UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Síntese e caracterização de derivados de hemoglobina
para aplicação terapêutica**

Marcos Camargo Knirsch

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Knirsch, Marcos Camargo
K69s Síntese e caracterização de derivados de hemoglobina para
aplicação terapêutica / Marcos Camargo Knirsch. -- São Paulo,
2015.
96p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Polakiewicz, Bronislaw

1. Biotecnologia farmacêutica 2. Orgãos artificiais I. T. II.
Polakiewicz, Bronislaw, orientador.

615.1 CDD

Marcos Camargo Knirsch

Síntese e caracterização de derivados de hemoglobina para aplicação
terapêutica.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz, orientador notável, pelo apoio, incentivo, auxílio, orientação, paciência, disponibilidade, ensinamentos e amizade sempre presentes ao longo de meus estudos e que me servem de exemplo;

Ao Prof. Dr. Attilio Converte, pela orientação, confiança, incentivo, ensinamentos, e amizade, em especial pelo acolhimento, apoio e disponibilidade durante toda minha estadia em Gênova;

À Prof. Dra. Nádia Bou-Chacra, pelo incentivo, auxílio, amizade e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Stephano, pelo auxílio, confiança e incentivo e amizade;

À Profa. Dra. Patrizia Perego, pela recepção, auxílio e acolhimento em Gênova;

Aos professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico pelo incentivo e colaboração;

À minha família, pelo apoio e incentivo recebido durante o doutorado, em especial a meu pai pelo incentivo e aos meus irmãos Renata e Rafael, cuja amizade, companheirismo e cumplicidade são para mim de valor inestimável;

À família Polakiewicz, pela amizade e ensinamentos recebidos durante toda minha formação escolar e acadêmica, o meu mais profundo agradecimento por toda a riqueza transmitida;

À amiga Natalia Marchesan, pela paciência, companheirismo, auxílio, confiança e amizade sempre presentes;

Ao amigo Filippo Dellanno, pelo companheirismo, apoio, incentivo e amizade. Obrigado pelos grandes momentos em Gênova;

Aos amigos Abdul Rehman e Zeshan Ahmad, pela amizade e companheirismo e pelos excelentes momentos que passamos juntos. Obrigado pelo karahi e paratha;

(To my friends Abdul Rehman and Zeshan Ahmad, for the friendship and companionship and for the great moments we spent together. Thanks for the karahi and paratha!)

Aos amigos da Universidade de Genova, Bahar, Alberto, Pierfrancesco “Piffa” Ferrari, Marco e Mattia;

Aos amigos e companheiros da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas;

Às agências de fomento, CAPES, FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro.

*"I have never in my life learned anything
from any man who agreed with me"*

Dudley Field Malone

RESUMO

KNIRSCH, M. C. **Síntese e caracterização de derivados de hemoglobina para aplicação terapêutica**. 2015. 95p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A transfusão de sangue é uma intervenção terapêutica capaz de salvar muitas vidas. Entretanto, transfusões também apresentam uma alta gama de possíveis eventos adversos, questões logísticas, econômicas e sociais. Dentre as principais preocupações terapêuticas estão a incompatibilidade (principalmente do sistema ABO), a transmissão de microrganismos patogênicos, os distúrbios imunomodulatórios, as reações hemolíticas, o aumento estatístico do risco de morte proporcional ao volume de sangue infundido, dentre outros. Diversas alternativas às transfusões sanguíneas são propostas na literatura científica, dentre elas o desenvolvimento de transportadores de oxigênio que utilizam a hemoglobina, comumente intitulados *substitutos sanguíneos*. Neste âmbito, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma rota de síntese e a síntese de partículas de gelatina contendo hemoglobina polimerizada. Para tanto, realizou-se a síntese do polietileno glicol bis-[succinimidil succinato], extraiu-se e polimerizou-se com glutaraldeído ou polietileno glicol bis-[succinimidil succinato] hemoglobina de sangue bovino e, partículas de gelatina coriácea ou óssea contendo hemoglobina polimerizada foram sintetizadas e caracterizadas. A síntese do polietileno glicol bis-[succinimidil succinato] (SSPEG) foi caracterizada por espectroscopia RAMAN, análise diferencial de calorimetria (DSC) e os resultados obtidos indicaram o sucesso das reações. O produto da reação de polimerização da hemoglobina e albumina com o SSPEG foi verificado por SDS-PAGE e os resultados obtidos indicaram a formação com sucesso de polímeros de alta massa molecular. As partículas contendo hemoglobina polimerizada geradas com gelatina coriácea apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 1370 nm, dispersividade de 0,029 e potencial zeta de -36,1 mV. As partículas contendo hemoglobina polimerizada geradas com gelatina óssea apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 438 nm, dispersividade de 0,563 e potencial zeta de -24,5 mV. Os resultados obtidos sugerem a aplicabilidade da gelatina coriácea para a produção de partículas contendo hemoglobina polimerizada com possível aplicação como transportador de oxigênio.

