, por duas vezes, para a remoção dos resíduos de PVA e polímero. Então, as partículas foram congeladas em gelo seco e submetidas ao processo de liofilização para secagem e estabilização, utilizando-se liofilizador modelo condensador 101, marca LIOBRAS (Brasil).

Figura 5. Representação esquemática da técnica de preparação de micropartículas pelo método da dupla emulsificação e evaporação do solvente.

As variações no processo de obtenção (Tabela 2) foram estudadas buscando a obtenção de partículas com distribuição de tamanho regular e não agregadas, com morfologia e tamanho adequados à via de administração pretendida e levando-se em consideração o aumento da eficiência de encapsulação, do rendimento e um perfil de liberação adequado para o tratamento. O método de secagem não foi modificado. As condições de preparo para as formulações 1 a 20 estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2- Parâmetros avaliados na preparação das micropartículas obtidas a partir do método da emulsão múltipla.

Etapa do processo	Variáveis
Primeira emulsificação (A/O)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ proporção enoxaparina / PLGA (1:4, 1:10, 1:20 p/p) ➤ concentração de tensoativo (PVA 0%, 0,3%, 0,5%, 1%, 2%, 3% p/v) ➤ proporção FA/FO (2:3, 2:4, 2:5 v/v) ➤ tipo, tempo e velocidade de agitação: vortex (2.500 rpm; 5 min. e 8 min.); ultraturrax (11.000 rpm, 1min. e 2min.; 19.000 rpm, 2 min.)
Segunda emulsificação (A/O/A)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ proporção 1ª emulsão/ FA externa (1:6, 1:8, 1:10, 1:15, 1:20 v/v) ➤ concentração de tensoativo (PVA 0,2%, 0,4%, 1,0%, 3,0% p/v) ➤ adição de solução tampão fosfato salino pH 7,4 ➤ velocidade, tipo e tempo de agitação: agitador mecânico (1.000, 1.500, 2.000 e 2.500 rpm; 3, 5, 30 e 120 min.); ultraturrax (11.000, 19.000, 22.000 rpm; 2, 3 e 5 min.)
Evaporação do solvente	<ul style="list-style-type: none"> ➤ utilização de rotaevaporador (pressão reduzida): 15, 20 e 30 min.) ➤ evaporação sob agitação magnética branda (pressão atmosférica): 2, 3 e 4h.
Separação das micropartículas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ tempo de centrifugação (15; 30 min.)

Tabela 3 - Modificações realizadas no processo de preparação de micropartículas de PLGA contendo enoxaparina sódica.

Formulação	Condições utilizadas	Formul. – Modificação
01	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 100 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 2 min. Agitação/ 3h	-
02	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 2 min. Agitação/ 3h	01 - Volume da FA2
03	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 30 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 2 min. Agitação/ 3h	01- Volume da FA2
04	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 20 min.	02- Método de evaporação do solvente
05	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 5 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 2 min. Agitação/ 4h	02- Volume de DCM
06	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 5 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 2 min. Rotaevaporação/ 15 min	03- Volume de DCM
07	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 200 mg PLGA, 5 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 2 min. Agitação/ 4h	05- Quantidade PLGA
08	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 2% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,2% 11.000 rpm/ 1 min. 2.500 rpm/ 3 min. Agitação/ 3h	02- Concentração de PVA da FA1; velocidade de agitação / agitador
09	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 2% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,4% 2.500 rpm/ 5 min. 1.500 rpm/ 5 min. Agitação/ 3h	02- Concentração de PVA da FA1; velocidade de agitação/ agitador
10	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 2% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 50 mL PVA 0,4% 11.000 rpm/ 5 min. 2.500 rpm/ 5 min. Agitação/ 3h	09- Velocidade de agitação / agitador
11	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 3% FO: 100 mg PLGA, 3 mL DCM FA2: 50 mL PVA 3% 11.000 rpm/ 1 min. 1.500 rpm/ 30 min. Rotaevaporação/ 15 min.	04- Concentração de PVA da FA1 e FA2; velocidade de agitação/ agitador
12	FA1: 50 mg ENX, 2 mL PVA 3% FO: 200 mg PLGA, 5 mL DCM FA2: 50 mL PVA 1% 11.000 rpm/ 1 min. 22.000 rpm/ 2 min. Rotaevaporação/ 15 min	07- Quantidade do fármaco; concentração de PVA.
13	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 3% FO: 100 mg PLGA, 3mL DCM FA2: 90 mL PVA 1% 2.500 rpm/ 8 min. 1.000 rpm/ 2 h.	12- Volume DCM; volume FA2; tempo de agitação.
14	FA1: 10 mg ENX, 2 mL H ₂ O FO: 100 mg PLGA, 3mL DCM FA2: 50 mL PVA 2% 11.000 rpm/ 2 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 15 min	12- FA1= sem PVA; concentração de PVA na FA2; tempo de agitação.

Continua...

... continuação

Tabela 3 - Modificações realizadas no processo de preparação de micropartículas de PLGA contendo enoxaparina sódica.

15	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 0,3% FO: 100 mg PLGA, 3mL DCM FA2: 50 mL PVA 1%	11.000 rpm/ 2 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 15 min	
16	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 0,3% FO: 100 mg PLGA, 3mL DCM FA2: 50 mL PVA 1% em PBS	11.000 rpm/ 2 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 15 min	15- Adição de tampão na FA2.
17	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 3mL DCM FA2: 50 mL PVA 1%	11.000 rpm/ 2 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 15 min	15- Concentração de PVA na FA1.
18	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 1% FO: 100 mg PLGA, 3mL DCM FA2: 90 mL PVA 1%	11.000 rpm/ 2 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 15 min	17- Volume da FA2.
19	FA1: 10 mg ENX, 2 mL PVA 0,5% FO: 100 mg PLGA, 3mL DCM FA2: 50 mL PVA 2%	11.000 rpm/ 2 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 15 min	14- Concentração de PVA na FA1.
20	FA1: 100mg ENX, 3mL PVA 0,4% FO: 400 mg PLGA, 12mL DCM FA2: 200 mL PVA 1% em PBS	11.000 rpm/ 2 min. 22.000 rpm/ 3 min. Rotaevaporação/ 30 min	16- Proporção ENX/ PLGA; FA1.

DCM= diclorometano; ENX= enoxaparina sódica; FA1= fase aquosa da 1ª emulsão; FA2= fase aquosa da 2ª emulsão; FO= fase oleosa; PBS= tampão fosfato salino pH 7,4.

3.2.3.1. Rendimento do processo

O rendimento do processo (R%) compreende a quantidade em massa de micropartículas obtidas em relação à quantidade de fármaco e polímero utilizados no preparo. O cálculo foi realizado utilizando-se a equação:

$$R\% = \frac{\text{massa obtida de micropartículas liofilizadas}}{\text{massa teórica (fármaco + polímero)}} \times 100$$

3.2.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada pelo método indireto, ou seja, através da quantificação da enoxaparina sódica não encapsulada presente no sobrenadante, recuperada da fase aquosa após a primeira

centrifugação. Para essa determinação, utilizou-se o método turbidimétrico descrito anteriormente. A curva de calibração foi obtida com soluções-padrão preparadas com o sobrenadante das partículas inertes e as leituras foram realizadas sempre em triplicata. As concentrações das amostras foram calculadas pela equação da reta obtida pela análise da curva de calibração.

O cálculo da eficiência de encapsulação (Ef%) foi obtido através da fórmula:

$$Ef\% = \frac{\text{concentração teórica} - \text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.2.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS PARTÍCULAS

3.2.4.1. Microscopia Óptica

O acompanhamento da formação das micropartículas foi realizado utilizando-se microscópio óptico modelo Axiolan 2, ZEISS (Alemanha), mediante obtenção do esfregaço de uma gota da amostra em lâmina de vidro, seguida da observação utilizando objetivas de aumento correspondentes a 20 e 32 vezes.

3.2.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os estudos da morfologia das partículas foram realizados por MEV, utilizando-se microscópio eletrônico de varredura modelo Stereoscan 440, LEICA e no modelo EVO 50 da Zeiss (Figura 6 A).

As micropartículas liofilizadas foram aderidas em fita dupla face de carbono, colada no porta-amostra, retirando o excesso com fluxo de ar. Em seguida, receberam recobrimento com uma camada de ouro por 100 segundos em um metalizador modelo SCD 050 Sputter Coater, marca Bal-Tec (Figura 6 B), e foram examinadas no microscópio eletrônico de varredura com voltagem entre 10,00 e 20,00 KV.

Figura 6. Microscópio eletrônico de varredura (A) e metalizador utilizado para o recobrimento das micropartículas com ouro(B).

3.2.4.3. Análise do tamanho e distribuição de tamanhos das partículas

A análise de tamanho e da distribuição de tamanhos das partículas foi efetuada pela técnica de espalhamento de luz a laser (Laser Diffraction Particle Size Analyser) utilizando-se um analisador de partículas por difusão a laser modelo LS 13.320, marca Beckman Coulter. As amostras constituídas pela suspensão das partículas em água foram analisadas dentro do compartimento do próprio equipamento em temperatura ambiente controlada de 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), em triplicata ($n=3$). Também foi analisada a distribuição de tamanhos da enoxaparina sódica suspensa em etanol, nas mesmas condições.

3.2.5. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PERFIL DE LIBERAÇÃO

Os estudos para a avaliação *in vitro* do perfil de liberação foram conduzidos após a otimização do método de preparo das micropartículas, no que diz respeito ao à distribuição de tamanho, ao rendimento do processo e à eficiência de

encapsulação. O experimento foi realizado em um equipamento de dissolução marca Hanson Research, modelo SR8 Plus, utilizando cubas com capacidade de 150 mL, contendo 30 mL do meio de dissolução (tampão fosfato salino pH 7,4) (Figura 7 A). As micropartículas foram pesadas (quantidade equivalente a aproximadamente $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de enoxaparina sódica) e transferidas para o interior de um saco de diálise marca Fisherbrand® Dialysis Tubing, Fisher Scientific (MWCO 12.000 – 14.000) previamente tratado. Os sacos de diálise foram fechados com fios de nylon e inseridos nos dispositivos “sinkers” (âncoras) a fim de evitar a flutuação (n=5) (Figura 7 B).