Palavras-chave: transportador de oxigênio, micropartícula, gelatina, polietileno glicol, poli-hemoglobina

ABSTRACT

KNIRSCH, M. C. **Synthesis and characterization of hemoglobin based oxygen carriers for therapeutic application.** 2015. 95p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Blood transfusion is a therapeutic intervention that can save many lives. However, transfusion is also related to several possible adverse therapeutic events and logistic, economic and social concerns. Among the major therapeutic concerns are incompatibility (mainly of the ABO group system), pathogenic microorganisms' transmission, immunomodulatory disturbances, hemolytic reactions, death risk increase that is proportional to the infused volume, among others. Several alternatives to blood transfusion are proposed in the scientific literature. Among them is the development of hemoglobin based oxygen carriers, commonly entitle *blood substitutes*. To this extent, the present work aimed to develop a synthetic route and to synthesize gelatin particles containing polymerized hemoglobin. To this purpose PEG bis(succinimidyl succinate) was synthesized, bovine hemoglobin was extracted and polymerized with glutaraldehyde or PEG and polyhemoglobin contained particles of gelatin from leather or bones were synthesized and characterized. PEG bis(succinimidyl succinate) synthesis was characterized by RAMAN spectroscopy and by differential scanning calorimetry (DSC) and the obtained results indicated the successful synthesis. The reaction product of the polymerization of hemoglobin or albumin with PEG was verified by SDS-PAGE and the results indicated the successful formation of high molecular mass polymers. The particles generated with leather gelatin and polyhemoglobin had a hydrodynamic diameter of 1370 nm, dispersity of 0.029 and zeta potential of -36.1 mV. Particles generated with bone gelatin and polyhemoglobin had hydrodynamic diameter of 438 nm, dispersity of 0.563 and zeta potential of -24.5 mV. The obtained results suggest the applicability of leather gelatin for the production of polyhemoglobin containing particles aiming to the development of a hemoglobin based oxygen carrier.

Key-words: oxygen carrier, microparticle, gelatin, polyethylene glycol, polyhemoglobin

RIASSUNTO

KNIRSCH, M. C. **Sintesi e caratterizzazione di derivati dell' emoglobina per l' applicazione terapeutica.** 2015. 95p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