Figura 7. Fotografias de (A) aparelho de dissolutor e (B) saco de diálise contendo as micropartículas, posicionado no interior do dispositivo “sinker” (âncora).

A temperatura foi mantida a 37°C ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) com velocidade de agitação de 150 rpm utilizando dispositivo de pás. As amostras foram coletadas (1 mL) em intervalos pré-estabelecidos e foram quantificadas por turbidimetria. O volume retirado foi repostado com tampão fosfato salino pH 7,4 e a evaporação foi controlada diariamente antes da coleta, corrigindo-se o volume de água evaporada.

Também foi realizada a dissolução intrínseca da enoxaparina sódica, nas mesmas, condições para verificar seu comportamento em relação à membrana de diálise.

Os resultados obtidos no estudo de liberação *in vitro* do fármaco foram analisados em um gráfico relacionando a porcentagem do fármaco liberado em função do tempo, a avaliação da cinética de dissolução por meio de regressão linear. A determinação dos parâmetros cinéticos permite melhor conhecimento sobre o processo de dissolução do fármaco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA ENOXAPARINA SÓDICA.

4.1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel líquida e a fase estacionária contida em uma coluna. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição, entretanto, as separações podem ser realizadas também por adsorção, troca iônica exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo da fase estacionária utilizada (SNYDER et al., 1997).

A cromatografia de fase reversa é a primeira escolha para a análise da maioria das amostras, pois é mais estável, eficiente e reprodutível. Este sistema utiliza fases estacionárias apolares e fases móveis polares. A afinidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna são controlados pela polaridade da fase móvel (SNYDER et al., 1997). A fase móvel é composta basicamente por água ou tampão com adição de algum modificador orgânico (metanol ou acetonitrila). As características desta fase móvel também vão influenciar na retenção do soluto de acordo com seu caráter polar ou apolar. De um modo geral, na cromatografia de fase reversa à medida que se aumenta a proporção do solvente orgânico na fase móvel o tempo de retenção diminui (mecanismo de fase reversa) (CASS; DEGANI, 2001; SNYDER et al., 1997).

O primeiro passo do desenvolvimento do método analítico para a quantificação da enoxaparina constituiu da busca de trabalhos com HNF e HF para obtenção de dados que pudessem contribuir para o estabelecimento dos parâmetros cromatográficos. No entanto, há uma grande carência de estudos envolvendo análise quantitativa da heparina intacta utilizando CLAE.

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para avaliar e quantificar as glicosaminoglicanas, entretanto, os estudos são dirigidos para a determinação da

seqüência de oligossacarídeos (MOURIER; VISKOV, 2004; THANAWIROON et al., 2004; THANAWIROON; LINHARDT, 2003; VOLPI; MACCARI, 2006) e utilizam técnicas como ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas (CAMARA; SATTERFIELD; NELSON, 2007) e sistemas eletroforéticos (PATEL et al., 2008). A heparina é uma glicosaminoglicana carregada negativamente, e para muitas aplicações envolvendo amostras carregadas, tem-se necessidade de adição de um reagente de par iônico de carga oposta na fase móvel ou a utilização de uma coluna de troca iônica (THANAWIROON; LINHARDT, 2003).

a) CLAE de par iônico:

Inicialmente, os parâmetros cromatográficos foram baseados nos estudos realizados por Thanawiroon e Linhardt (2003) utilizando CLAE em fase reversa com a adição de um reagente de par iônico como contra-íon.

A retenção em cromatografia de par iônico é dependente da concentração e da hidrofobicidade do contra-íon e dois mecanismos de separação são possíveis e têm sido propostos. O primeiro sugere que o par iônico é formado na fase móvel e a separação ocorre pela distribuição do par entre as fases estacionária e móvel. O segundo mecanismo sugere que o contra-íon primeiro adsorve na fase estacionária e o par iônico é feito por uma interação dinâmica do soluto com a monocamada do contra-íon adsorvido (CASS, DEGANI, 2001).

Os estudos foram iniciados com uma coluna cromatográfica RP-18 (125 x 4 mm) constituída por partículas de sílica de 5 μm , as quais estão ligadas quimicamente a grupos funcionais octadecil constituídos por dezoito átomos de carbono. O mecanismo de retenção nestas colunas se dá pelas interações hidrofóbicas (forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo e dipolo-induzido) entre o soluto e a fase estacionária (SNYDER et al., 1997). Foram realizadas várias modificações nos parâmetros cromatográficos incluindo a composição e concentração do contra-íon, pH e força da fase móvel (Tabela 4), porém os resultados obtidos foram insatisfatórios. A eluição ocorreu no volume morto ou os picos obtidos não apresentavam simetria.

Tabela 4- Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de partição em coluna Licrospher® RP 18 (5 µm; 125 x 4 mm) e detector UV-Vis (232nm).

Composição da fase móvel (pH=7,0; vazão= 1mL/min)			t _R (min)	Resultado
TEA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Acetonitrila %		
1	50	30	0,5	Volume morto
3	50	30	0,8	Volume morto
5	50	30	0,8	Volume morto
TEA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Metanol %		
1	50	10	1,24	Volume morto
3	50	10	1,24	Volume morto
4	50	10	1,22	Volume morto
4	50	5	1,2	Volume morto
100	50	10	1,22	Volume morto
TBA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Acetonitrila %		
10	50	25	-	Amostra retida na coluna
1	50	25	1,91	Pico assimétrico com cauda
1	50	15	-	Amostra retida na coluna
1	50	20	3,04	Pico assimétrico com cauda
2	50	20	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
2	50	25	2,77	Pico assimétrico com cauda
2	50	22,5	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
3	50	25	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
4	50	25	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
3	50	35	-	Volume morto
3	50	30	1,71	Pico largo, assimétrico e com cauda
3	50	28	2,29	Pico largo, assimétrico e com cauda

Continua...

... continuação

Tabela 4- Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de partição em coluna Licrospher® RP 18 (5 µm; 125 x 4 mm) e detector UV-Vis (232nm).

Composição da fase móvel (pH=7,0; vazão= 1mL/min)				t _R (min)	Resultado
TBA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Acetonitrila %	Metanol %		
3	50	25	5	2,56	Pico assimétrico mal resolvido
3	50	20	10	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
3	100	25	5	1,25	Volume morto
3	50	25	10	1,92	Pico largo mal resolvido
3	50	15	20	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
3	50	20	5	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
TBA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Metanol %			
3	50	25		> 45	Amostra retida na coluna
3	50	35		1,82	Pico largo mal resolvido
3	50	30		-	Vários picos pequenos mal resolvidos
3	50	27		-	Vários picos pequenos mal resolvidos

Composição da fase móvel (pH=7,5; vazão= 1mL/min)			t _R (min)	Resultado
TBA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Acetonitrila %		
3	50	28	2,4/ 4,1	2 picos co-eluinto, mal resolvidos
3	50	30	1,8/ 3,27	2 picos mal resolvidos co-eluinto
4	50	30	2,1/	3 picos mal resolvidos co-eluinto

t_R = tempo de retenção, TEA= brometo de tetraetilamônio, TBA= acetato de tetrabutilamônio.

Segundo Snyder et al. (1997) a presença de grupos silanóis (Si-OH) residuais na fase estacionária RP 18 pode ocasionar interações secundárias e influenciar a retenção. Isto é particularmente importante em par iônico, pois pode levar à retenção irreversível do soluto ou do contra-íon, e podem ser evitadas pelo uso de fases estacionárias capeadas (CASS; DEGANI, 2001). Então, foi utilizada uma coluna com fase estacionária RP 18e, capeada (Tabela 5).

Tabela 5- Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de par-iônico e coluna Purospher star® RP 18e (5 µm; 250 x 4 mm) e detector UV-Vis (232nm).

Composição da fase móvel (pH=7,0; vazão= 1mL/min)				t _R (min)	Resultado
TBA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Acetonitrila %	Metanol %		
3	50	20	5	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
3	100	25	5	2,54	Pico com pequena cauda, concentrações diferentes não correspondem
TBA (mM)	Acetato de amônio (mM)	Acetonitrila %			
10	50	50		2,71	Pico não corresponde em concentração diferente.

t_R = tempo de retenção, TBA= acetato de tetrabutilamônio.

b) CLAE em fase reversa:

Diante dos resultados obtidos anteriormente, uma fase estacionária quimicamente ligada ao grupamento NH₂ foi testada em CLAE de fase reversa. A Tabela 6 apresenta as modificações nos parâmetros cromatográficos e os resultados obtidos.

Tabela 6- Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de fase reversa e coluna Licrospher® 100 NH₂ (5 µm; 250 x 4 mm) e detector UV-Vis (232nm).

Composição da fase móvel (pH=7,0; vazão= 1mL/min)		t _R (min)	Resultado
Acetato de amônio (mM)	Acetonitrila %		
50	50	2,34/2,99	Vários picos co-eluido
50	40	-	Vários picos co-eluido
100	40	2,16	Pico mal resolvido, não corresponde em concentrações diferentes
200	40	2,4/2,7	Picos co-eluido, não corresponde em concentrações diferentes

t_R = tempo de retenção.

c) CLAE de troca iônica:

Considerando os resultados obtidos na análise da enoxaparina utilizando CLAE em fase reversa (Tabela 6) e de par-iônico (Tabelas 4 e 5), a fase estacionária foi substituída por uma coluna de troca iônica. Foi utilizada coluna de troca aniônica forte (SAX), onde a fase estacionária é quimicamente ligada a grupamentos de íon amônio quaternário (-NH₃⁺), sendo ionizados na faixa completa de pH. A retenção em troca iônica se dá por atração eletrostática entre os íons da fase móvel e os íons de carga oposta presentes na fase estacionária e é determinada pelo pH da fase móvel. A força iônica, a temperatura e a natureza dos íons da solução tampão também são fatores importantes desta técnica (CASS; DEGANI, 2001).