La trasfusione di sangue è un intervento terapeutico in grado di salvare molte vite. Comunque le trasfusioni presentano un' alta gamma di possibili reazioni avverse, questioni legate alla logistica, all' economia e alla società. Tra le principali complicazioni terapeutiche si trovano incompatibilità (in generale riguardante il sistema ABO), trasmissione di micro-organismi patogeni, disturbi immunomodulatori, reazioni emolitiche, un aumento statistico del rischio di morte proporzionale al volume di sangue infuso ecc. ecc. Diverse alternative alle trasfusioni di sangue sono proposte nella letteratura scientifica, tra queste si evidenzia la possibilità di utilizzare traspostatori di ossigeno basati sull' emoglobina comunemente chiamati sostituti sanguigni. In questo ambito, il presente studio ha lo scopo di sviluppare una via sintetica atta a sintetizzare particelle di gelatina capaci di incapsulare emoglobina polimerizzata. Pertanto si è messo a punto la sintesi del poli-etilen-glicol bis-[succinimidil succinato] (SSPEG), si è estratta e successivamente polimerizzata, con glutaraldeide/polietilen glicolo, emoglobina da sangue bovino e infine si è proceduto con la sintesi e caratterizzazione di particelle di gelatina ottenute dal cuoio o dall' osso. Per confermare la corretta sintesi del SSPEG ci si è avvalsi della spettroscopia di RAMAN e dell' analisi differenziale di calorimetria (DSC). I risultati hanno dimostrato il successo del procedimento. Il prodotto della reazione di polimerizzazione dell' emoglobina e albumina con SSPEG è stato verificato con SDS-PAGE. I risultati ottenuti indicano la formazione di polimeri con alta massa molecolare corrispondenti alle aspettative. Le particelle di gelatina (di cuoio) contenenti emoglobina polimerizzata presentano un diametro idrodinamico di 1370nm, una dispersione di 0.029 e un potenziale zeta di -36.1mV. Per quanto concerne le particelle di gelatina (di osso) contenenti emoglobina polimerizzata, esse hanno presentato un diametro idrodinamico di 438nm, una dispersione di 0.56 e un potenziale zeta di -24.5mV. I risultati ottenuti suggeriscono che è possibile produrre trasportatori di ossigeno servendosi di gelatina di cuoio per la preparazione di particelle contenenti emoglobina polimerizzata.

Parole-chiavi: trasportatori di ossigeno, microparticelle, gelatina, polietilen glicole, poliemoglobina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Reação do polietilenoglicol com anidrido succínico para a formação de bis-succinil PEG.	34
Figura 02	Reação do derivado succinimidil do polietilenoglicol com N-hidroxisuccinimida (NHS) e diciclohexilcarbodiimida (DCC) para formação do PEG bis-[succinimidil succinato].	36
Figura 03	Resultados de análise calorimétrica (DSC). A linha vermelha indica o comportamento do polietilenoglicol 6000 (produto de partida, P6000) e a linha azul indica o comportamento observado para o bis-succinil polietilenoglicol 6000 (resultado reacional, SP6000).	47
Figura 04	Resultados da análise de espectrometria RAMAN. A linha azul indica o comportamento do polietilenoglicol 6000 (produto de partida) e a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietilenoglicol 6000 (resultado reacional).	48
Figura 05	Aproximação na faixa de número de onda entre 1400 e 2000 cm^{-1} do resultado da análise de espectrometria RAMAN. A linha azul indica o comportamento do polietilenoglicol 6000 (produto de partida) e a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietilenoglicol 6000 (resultado reacional).	49
Figura 06	Resultados da análise calorimétrica (DSC). A linha azul (pico à direita, P6000) indica o comportamento do polietileno glicol 6000; a linha vermelha e marrom (picos na região central, SP6000 e SNP6000) indicam ambas o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 e a linha verde (pico à esquerda, SSP) indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000.	50
Figura 07	Resultados da análise de espectrometria RAMAN na faixa de número de onda de 200 a 1000 cm^{-1} . A linha azul indica o comportamento do polietileno glicol 6000 (amostra S-PEG 6000), a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 (amostra S-PN 6000) e a linha preta indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000 (amostra SSP).	51
Figura 08	Resultado da análise de espectrometria RAMAN na faixa de número de onda de 1100 a 1900 cm^{-1} . A linha azul indica o comportamento do polietileno glicol 6000 (amostra S-PEG 6000), a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 (amostra S-PN 6000) e a linha preta indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno	52