Os parâmetros iniciais foram baseados nos trabalhos realizados por Intes et al. (2001) e Thanawiroon e Linhardt (2003). Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Parâmetros cromatográficos analisados utilizando cromatografia de troca iônica em coluna Exsil® SAX (5 µm; 250 x 4,6 mm) e detector UV-Vis (232 nm).

Composição da fase móvel (pH=3,5; vazão= 1ml/min)		t _R (min)	Resultado
Cloreto de sódio (M)	Metanol %		
0,2	-	-	Vários picos mal resolvidos
0,2	20	-	Vários picos mal resolvidos
0,3	-	-	Vários pequenos e mal resolvidos
0,5	-	5,15	Pico largo e pequeno, não corresponde bem em diferentes concentrações
1,0	-	3,8	Pico pequeno, não corresponde bem em diferentes concentrações
Composição da fase móvel (pH=7,0; vazão= 1ml/min)		t _R (min)	Resultado
Cloreto de sódio (M)	Metanol %		
0,5	-	> 40	Amostra retida na coluna
0,2	50	-	Vários picos pequenos mal resolvidos
Citrato de sódio (M)	Metanol %		
0,1	-	> 40	Amostra retida na coluna
0,3	-	>60	Amostra retida na coluna

t_R = tempo de retenção

Segundo Cass e Degani (2001) um aumento na concentração do tampão pode diminuir o tempo de retenção e, para moléculas ácidas como a enoxaparina, um aumento de pH aumenta a retenção, pois leva a uma maior ionização. Porém, os resultados da análise da enoxaparina por CLAE de troca iônica também não foram satisfatórios.

d) CLAE de exclusão:

Face aos resultados obtidos anteriormente, optamos pela análise por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), também denominada cromatografia de filtração em gel. A cromatografia de exclusão por tamanho é uma técnica aplicável particularmente a espécies de alta MM. Os empacotamentos para

cromatografia de exclusão por tamanho consistem de partículas pequenas de sílica ou de polímeros contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. As moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros das partículas que preenchem a coluna são excluídas primeiro, enquanto as moléculas com diâmetros significativamente menores podem penetrar ou permear nos poros e ficarem retidas por tempos maiores. Neste caso, a coluna é utilizada apenas como um suporte, sendo que próprio eluente contido nos poros faz o papel da fase estacionária (SNYDER et al., 1997).

O detector utilizado foi o de índice de refração (IR), mais apropriado para análise de carboidratos e as glicosaminoglicanas (INTES, et al., 2001). Este detector acompanha continuamente a diferença do índice de refração entre a fase móvel pura e contendo os componentes da amostra. A resposta deste detector é universal, sua sensibilidade é limitada e é bastante sensível às variações de temperatura e de vazão e mudanças na composição da fase móvel (CASS, DEGANI, 2001). Para a análise da enoxaparina, o detector foi ajustado no modo de polaridade negativa, pois de acordo com Malsh et al. (1996) contribui para o aumento da resolução de compostos carregados negativamente. Os parâmetros iniciais foram baseados nos trabalhos publicados por Knobloch e Shaklee (1997), Intes et al. (2001) e Ziegler e Zaia (2006). Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Análise da enoxaparina por cromatografia de exclusão utilizando coluna Bio-Gel® SEC 30-XL (300 x 7,8 mm), detector IR e temperatura do forno de 40 °C.

Composição da fase móvel (vazão= 1ml/min)	t _R (min)	Resultado
Cloreto de sódio (M)		
0,05 (pH=7,0)	19,5	Pico assimétrico e mal resolvido, maior tempo de retenção.
0,1 (pH=7,0)	9,6	Pico simétrico e corresponde a concentrações diferentes.
0,1 (pH=3,5)	9,4	Pico assimétrico e não correspondeu em concentrações diferentes
0,3 (pH=7,0)	9,5	Pico não correspondeu em concentrações diferentes.
Acetato de sódio (M)		
0,1 (pH=7,0)	9,5	Não correspondeu em concentrações diferentes

t_R = tempo de retenção.

De acordo com Ziegler e Zaia (2006) esta técnica de separação está baseada na habilidade das moléculas se difundirem nos poros de tamanhos definidos, sendo muito mais dependentes da vazão da fase móvel, diferente da CLAE em fase reversa, onde a polaridade e a proporção do solvente orgânico constituem pontos mais críticos. A velocidade da fase móvel poderá favorecer ou impedir a difusão local dos solutos. O coeficiente de difusão, por sua vez, é dependente do tamanho molecular do soluto (governada pela primeira lei de Fick) onde o fluxo ótimo não é universal, sendo dependente também da viscosidade e da temperatura da fase móvel. Interações do analito com a matriz também podem ocorrer, pois a maioria das matrizes hidrofílicas possui carga residual negativa ou grupos funcionais polarizáveis. A adição de um eletrólito na fase móvel pode compensar parcialmente esta interação através da formação de uma camada difusa.

Devido à elevada presença de grupos ácidos nas moléculas de heparina, uma concentração mais elevada de NaCl (>50 mM) foi utilizada para aumentar a força iônica. Isso influenciou o tempo de eluição, a simetria do pico, onde a melhor resolução foi obtida com a concentração de 100 mM (Figura 8). A análise foi realizada injetando concentrações correspondentes a 200,0, 250,0, 300,0, 500,0 e 1000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata. Os CVs para estas concentrações foram de 4,48% para a área, 6,37% para a altura e 0,13% para o tempo de retenção.

Figura 8. Cromatograma da análise da enoxaparina 1.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cromatografia de exclusão (Coluna Bio-Gel® SEC 30-XL, fase móvel NaCl 0,1M, temperatura de 40°C, vazão 1 mL min⁻¹, detecção por IR).

Assim, o objetivo de analisar a enoxaparina sódica intacta sem o processo de derivatização enzimática pode ser alcançado usando a cromatografia de exclusão com detecção por índice de refração. Porém, o método não demonstrou sensibilidade para concentrações mais baixas (menores que 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) necessárias para o estudo proposto e, portanto, não foi validado.

4.1.2. MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Outra forma encontrada para a análise quantitativa da enoxaparina foi baseada no método nefelométrico descrito por Ardry (1967) e ainda utilizado atualmente (HOFFART et al., 2003, 2006; LAMPRECHT; UBRICH; MAINCENT, 2007), devido à grande dificuldade da análise mediante a utilização de técnicas cromatográficas. Neste método os grupos sulfatados da HF, carregados negativamente, reagem com os grupos de amônio quaternário das moléculas de cloreto de cetilpiridínio, carregados positivamente. Essa reação forma um complexo insolúvel em água, que precipita, deixando o meio reacional turvo. A turbidez da amostra é diretamente proporcional à concentração de HF no meio.

As primeiras análises foram realizadas com soluções-padrão da enoxaparina sódica em solução aquosa, em triplicata, com leitura em 500 nm e demonstraram linearidade na faixa analisada de 40,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $r = 0,9962$ (Figura 9).

As análises posteriores foram realizadas utilizando soluções-padrão preparadas em solução isotônica salina (tampão fosfato salino 10 mM pH 7,4), meio onde as micropartículas contendo enoxaparina seriam avaliadas quanto ao perfil de liberação *in vitro*. O resultado equivalente em relação às soluções-padrões anteriores mostrou que a modificação do meio não interferiu nesta técnica. A curva de calibração foi obtida na mesma faixa de concentração (40,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), $r = 0,9965$ (figura 10).

Figura 9. Curva de calibração da enoxaparina sódica em solução aquosa, no intervalo de concentrações de 40,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (leitura em 500 nm).

Figura 10. Curva de calibração da enoxaparina em solução tampão fosfato salino 10 mM, no intervalo de concentrações de 40,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (leitura em 500 nm).

Para aumentar a sensibilidade do método foi testado também um comprimento de onda menor, de 290 nm, o qual demonstrou linearidade para concentrações de 2,5 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados preliminares da curva de calibração das soluções padrão apresentaram boa correlação nas concentrações analisadas, em conformidade com as exigências da ANVISA (BRASIL, 2003). O método turbidimétrico foi então validado em λ de 290 e 500 nm.

4.1.2.1. Validação do método

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003) a validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Neste caso deve apresentar especificidade, linearidade, faixa de aplicação, precisão, sensibilidade e exatidão adequados à análise.

a) Especificidade e seletividade:

Este parâmetro tem como objetivo analisar a capacidade do método em medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Segundo a ANVISA, para a análise quantitativa de fármacos em formas farmacêuticas, a especificidade pode ser determinada pela comparação entre os resultados obtidos de amostras não contaminadas e os obtidos das amostras contendo o fármaco, contaminadas com quantidades apropriadas de adjuvantes, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (BRASIL, 2003).

O método mostrou ser específico para os propósitos deste trabalho. Os resultados obtidos para as soluções de enoxaparina sódica preparadas em água Milli Q, em tampão fosfato salino 10 mM e no sobrenadante de partículas inertes obtidas após centrifugação (contendo resíduos de PLGA, PVA e diclorometano) demonstraram não serem afetados pelas matérias-primas e reagentes utilizados.

b) Linearidade e faixa de aplicação:

Na análise de fármacos a concentração pode ser determinada com base em gráficos de calibração obtidos a partir de soluções com concentrações conhecidas. A linearidade de um método analítico refere-se à proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida, e para a sua avaliação são utilizadas concentrações superiores às aquelas empregadas para a construção do gráfico de calibração (BRASIL, 2003).

A linearidade do método proposto foi avaliada usando alíquotas de solução de enoxaparina sódica na faixa de concentração de 2,5 a 1000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este estudo demonstrou que as respostas obtidas são diretamente proporcionais à concentração da amostra para o intervalo compreendido de 2,5 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para leitura em 290 nm ($r = 0,9963$) (Tabela 11), e 40,0 a 300,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para leitura em 500 nm ($r = 0,9975$) (Tabela 12), considerando os valores de $r > 0,99$ e $\text{CV} < 10\%$. Assim, o método apresenta linearidade com relação aos intervalos de concentração nos comprimentos de onda estudados.

Figura 11. Curva de calibração para a análise do intervalo linear da enoxaparina sódica em 290 nm.

Figura 12. Curva de calibração para a análise do intervalo linear da enoxaparina sódica em 500 nm.

c) Precisão e exatidão:

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). Dentro dos estudos de precisão de um método são avaliadas a precisão intermediária (ou precisão inter-ensaios) e a repetibilidade (ou precisão intra-ensaio).

Precisão intermediária e repetibilidade:

Para avaliar a precisão do método analítico foram utilizadas soluções de enoxaparina sódica nas concentrações de 40,0, 100,0 e 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando $\lambda = 500 \text{ nm}$, e 10,0, 25,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando $\lambda = 290 \text{ nm}$. A precisão intermediária ou precisão inter-ensaios foi avaliada em triplicata durante cinco dias consecutivos. A repetibilidade ou precisão intra-ensaios foi avaliada realizando-se 10 análises no mesmo dia para cada concentração. Os resultados obtidos nos estudos para

determinação da precisão intermediária e da repetibilidade estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9- Resultados obtidos nos estudos de avaliação da precisão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=290$ nm.

Parâmetros			
Repetitividade			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,0	25,0	50,0
n	10	10	10
CV%	2,95	1,00	0,76
Precisão intermediária			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,0	25,0	50,0
n	3	3	3
CV%	4,80	2,63	2,56

Conc.:concentração; n: número de replicatas; CV: coeficiente de variação.

Tabela 10- Resultados obtidos nos estudos de avaliação da precisão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=500$ nm.

Parâmetros			
Repetitividade			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	40,0	100,0	250,0
n	10	10	10
CV%	0,89	0,54	0,73
Precisão intermediária			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	40,0	100,0	250,0
n	3	3	3
CV%	0,98	0,54	0,92

Conc.:concentração; n: número de replicatas; CV: coeficiente de variação.

Analisando os valores contidos nas Tabelas 9 e 10 podemos verificar que os valores dos CVs obtidos para as três concentrações estudadas ficaram abaixo de 5%, indicando que o método é preciso.

Exatidão:

A avaliação da exatidão intra e inter-ensaios foi realizada mediante a utilização dos dados obtidos no estudo da precisão e seus resultados estão apresentados nas Tabelas 11 e 12. Os valores de CV devem ficar entre $\pm 15\%$ (CAUSON, 1997; SHAH et al., 1992).

Tabela 11- Resultados obtidos nos estudos de avaliação da exatidão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=290$ nm.

Parâmetros			
Exatidão intra-ensaios			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,0	25,0	50,0
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	9,8	25,1	50,1
n	10	10	10
E(%)	-2,08	0,55	0,13
Exatidão inter-ensaios			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,0	25,0	50,0
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	9,2	26,5	47,4
n	3	3	3
E(%)	-8,20	6,15	-5,29

Conc.:concentração; n: número de replicatas; E: exatidão.

Tabela 12- Resultados obtidos nos estudos de avaliação da exatidão do método turbidimétrico utilizado na análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=500$ nm.

Parâmetros			
Exatidão intra-ensaio			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	40,0	100,0	250,0
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	39,4	113,8	242,8
n	10	10	10
E(%)	-1,61	13,79	-2,87
Exatidão inter-ensaio			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	40,0	100,0	250,0
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	38,6	112,1	239,4
n	3	3	3
E(%)	-3,54	12,10	-4,22

Conc.:concentração; n: número de replicatas; E: exatidão.

e) Robustez:

Robustez de um método indica a capacidade da técnica desenvolvida em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, bem como sua confiabilidade durante o uso (BRASIL, 2003). As variações nos parâmetros de análise estabelecidos como pH da solução tampão, temperatura de incubação, e mudança do meio onde o fármaco será estudado (água, solução tampão e sobrenadante do preparo de micropartículas inertes) apresentaram um CV máximo de 5,08%. Os resultados podem ser observados na Tabelas 13 e 14.

Tabela 13- Resultados obtidos nos estudos para a avaliação da robustez do método turbidimétrico utilizado para a análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=290$ nm.

Parâmetros	
pH do tampão de reação	r
4,4	0,9963
3,4	0,9962
5,4	0,9960
CV%	0,02
Temperatura de incubação	r
37°C	0,9963
39°C	0,9963
36°C	0,9958
CV%	0,03
Meio de análise da enoxaparina	r
Água	0,9965
Solução tampão fosfato salino 10 mM pH 7,4	0,9963
Sobrenadante de partículas inertes	0,9919
CV%	0,26

Tabela 14- Resultados obtidos nos estudos para a avaliação da robustez do método turbidimétrico utilizado para a análise da enoxaparina sódica, utilizando $\lambda=500$ nm.

Parâmetros	
pH do tampão de reação	r
4,4	0,9975
3,4	0,9972
5,4	0,9974
CV%	0,02
Temperatura de incubação	r
37°C	0,9975
39°C	0,9960
36°C	0,9976
CV%	0,09
Meio de análise da enoxaparina	r
Água	0,9962
Solução tampão fosfato salino 10 mM pH 7,4	0,9975
Sobrenadante de partículas inertes	0,9988
CV%	0,13

4.2. OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

Muitos fármacos têm sido encapsulados por diferentes técnicas. A seleção de uma técnica em particular depende principalmente das características físico-químicas do fármaco de interesse e o parâmetro mais crítico é a solubilidade em água, que influencia diretamente na escolha da fase externa contínua. Além da escolha da técnica adequada, a escolha do polímero apropriado é outro ponto primordial para a microencapsulação (UBRICH; MAINCENT, 2006).

Neste trabalho, a escolha do polímero foi baseada primeiramente na via de administração. Enquanto algumas vias de administração, como a via oral, oferecem uma maior possibilidade de escolha, pois incluem os polímeros não biodegradáveis, na administração parenteral a utilização de polímeros biodegradáveis é obrigatória (UBRICH; MAINCENT, 2006). O PLGA (50:50), utilizado neste estudo, é um dos polímeros biodegradáveis mais indicados para a microencapsulação de fármacos bioativos como proteínas, peptídeos e hormônios. Como são insolúveis em água, os PLGAs têm sido muito utilizados no desenvolvimento de técnicas baseadas na evaporação de solvente (KISSEL et al., 2006). Outro fator importante foi o fato de ser o único polímero aprovado pela FDA para uso em seres humanos até o presente momento.

A heparina é uma macromolécula hidrofílica e, embora menos sensível a fatores como calor ou estresse em relação às proteínas e peptídeos, a dupla emulsificação (A/O/A) e evaporação do solvente foi a técnica escolhida, pois esta é a mais indicada para a encapsulação de biomoléculas (UBRICH; MAINCENT, 2006). A dupla emulsificação é utilizada para fármacos hidrofílicos a fim de aumentar a quantidade de fármaco encapsulado, já que a emulsificação simples constitui um método clássico para encapsulação de fármacos com características hidrofóbicas (HERRMANN; BODMEIER, 1998; SOPPIMATH et al., 2001). Um método de microencapsulação é considerado eficiente quando proporciona alta taxa de encapsulação do fármaco (HERRMANN; BODMEIER, 1998).

Os mecanismos pelos quais as micropartículas são produzidas envolvem a emulsificação da fase orgânica composta do solvente orgânico e polímero e da fase aquosa contendo a solução fármaco e tensoativo. O solvente orgânico difunde-se na micela para o meio aquoso e então é eliminado. Considerando que o polímero é

insolúvel em água, este precipita, encapsulando o fármaco (SCHOLES et al., 1993; UBRICH; MAINCENT, 2006).

O processo de formação das micropartículas foi acompanhado utilizando a técnica de microscopia óptica (Figura 13). Uma gota da amostra, após a etapa de evaporação do solvente, foi colocada sobre uma lâmina de vidro e observada objetivas de 20 e 32 vezes.

Figura 13. Fotografias das micropartículas de PLGA contendo enoxaparina sódica, tamanho médio 64,4 μm , obtidas pela formulação 09 (Tabelas 3 e 15). Aumento de 20x (A) e 32x (B).

Todas as formulações resultaram em micropartículas de forma esférica e bem definida, sem agregados.

Os resultados referentes ao tamanho médio das partículas, eficiência de encapsulação e rendimento do processo das formulações 1 a 20 (descritas na Tabela 3) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15- Eficiência de encapsulação, rendimento do processo e tamanho médio das partículas das formulações de micropartículas de PLGA contendo enoxaparina sódica obtidas pela técnica de dupla emulsificação e evaporação do solvente.

Formulação	Parâmetros avaliados		
	Tamanho médio das partículas (μm)	Rendimento do processo (%)	Eficiência de encapsulação (%)
01	$8,7 \pm 8,3$	34,5	8,8
02	$2,2 \pm 1,1$	58,9	24,3
03	$1,5 \pm 0,6$	64,6	27,9
04	$2,0 \pm 1,1$	65,3	15,7
05	$1,4 \pm 0,4$	45,2	7,9
06	$1,4 \pm 0,4$	61,8	8,1
07	$1,6 \pm 0,4$	79,2	17,6
08	$42,9 \pm 28,9$	62,5	37,2
09	$64,4 \pm 47,2$	53,4	39,1
10	$23,6 \pm 11,4$	79,8	24,0
11	$26,2 \pm 11,2$	67,7	24,1
12	$2,1 \pm 1,0$	44,6	17,0
13	$111,2 \pm 71,9$	54,2	30,3
14	$4,0 \pm 2,4$	48,8	12,5
15	$4,4 \pm 3,1$	n/c	0
16	$2,2 \pm 1,0$	74,6	48,9
17	$1,7 \pm 0,7$	n/c	15,1
18	$10,6 \pm 0,1$	n/c	6,0
19	$1,8 \pm 0,6$	n/c	5,1
20	$2,0 \pm 0,9$	71,3	50,2

*n/c: não calculado

A baixa eficiência de encapsulação da maioria das formulações pode ser explicada pela elevada solubilidade da enoxaparina em água. A difusão e a perda do fármaco através da interface da gotícula ocorrem principalmente durante os primeiros minutos da segunda etapa da emulsificação. Isso ocorre devido à difusão na fase aquosa externa antes da precipitação do polímero (HOFFART et al., 2003, 2006; UBRICH; MAINCENT, 2006). Solventes orgânicos com alta solubilidade em água conduzem a uma rápida precipitação e endurecimento do polímero. Entretanto,

a solubilidade limitada do diclorometano em água pode promover uma precipitação mais lenta do polímero, e assim um aumento da perda do fármaco na fase aquosa externa (HOFFART et al., 2003; UBRICH; MAINCENT, 2006). De acordo com estudos realizados por Ubrich e Maincent (2006), micropartículas contendo heparina preparadas com um único polímero biodegradável obtiveram baixo índice de encapsulação do fármaco e quanto maior o caráter hidrofílico do polímero, menor a encapsulação, pois se trata de um fármaco também muito hidrofílico.

Segundo Hoffart et al. (2003) as eficiências de encapsulação da HF são menores que as encontradas para as HNFs. A degradação enzimática ou modificação química da HNF para a obtenção da HF originam cadeias mais curtas com uma conseqüente perda de grupos carregados negativamente e, portanto as interações eletrostáticas entre os polímeros carregados positivamente e as HFs são muito menores.

O processo da dupla emulsificação e evaporação do solvente compreende etapas distintas (emulsificação, evaporação do solvente, purificação e secagem) e cada uma desempenha um papel importante nas características dos sistemas obtidos. As principais variáveis que afetam as características das micropartículas no processo de obtenção (Tabela 16) foram avaliadas neste trabalho.

Tabela 16- Principais variáveis do processo de dupla emulsificação evaporação do solvente que podem afetar as características das micropartículas.

Etapa do processo	Variáveis
Emulsificação	<ul style="list-style-type: none"> ➤ concentração do polímero ➤ solvente orgânico ➤ volume da fase orgânica ➤ volume da fase aquosa interna ➤ velocidade de agitação ➤ tipo de agitador ➤ tempo de agitação ➤ volume da fase aquosa externa
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ taxa de remoção ➤ tipo de agitação ➤ temperatura
Evaporação do solvente	
Secagem	➤ método de secagem
	➤ tempo de secagem

Fonte: CLELAND et al., 1997.

Buscando aumentar a eficiência de encapsulação, vários parâmetros foram modificados (Tabela 17), com base nos estudos de Kissel et al. (2006).

Tabela 17- Parâmetros do processo de dupla emulsão $A_1/O/A_2$ e a influência na eficiência de encapsulação*.

Eficiência de encapsulação		Variáveis	Parâmetros
Diminuição	A_1	Aditivos (estabilizantes, sais, tampões salinos, solventes) na A_1 Proporção de volume das fases:	Aumento da pressão osmótica $\downarrow A_2$
	A_2	$A_1/O \leftrightarrow A_2 // A_1 \leftrightarrow O // O \leftrightarrow A_2$	$\uparrow A_1$
	Condição do teste	Temperatura / técnica de homogeneização, tipo de agitador, intensidade	Aumento da intensidade e do tempo
Aumento	O	Propriedades do polímero (MM, constituição, intumescimento)	Aumento da viscosidade
	O	Propriedades do solvente da fase oleosa (pressão de vapor)	Diminui o tempo de solidificação
	O	Quantidade do polímero, volume do solvente orgânico, concentração, viscosidade, e solubilidade na fase contínua	Aumento da concentração do polímero, aumento da viscosidade.
	A_2	Tipo e propriedade do estabilizante	Habilidade de estabilizar a fase dispersa
	A_2	Concentração do estabilizante, viscosidade, pH, aditivos (sais, tampões)	Aumento da pressão osmótica
	Condição do teste	Remoção do solvente orgânico, taxa de pressão	Diminuição do tempo de solidificação

*Adaptada de Kissel et al. (2006). A_1 = fase aquosa interna; A_2 = fase aquosa externa; O= fase oleosa, MM= massa molecular.

As formulações 16 e 20 (descritas na Tabela 3) apresentaram os melhores resultados (Tabela 15) com maiores taxas de encapsulação da enoxaparina e rendimentos do processo, onde os valores obtidos foram próximos: 48,9% de enoxaparina foi encapsulada com rendimento de 74,6% na formulação 16, enquanto a formulação 20 encapsulou 50,2% com rendimento de 71,3% (Tabela 15). Esses resultados foram alcançados através da utilização do tampão fosfato salino e PVA na fase aquosa externa (Tabela 3). De acordo com Kissel et al. (2006), a utilização de aditivos como sais e tampões na FA_2 influencia a pressão osmótica diminuindo a difusão da FA interna para a externa e fazendo com que o fármaco permaneça no interior da partícula. Isso permitiu também reduzir a proporção de fármaco/polímero

de 1:10 na formulação 16 para 1:4 na formulação 20 (Tabela 3), mantendo a melhor eficiência de encapsulação, bom rendimento e distribuição de tamanho semelhante. Os outros parâmetros foram também avaliados, porém não demonstraram variações significativas.

5.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS PARTÍCULAS

5.3.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A MEV permite a obtenção de informações estruturais e químicas de diversas amostras. Sua técnica consiste em um sistema pelo qual um feixe de elétrons é emitido por uma fonte, geralmente um filamento de tungstênio, sendo colimado por lentes eletromagnéticas para um ponto ou região da amostra (O'CONNORS; SEXTON, 1992).

As micropartículas poliméricas foram fixadas sobre um suporte de alumínio para receberem um revestimento, por aspersão, de um filme de ouro de alguns nm de espessura, num processo conhecido como metalização da amostra. Este processo é necessário, pois o material analisado deve ser condutor (AUTON, 2005).

As fotomicrografias nas análises por MEV das partículas obtidas pelas formulações 01,11 e 20 (Tabela 14) estão apresentadas na Figura 14. As partículas obtidas apresentam forma esférica com superfície lisa e regular, sem a presença de agregados. O fármaco também foi analisado por MEV (Figura 15) e mostra uma distribuição de tamanho bastante irregular, o que já era esperado devido à grande variabilidade de sua MM.

Figura 14. Fotomicrografias das micropartículas de PLGA, contendo enoxaparina sódica, obtidas por: **(A)** formulação 11 (10 KV; aumento de 7.000x); **(B)** formulação 01 (20KV; aumento de 10.000x); **(C)** formulação 01 (20 KV; aumento de 5.000x) e **(D)** formulação 20 (5 KV; aumento de 5.000x).

Figura 15. Fotomicrografia da enoxaparina sódica: aumento de 500x (5 KV).

4.3.2. ANÁLISE DO TAMANHO E DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS

Após a administração de um medicamento, a forma farmacêutica deve liberar o fármaco a uma velocidade ideal. Para isso, diversos fatores devem ser ajustados incluindo o tamanho de partícula. A medida de uma partícula é baseada na forma hipoteticamente esférica, denominada diâmetro equivalente da partícula. A escolha do método de análise do tamanho de partícula deve ser determinada pelas propriedades das partículas e pelo tipo de informação que se procura sobre a distribuição (AULTON, 2005).

Neste estudo, para a análise do tamanho e da distribuição dos tamanhos das micropartículas, foi utilizado o método por dispersão a laser por espectroscopia de correlação fotônica, que emprega o princípio de movimento browniano. É independente de variações externas, exceto da viscosidade do fluido e da temperatura. Esta técnica analisa a constante variação dos padrões da luz laser dispersa ou difratada devido ao movimento browniano das partículas e monitora a velocidade de variação da luz polarizada durante a difusão (AULTON, 2005).

O tamanho das partículas obtidas depende do método de encapsulação bem como de algumas variáveis empregadas para o método utilizado. As formulações

devem apresentar distribuição de tamanho com perfil monomodal, uma característica importante que indica uma distribuição uniforme do tamanho, ou seja, monodispersividade (AULTON, 2005).

A distribuição de tamanho do fármaco também foi avaliada, apresentando tamanho médio de $29,1 \pm 25,5 \mu\text{m}$ (Figura 16). O alto desvio padrão é resultado do seu perfil polidisperso e se deve à grande variabilidade da enoxaparina sódica com relação a sua MM.

Figura 16. Gráfico da distribuição de tamanho da enoxaparina sódica.

As médias dos tamanhos das partículas de todas as formulações foram determinadas (Tabela 15). Neste estudo, os parâmetros que mais afetaram o tamanho médio das partículas no processo de obtenção foram o volume da fase aquosa externa e o tipo e velocidade de agitação. Um aumento no volume da A_2 levou a um aumento significativo do tamanho das micropartículas nas formulações 13 e 18. Esse aumento também pode ser observado com a diminuição da velocidade de agitação nas formulações 8, 9, 10, 11 e 13 (descritas na Tabela 3 resultados apresentados na Tabela 15). Porém, essa diminuição da velocidade de agitação no processo de emulsificação apresentou resultados com maior desvio padrão com o alargamento da faixa de distribuição de tamanho. Um exemplo está representado pela formulação 9 na Figura 17, com diâmetro médio das partículas de $64,4 \pm 47,2 \mu\text{m}$, onde mais de 25% são menores que $33,5 \mu\text{m}$ e menos de 75% são

menores que 82,1 μm . A sensibilidade do equipamento utilizado varia de 0,375 a 2.000 μm .

Figura 17. Gráfico da distribuição de tamanho das partículas de PLGA contendo enoxaparina sódica (formulação 9).

A formulação 20 (Figura 18) apresentou um perfil monomodal e tamanho médio de $2,0 \pm 0,9 \mu\text{m}$, onde menos de 8,6% das partículas tiveram tamanho inferior a 1,0 μm e mais de 90% foram menores que 3,3 μm .

Figura 18. Gráfico da distribuição de tamanho das partículas de PLGA contendo enoxaparina sódica (formulação 20).

4.3.3. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PERFIL DE LIBERAÇÃO

O estudo do perfil de liberação *in vitro* visa avaliar a quantidade do fármaco liberado de uma forma farmacêutica por unidade de tempo, sendo utilizado após o desenvolvimento de uma forma farmacêutica. As informações obtidas permitem um controle qualitativo do sistema de liberação de um fármaco fornecendo informações para a realização de etapas posteriores como estudo *in vivo* em animais e estudos clínicos. Esta etapa é muito importante e reduz o número de amostras necessárias para os testes *in vivo* (GORDON et al., 1995; LAZARUS; COOPER, 1961).

Os estudos *in vitro* são necessários para analisar o potencial das micropartículas de PLGA desenvolvidas para a veiculação do fármaco proposto, com relação à sua disponibilização para a absorção. Os testes foram realizados após a otimização do processo de obtenção das micropartículas e comparados com o perfil de liberação do fármaco em questão.

O delineamento dos experimentos para a avaliação *in vitro* deve ser criterioso para que possa garantir a veracidade dos resultados obtidos. Deverão ser considerados a temperatura, o sistema de agitação para homogeneização do meio, o próprio meio de dissolução, levando-se em consideração o pH e a isotonicidade. Na utilização de sistemas estáticos, a metodologia exige ainda que as condições *sink* sejam atendidas, ou seja, que a concentração do fármaco liberado no meio de dissolução não exceda 10% da sua concentração de saturação no meio selecionado (RICCI- JÚNIOR et al., 2005). Devido à alta hidrofiliabilidade da enoxaparina sódica, as condições *sink* puderam ser alcançadas sem a necessidade de modificação do meio.

A Figura 19 apresenta o perfil de dissolução intrínseca da enoxaparina sódica, onde mais de 60% do fármaco inserido em um saco de diálise foi liberado em 15 minutos e 87% foi liberado em 1 hora.

A liberação da enoxaparina sódica a partir das micropartículas de PLGA (formulação 20) está representada na Figura 20, onde 43,3% do fármaco foi liberado em 35 dias (840 h), sendo que 11,2% foi liberado nas primeiras 24h.

Figura 19. Perfil de liberação *in vitro* da enoxaparina sódica (meio tampão fosfato salino pH 7,4, 37°C, 150 rpm, n=5).

Figura 20. Perfil de liberação *in vitro* da enoxaparina sódica microencapsulada em PLGA (meio tampão fosfato salino pH 7,4, 37°C, 150 rpm, n=5).

A liberação de um fármaco a partir de sistemas poliméricos é dependente das propriedades do polímero carreador e resulta, em sua maior parte, da interação complexa de três mecanismos: a dissolução, a difusão e a erosão. A permeabilidade do solvente e do fármaco é determinada pela composição do sistema, cargas, bem como das propriedades físico-químicas como cristalinidade, hidrofiliicidade e hidrofobicidade (UBRICH et al., 2003). A liberação sustentada ocorre, pois a erosão da matriz polimérica é lenta e responsável pela formação de poros e canais por onde a água entra e, então, o fármaco é liberado por difusão (SOPPIMATH et al., 2001). Este é o mecanismo mais aceito e descrito na literatura científica (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; LUONG-VAN et al., 2007; NARASIMHAN; PEPPAS, 1996; SOPPIMATH et al., 2001). A hidrólise do polímero não apresenta efeito significativo no perfil de liberação do fármaco, pois ocorre muito lentamente e, por isso, não deve ser considerada. Muitos estudos experimentais e trabalhos teóricos têm sido publicados na literatura com o objetivo de elucidar os mecanismos de transporte de fármacos e revelar quais são os mecanismos envolvidos.

A interpretação quantitativa dos valores obtidos nos ensaios de dissolução é auxiliada pela utilização de uma equação, que traduz matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. A determinação dos parâmetros cinéticos permite o conhecimento de detalhes a respeito desse processo. Em alguns casos, essa equação pode ser deduzida através de uma análise teórica do processo, como numa cinética de ordem zero. Porém, na maioria dos casos não existe um fundamento teórico, sendo utilizada a equação empírica mais adequada. O tipo de fármaco, a sua forma polimórfica, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica podem influenciar a cinética de liberação (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Vários modelos matemáticos têm sido desenvolvidos com o objetivo de descrever a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica. Os mais utilizados são os de Higuchi (1961;1963) e Korsmeyer-Peppas (1983) (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; PEPPAS; 1985). O modelo original proposto por Higuchi (1961) tem sido a base para esclarecer o mecanismo de liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação. Os modelos cinéticos aplicáveis aos ensaios de dissolução são: (i) modelo cinético de ordem zero, no qual a velocidade de liberação do fármaco independe da sua concentração na forma farmacêutica, (ii) modelo de primeira

ordem, onde o mecanismo de liberação do fármaco está associado à difusão através dos poros do núcleo, (iii) modelo de Higuchi (pseudo ordem zero), no qual o mecanismo de liberação está associado também à difusão do fármaco e (iv) modelo de Hixon-Crowel (ordem zero), onde a dissolução do fármaco ocorre independentemente do pH, do meio e do método utilizado.

O modelo designado por cinética de ordem zero baseia-se na liberação lenta do fármaco a partir de formas farmacêuticas que não sofrem desagregação. Este modelo pode ser expresso pela seguinte equação:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_0 t + Q_0$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_∞ = quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito;

K_0 = constante cinética;

Q_0 = quantidade inicial do fármaco na solução.

Este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação de formas farmacêuticas de liberação controlada, como os sistemas osmóticos e algumas formas farmacêuticas revestidas. Entretanto, possui limitações devido aos poucos fatores de ajuste. A taxa de liberação é independente da concentração das substâncias dissolvidas.

O modelo cinético de primeira ordem, proposto primeiramente por Garibaldi e Feldman (1967) e posteriormente por Wagner (1969) descreve a liberação nos sistemas em que a taxa de dissolução é dependente da concentração de substância dissolvida e diminui à medida que a concentração destas substâncias vai diminuindo, com o passar do tempo (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). A equação utilizada foi:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303}$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_0 = quantidade inicial de fármaco na solução;

K_1 = constante de liberação de primeira ordem.

Neste caso, o gráfico do logaritmo decimal da quantidade liberada do fármaco com relação ao tempo será linear. As formas farmacêuticas que seguem este perfil de dissolução, tais como as que contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Outro modelo, um dos mais utilizados, é o de Higuchi. Este modelo descreve o mecanismo de liberação de fármacos como um processo baseado na Lei de Fick, sendo dependente da raiz quadrada do tempo. A equação é representada por:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_H \sqrt{t} + Q_0$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_∞ = quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito;

K_H = constante de liberação de Higuchi, que reflete as características do desenho da formulação;

Q_0 = quantidade inicial do fármaco na solução.

Apesar de freqüentemente empregado, o modelo de Higuchi pode tornar-se insuficiente para estudar aqueles sistemas que sofrem intumescimento, pois estes podem ser erodíveis. Nestes casos, a equação apresenta fortes limitações. A equação de Higuchi descreve a liberação nos sistemas em que o fármaco no estado sólido encontra-se disperso em uma matriz insolúvel e a taxa de liberação está relacionada com a taxa de difusão do fármaco (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Para estes sistemas, o modelo indicado baseia-se numa equação proposta por Korsmeyer et al. (1981). Esta equação é utilizada quando o mecanismo consiste de uma combinação de transporte Fickiano (difusão do fármaco) e não Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Neste modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo corresponde a:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = Kt^n + Q_0$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_∞ = quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito;

K = constante cinética;

n = expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco;

Q_0 = quantidade inicial do fármaco na solução.

Após a análise da regressão linear e do cálculo do coeficiente de correlação linear pode-se indicar qual dos modelos propostos é o mais indicado ao perfil de liberação do fármaco estudado. O estudo da cinética de liberação utilizando os modelos matemáticos de ordem zero, de pseudo ordem zero (modelo de Higuchi) e de primeira ordem estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da enoxaparina sódica a partir das micropartículas de PLGA.

	Ordem zero	Pseudo ordem zero	Primeira ordem
Modelo aplicado	% liberada x tempo (dias)	% liberada x tempo (dias) ^{1/2}	log % liberada x tempo (dias)
Correlação linear	$R^2 = 0,7779$ $r = 0,8820$	$R^2 = 0,9755$ $r = 0,9877$	$R^2 = 0,7823$ $r = 0,8845$

Os valores relativos ao coeficiente de correlação foram comparados e o modelo matemático de pseudo ordem zero, proposto por Higuchi, apresentou o maior coeficiente de correlação linear, se ajustando melhor à cinética de liberação da enoxaparina sódica a partir das micropartículas de PLGA e indicando que sua liberação está associada ao mecanismo de difusão (Figura 21).

Figura 21. Cinética de liberação da enoxaparina sódica microencapsulada em PLGA, modelo de Higuchi.

Ubrich e Maincent (2004) apresentaram resultados semelhantes quanto à baixa taxa de liberação da heparina a partir de micropartículas de PLGA, porém, seus estudos foram realizados em apenas 24h onde foi sugerido uma liberação lenta e incompleta em um período extenso de tempo, resultante do processo de difusão.

Xie et al. (2008) também observaram liberação lenta em nanopartículas de PLGA contendo proteínas, onde apenas 16,0 a 28,2% das proteínas estudadas foram liberadas em até 144 h, e não foram significativamente alterados por modificações na formulação. A justificativa é que a matriz lipídica não pode sofrer digestão *in vitro*, e por isso o fármaco incorporado pode ficar retido no núcleo das partículas. Contudo, a liberação *in vivo* poderia ser muito mais rápida devido à degradação da matriz lipídica causada pela digestão enzimática. Isto foi confirmado em nanopartículas contendo insulina, onde sua atividade hipoglicêmica foi sustentada apenas por 36 h após administração intramuscular. Os autores constataram que não houve correlação *in vitro* x *in vivo*, justificando a necessidade de estudos em animais para prever o tempo de sustentação da forma farmacêutica desenvolvida.

Considerando que o objetivo deste trabalho é o de avaliar o potencial da utilização dos sistemas microparticulados como veículo para a liberação modificada, os estudos de liberação *in vitro* constituem um passo importante. A velocidade de degradação das micropartículas é, através da difusão do fármaco, um parâmetro relevante e determinante da liberação *in vivo*. Porém, o estudo *in vivo* é necessário para prever o tempo de sustentação no organismo, avaliando a biodisponibilidade e biodistribuição.

A pesquisa e o estabelecimento de novas terapias têm mudado de paradigma, buscando caminhos mais racionais. O desenvolvimento de novos sistemas de liberação, que permitam sustentar a liberação por um longo período, numa faixa e concentração adequados para cada terapia, direcionada ao sítio alvo, tem sido objeto de pesquisa durante as últimas três décadas, e continuam como uma importante estratégia na otimização de terapias (NETZ, 2004).

5. CONCLUSÃO

O grande número de experimentos realizados por CLAE visando a quantificação da enoxaparina sódica não apresentaram resultados satisfatórios para este estudo. A técnica analítica utilizada então foi a turbidimetria, uma opção de escolha diante das dificuldades encontradas. Trata-se de uma técnica antiga, porém com ampla aplicação e descrita em trabalhos publicados recentemente. A técnica mostrou especificidade e repetibilidade, possibilitando sua utilização em nossos estudos. Há uma grande carência de estudos envolvendo análise quantitativa da heparina intacta na literatura, o que dificultou encontrar as condições ideais que permitissem a validação do método.

Nos estudos envolvendo a encapsulação da enoxaparina em micropartículas de PLGA foi possível obter partículas com forma esférica, superfície lisa e regular e sem a presença de agregados.

As formulações iniciais apresentaram baixa eficiência de encapsulação do fármaco explicada por sua difusão na fase aquosa externa antes da precipitação do polímero. A adição da solução tampão fosfato salino nesta fase possibilitou o aumento da eficiência de encapsulação, alcançando 50,2%, com um rendimento de 71,3% na formulação 20. A proporção fármaco/ polímero também pode ser reduzida nesta formulação, de 1:10 nas formulações anteriores para 1:4. Isto constitui uma vantagem, pois há uma redução considerável no custo da formulação.

O perfil de liberação *in vitro* da enoxaparina sódica a partir das micropartículas de PLGA foi avaliado por 35 dias e apresentou cinética de liberação de pseudo ordem zero, modelo de Higuchi (1961), indicando que a difusão foi o principal mecanismo de liberação.

Os estudos *in vivo* são necessários para prever o tempo de sustentação da forma farmacêutica desenvolvida em condições fisiológicas reais e avaliar a biodisponibilidade e biodistribuição do fármaco no organismo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN JÚNIOR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8 ed., Porto Alegre: Artmed, 2007. 776 p.

ANDRÉO-FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. **Infarma**, São Paulo, v. 9, p. 18-21, 1999.

ARDRY, M. Dosage de l'héparine: étude critique. **Bulletin de L'Ordre**, Paris, v.135, p. 699-708, 1967.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Tromboembolismo venoso: Profilaxia em pacientes clínicos – Parte I. In: _____ **Projeto Diretrizes**, volume IV, São Paulo: AMBCFM, 2005. 424p. Capítulo 37, p. 1-10. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/37-tramboembolismo-partel.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2008.

AUTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

BOTTINI, P.B.; DAVANE, J.G.; CORRIGAN, I. Sustained absorption does not necessarily reduce the systemic availability of propranolol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 10, p. 1757-1775, 1984.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Resolução RE n. 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 20 jan. 2008.

BÜLLER, H.R.; AGNELLI, G; HULL, R.D., HYERS, T.M.; PRINS, M.H.; RASKOB, G.E. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the seventh AACP conference on antithrombotic e thrombolytic therapy. **Chest**, Chicago, v.126, n.3, p. 401S-428S, set. 2004. Suplemento.

CAMARA, J.E.; SATTERFIELD, M.B.; NELSON, B.C. Quantitative determination of disaccharide content in digested unfragmented heparin and low molecular weight heparin by direct-infusion electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v.43, p. 1706-1714, 2007.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCAR, 2001. 77p.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, [S.l.], v. 689, p.175 – 180, 1997.

CHARLOT, G. Turbidimetry and nephelometry. In: _____. **Colorimetric determination of elements: principles and methods**. Elsevier Publishing Company: Amsterdam, 1964. Capítulo 6. p. 73-75.

COMP, P.C. Treatment and management of acute venous thromboembolic disease. **Thrombosis Research**, New York, v.111, n.1-2, p.3-8, jan. 2003.

COUVREUR, P.; FATTAL, E.; ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 8, n. 9, p. 1079-1086, set. 1991.

CREAGER, M.A.; DZAU, V.J. Doenças vasculares dos membros. In: BRAUNWALD, E. et al. **Harrison Medicina Interna**. 15 ed., v.1, Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2002. Capítulo 248, p. 1516-1524.

DANCKWERTS, M.; FASSIHI, A. Implantable controlled release drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 17, n. 11, p. 1465-1502, 1991.

DEAN, S.T.H. **Controlled Release System: Fabrication Technology**. v.1, 2 ed. Flórida: Boca Raton, 1988.

DU BREUIL, A.L.; UMLAND, E.M. Outpatient management of anticoagulation therapy. **American Family Physican**, [S.l.], v.75, n.7, p. 1031-1042, abr. 2007.

ELG, M.; GUSTAFSSON, D.; CARLSSON, S. Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitor and warfarin in the rat. **Thrombosis Research**, New York, v. 94, n. 3, p.187-197, maio 1999.

FALKON, L. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of a new low molecular weight heparin (RO-11). A three way cross-over study in healthy volunteers. **Thrombosis Research**, New York, v. 78, n. 1, p.77-86, abr. 1995.

FEBRAFARMA (Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica). **A Indústria Farmacêutica no Brasil**. Brasília, 2007. 2 ed.,. 25p.

FORD, J.L.; TIMMIMS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis**. 1.ed. Chichester: John, Sons, 1989.

FOWKES, F.J.; PRICE, J.F.; FOWKES, F.G. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: systematic review. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**., [S.l.], v.25, p. 1-5, 2003.

FREITAS, M.N.; Marchetti, J.M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.295, p.201-211, 2005.

FUKUZAKI, H. et al. *In vivo* characteristics of high molecular weight copoly (L-lactide/glycolide) with S-type degradation pattern for application in drug delivery systems. **Biomaterials**, Guilford, v. 12, n. 4, p. 433-437, maio 1991.

GÖPFERICH, A. Erosion of composite polymer matrices. **Biomaterials**, Guilford, v. 18, n. 5, p. 397-403, mar. 1997.

GORDON, L.A.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

HANSSON, P. O.; WELIN, L.; FIBBLIN, G.; ERIKSSON, H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. The study of men born in 1913. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.157, n. 15, p.1665-1670, ago. 1997.

HERRMANN, J.; BODMEIER, R. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 45, p. 75-82, 1998.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961.

HIGUCHI, T., DAYAL, S., PITMAN, I. H. Effects of solute-solvent complexation reactions on dissolution kinetics: testing of a model by using a concentration jump technique. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 61, n. 5, p. 695-700, 1972.

HIRSH, J. Heparin. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.324, n. 22, p.1565-1574, mai. 1991b.

HIRSH, J. New anticoagulants. **American Heart Journal**, Durham, v.142, n.2, p.53-58, ago. 2001. Suplemento.

HIRSH, J. Oral anticoagulant drugs. **The New England Journal of Medicine**, Boston, n. 26, v.324, p.1865-1875, jun. 1991a.

HIRSH, J.; BATES, S.M. The emerging role of low-molecular-weight heparin in cardiovascular medicine. **Progress in Cardiovascular Diseases**, New York, v.42, n. 4, p.235 - 246, fev. 2000.

HIRSH, J.; RASCHKE, R. Heparin and low-molecular-weight heparin: The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. **Chest**, Chicago, v. 126, n. 3, p. 188S-203S, 2004. Suplemento.

HIRSH, J.; RASCHKE, R.; WRAKEUTIN, T.E.; DALEN, J.E.; DEYKIN, D.; POLLER, L. Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy and safety. **Chest**, Chicago, v.108, n.4, p. 258-275, out. 1995. Suplemento.

HOFFART, V.; LAMPRECHT, A.; MAINCENT, P.; LECOMPTE, T.; VIGNERON, C.; UBRICH, N. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin a polymeric delivery system. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.113, p.38-42, abr. 2006.

HOFFART, V. et al. Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. **Drug Delivery**, [S.l.], v.10, p. 1-7, 2003.

HNATYSZYN, J.H.; KOSSOVSKY, N.; GELMAN, A.; SPONLER, E. Drug delivery systems for the future. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v. 48, n. 5, p.247-254, Set./Out., 1994.

INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT. **Health Care Guideline: VTE Thromboembolism**. 8 ed. Bloomington: ICSI, jun. 2007. 91p.

INTES, O; RENAULT, J.; SINQUIN, C.; ZÈCHES-HANROT, M.; NUZILLARD, J. Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 918, p. 47-57, mar. 2001.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, Guilford, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, dez. 2000.

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative by approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Amsterdam, v. 24, n.8, p. 703-727, ago.1998.

KARAMANOS, N.K.; VANKY, P.; TZANAKAKIS, G.N.; TSEGENIDIS, T.; HJERPE, A. Ion-pair high-performance liquid chromatography for determining disaccharide composition in heparin and heparan sulphate. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 765, p. 169-179, 1997.

KISSEL, T.; MARETSCHKE, S.; PACKHÄUSER, C.; SCHNIEDERS, J.; SEIDEL, N. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2 ed., Boca Raton: CRC Press -Taylor & Francis Group, 2006, 741p. Capítulo 14, p. 98-122.

KNOBLOCH, J.E.; SHAKLEE, P.N. Absolute molecular weight distribution of low-molecular-weight heparins by size-exclusion chromatography with multiangle laser light scattering detection. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 245, p. 231-241, 1997.

LAGE, S.G. *et al.* Estudo de Segurança e Eficácia da Enoxaparina Sódica na Profilaxia e Terapêutica Antitrombótica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v.19, n.1, p.67-73, mar.2007.

LARAUS, J.; COOPER, J. Absorption, testing and clinical evaluation of oral prolonged action drug. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 50, p. 215-232, 1961.

LENSING, A.W.A.; PRANDONI, P.P.; PRINS, M.H.; BÜLLER, H.R. Deep-vein thrombosis. **The Lancet**, [S.l.], v.353, p. 479-485, 1999.

LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; MAINCENT, P. Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** (2007), doi: 10.1016/j.ejpb.2007.04.004.

LEE, V.H.L.; DODDA-KASHI, S.; GRASS, G.M.; RUBAS, W. Oral route of peptides and protein drug delivery. In: LEE, V.H.L. **Peptide and protein drug delivery**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.691-738.

LIEBERMAN, H.A.; LACHMAN, L.; SCHATZ, J.B. **Pharmaceutical dosage forms: tablets**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 332-335, 559-45.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 143 – 154, abr./jun., 2005.

LUONG-VAN, E.; GRØNDAHL, L.; NURCOMB, V.; COOL, S. In vitro biocompatibility of microencapsulated heparan sulfate. **Biomaterials**, Guilford, v. 28, p. 2127 - 2136, jan. 2007.

MAFFEI, F.H.A. A evolução do tratamento anticoagulante do tromboembolismo venoso. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v.1, n.2, p.85-86, set. 2002.

MAGILL, M. Microencapsulation for the personal care industry. **Cosmetics & Toiletries**, New York, v.105, p.59-62, jun.1990.

MAJERUS, P.W.; TOLLEFSEN, D.M. Anticoagulantes, Trombolíticos e Fármacos Antiplaquetários. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. Capítulo 55, p. 1141-1157.

MALSH, R.; HARENBERG, J.; PIAZOLO, L.; HUHLE, G.; HEENE, D.L. Chromatographic and eletrophoretic applications for the analysis of heparin and dermatan sulfate. **Journal of Chromatography B**, [S.l.], v. 685, p.223-231, 1996.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MANO, J.; SOUSA, R.; BOESEL, L.; NEVES N. Bioinert, Biodegradable and Injectable Polymeric Matrix Composites for Hard Replacement: State of the Art and Recent Developments. **Composites Science and Technology**, [S.l.], v. 64, p. 789–817, 2004.

MELO, E.I.; PEREIRA, M.S.; CUNHA, R.S.; SÁ, M.P.L.; MOURÃO, P.A.S. Controle de qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v.23, n.2, p.169-174, 2008.

MONEY, S.R.; YORK, J.W. Development of oral heparin therapy for prophylaxis and treatment of deep venous thrombosis. **Cardiovascular surgery**, London, v.9, n.3, p.211-218, jun. 2001.

MOTTA; A.C.; DUEK, E.A.R. Síntese, caracterização e degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 340 – 350, 2006. Disponível em: <<http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10703>> Acesso em: 11 jan. 2008.

MOURIER, P.A.J.; VISKOV, C. Chromatography analysis and sequencing approach of heparin oligosaccharides using cetyltrimethylammonium dynamically coated stationary phases. **Analytical Biochemistry**, [S.I.], v. 332, p.299-313, 2004.

MUELLER, R.L.; SCHEIDT, S. History of drugs for thrombotic disease, discovery, development and directions for the future. **Circulation**, Dallas, v.89, n. 1, p.432- 449, jan. 1994.

NARASIMHAN, B.; PEPPAS, N.A. Molecular analysis of drug delivery systems controlled by dissolution of polymer carrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 86, n.3, p.297- 304, 1997.

NETZ, D.J.A. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de um sistema polimérico implantável contendo 17 b-estradiol**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), 2004 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O’CONNORS, D.J.; SEXTON, B.A. **Surface Analysis Methods in Materials Science**. Springer, 1992.

PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFMAN, B.B. **Farmacologia Integrada**. ED. Manole, São Paulo, 1999. p. 203-213. 606 p.

PANG, D.C. Advances in drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, Bethesda, v.32, p. 62-68, jan. 1998.

PATEL, R.P.; NARKOWICZ, C.; HUTCHINSON, J.P.; HILDER, E.F.; JACOBSON, G.A. A simple capillary electrophoresis method for the rapid separation and determination of intact low molecular weight and unfractionated heparins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.I.], v.46, p. 30-35, 2008.

PEREIRA, C.A.; BRITO, S.S.; MARTINS, A.S.; ALMEIDA, C.M. Profilaxia da trombose venosa profunda: aplicação prática e conhecimento teórico em um hospital geral. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v.7, n.1, p. 18-27, mar. 2008.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEN-QUINTANAR, A.; ALLÉMAND, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. **Journal of Microencapsulation**, London, v.15, p.107-119, 1998.

RAMCHANDANI, M.; ROBINSON, D. *In vitro* and *in vivo* release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 54, n.2, p. 167-175, jul. 1998.

RANADE, V.V.; HOLLINGER, M.A. **Drug delivery systems**. 2 ed., Boca Raton: CRC Press LLC, 2004.

RICCI-JÚNIOR, E. ; LUNARDI, L. O. ; NANCLARES, D. M. A. ; MARCHETTI, J. M. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 288, p. 235-244, 2005.

RICCI-JÚNIOR, E. MARCHETTI, J.M. Preparation, characterization, photocytotoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc (II) phthalocyanine for photodynamic therapy use. **Journal of Microencapsulation**, [S.l.], v. 23, n.5, p.523-538, 2006. (a)

RICCI-JÚNIOR, E. MARCHETTI, J.M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.310, p.187–195, 2006. (b)

SEGAL, J.B; STREIFF, M.B.; HOFMANN, L.V.; THOMTON, K.; BASS, E.B. Management of venous thromboembolism: a systematic review for a practice guideline. **Annals of Internal Medicine**, [S.l.], v. 146, n.3, p. 211-222, fev. 2007.

SHAH, P.V. et al. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v.81, n.3, p.309-314, 1992.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **The International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.154, n. 2, p.123-140, ago. 1997.

SINHA, V.R.; KHOSLA, L. Bioabsorbable polymers for implantable therapeutic systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 24, n.12, p. 1129-1138, dez. 1998.

SMITH, P. L.; WALL, D. A.; GOCHOCO, C. H.; WILSON, A. Routes of delivery: case studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v.8, n. 2-3, p.253-290, mar.-jun. 1992.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley and Sons, 1997. p. 293-341.

SOPPIMATH, S.H; AMINABHAVI, M.T; KULKARNI, R.A; RUDZINSKI, E.W. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p.1-20, jan. 2001. Review.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPITIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.43, n.4, p. 515-527, out./dez., 2007.

STAICO, R. et al. Heparina Não-Fracionada e de Baixo Peso Molecular: Equivalência ou Superioridade na Intervenção Coronária Percutânea? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. São Paulo. v.12, n.3. p.138-145, 2004.

THANAWIROON, C. et al. Liquid chromatography/mass spectrometry sequencing approach for highly sulfated heparin-derived oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 279, p. 2608-2615, 2004.

THANAWIROON, C., LINHARDT, R.J. Separation of a complex mixture of heparin-derived oligosaccharides using reversed phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam; New York, v. 1014, n.1-2, p. 215-223, out. 2003.

UBRICH, N.; MAINCENT, P. Recent advances in heparin delivery. In: BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2 ed., Boca Raton: CRC Press -Taylor & Francis Group, 2006, 741p. Capítulo 14, p. 481-520.

VENIER-JULIENNE, M.C.; BENOIT, J.P. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, Zürich, [S.l.], v. 71, n.2, p. 121-128, jul. 1996.

VOLPI, N.; MACCARI, F. Eletrophoretic approaches to the approaches to the analysis of complex polysaccharides. **Journal of Chromatography B**, [S.l.], v. 834, p.1-13, 2006.

WANNMACHER, L. Heparinas de baixo peso molecular: evidências que fundamentam indicações. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados. Ministério da Saúde**, Brasília, v.4, n.2, p.1-6, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v4n2_heparinas.pdf> Acesso em 11 jan. 2009.

WEITZ, J. I. Low-molecular-weight heparins. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.337, n. 10, p.688-698, set. 1997.

WEITZ, J.I.; HIRSH, J. New anticoagulant drugs. **Chest**, Chicago, v.119, p.95-107, 2001; Suppl 1.

WESSLEN, S.; SANFORD, N.G. Pharmacology of heparin and warfarin. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v.8, p.10B-20B, dez. 1986. 6º Suplemento B.

WHITE, R.H. The epidemiology of venous thromboembolism. **Circulation**, Dallas, v.107, n.23, p. I4-I8, jun. 2003. Suplemento.

WILLARD, H.H.; MERRITT Jr., L.L.; DEAN, J.A.; SETTLE Jr., F.A. Ultraviolet and visible absorption methods. In: _____. **Instrumental methods of analysis**. 7 ed. Belmont: Wadsworth, 1988. Capítulo 7. p. 186-195.

WILLIAMS, D.F. Biodegradability and toxicity of polymers as adjuvants for parenteral drug delivery systems. In: MÜLLER, B. W., Ed. Controlled drug delivery. **International Symposium of the Association for Pharmaceutical Technology (APV)**, Bad Homburg, 12-14 November, 1984. Stuttgart: Wissenschaftliche, p. 49-55, 1987.

WON JUN, H. The roles of drug delivery systems in pharmacotherapeutics. **Pharmaceutical Technology**, New York, p. 42, 1995.

YOUNG, E.; COSMI, B.; WEITZ, J.; HIRSH, J. Comparison of the nonspecific binding of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin (Enoxaparin) to plasma proteins. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.70, n. 4, p.625-630, out. 1993.

ZIEGLER, A.; ZAIA, J. Size-exclusion chromatography of heparin oligosaccharides a high and low pressure. **Journal of Chromatography B**, [S.l.], v. 837, p. 76-86, 2006.