	glicol 6000 (amostra SSP).	
Figura 09	Resultado da análise de espectrometria RAMAN na faixa de número de onda de 2400 a 3600 cm^{-1} . A linha azul indica o comportamento do polietileno glicol 6000 (amostra S-PEG 6000), a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 (amostra S-PN 6000) e a linha preta indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000 (amostra SSP).	53
Figura 10	Resultados da SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. As bandas representam da esquerda para a direita, de forma alternada, albumina / albumina peguilada, em concentrações progressivamente maiores.	54
Figura 11	Resultados da SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7%. As bandas representam da esquerda para a direita: padrão de massa molecular; padrão de albumina; reação sspg-albumina concentração 1:1 (mol/mol); reação sspg-albumina concentração 2:1 (mol/mol); reação sspg-albumina concentração 3:1 (mol/mol); reação sspg-albumina concentração 4:1 (mol/mol); reação sspg-albumina concentração 5:1 (mol/mol); reação sspg-albumina concentração 6:1 (mol/mol).	55
Figura 12	Resultados da SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% com hemoglobina e conjugados. Da esquerda para a direita: 1) padrão de massa molar (de cima a baixo: 178, 121, 80, 53, 41, 25 kDa; 2) hemoglobina padrão (Sigma-Aldrich); 3) hemoglobina polimerizada com glutaraldeído; 4) hemoglobina polimerizada com SSPEG.	56
Figura 13	Resultados da análise de tamanho de partícula por técnica de DLS para partículas formada por gelatina e hemoglobina não polimerizada.	57
Figura 14	Resultados da análise de potencial zeta para a nanoestrutura da gelatina com hemoglobina.	58
Figura 15	Análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação em pH 7,75.	59
Figura 16	Análise de potencial zeta para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação em pH 7,75.	59
Figura 17	Resultados da análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 100 μL de glutaraldeído à temperatura de 50°C.	60
Figura 18	Resultados da análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 200 μL de glutaraldeído (padrão) à temperatura de 50°C.	61
Figura 19	Resultados da análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo	61

	método de dupla dessolvatação utilizando 300 µL de glutaraldeído à temperatura de 50°C.	
Figura 20	Resultados da análise de potencial zeta para partículas formadas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 100 µL de glutaraldeído à temperatura de 50°C.	63
Figura 21	Resultados da análise de potencial zeta para partículas formadas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 200 µL de glutaraldeído à temperatura de 50°C.	63
Figura 22	Resultados da análise de potencial zeta para partículas formadas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 300 µL de glutaraldeído à temperatura de 50°C.	64
Figura 23	Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000.	65
Figura 24	Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído.	66
Figura 25	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000.	67
Figura 26	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído.	67
Figura 27	Resultados da análise de tamanho de partículas para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em solução salina 0,9%.	69
Figura 28	Resultados da análise de tamanho de partículas para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em tampão PBS pH 7,5.	70
Figura 29	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em solução salina 0,9%.	70
Figura 30	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em tampão PBS pH 7,5.	71
Figura 31	Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em solução salina 0,9%.	71
Figura 32	Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo	72

	partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em tampão PBS pH 7,5.	
Figura 33	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em solução salina 0,9%.	72
Figura 34	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em tampão PBS pH 7,5.	72
Figura 35	Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas “em branco” de gelatina óssea bovina e suína produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.	74
Figura 36	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas “em branco” de gelatina óssea bovina e suína produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.	75
Figura 37	Resultado de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina óssea bovina e suína e hemoglobina polimerizada produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.	76
Figura 38	Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina óssea bovina e suína e hemoglobina polimerizada produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.	76
Figura 39	Espectros obtidos para a cianometemoglobina, o sobrenadante proveniente da centrifugação da suspensão de partículas após diluição em reagente de Drabkin, o sobrenadante proveniente da centrifugação da suspensão de partículas após a adição de ácido tânico e diluição em reagente de Drabkin.	78
Figura 40	Análise espectrofotométrica de amostras de soluções de carboxihemoglobina e inositol hexafosfato após período de exposição de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos à temperatura de 0,5 °C à luz de intensidade 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ gerada por lâmpada fluorescente.	80
Figura 41	Resultados obtidos na análise espectrofotométrica de amostras de soluções de carboxihemoglobina e inositol hexafosfato após período de exposição de 0 e 40 minutos à temperatura de 0,5 °C à luz de intensidade 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ gerada por lâmpada fluorescente.	81
Figura 42	Espectros na faixa de comprimento de onda de 650 a 450 nm da metemoglobina, cianometahemoglobina, oxihemoglobina e	82

carboxihemoglobina.

Figura 43

Espectros na faixa de comprimento de onda de 650 a 450 nm das partículas de gelatina “em branco” ou contendo carboxihemoglobina não polimerizada, metemoglobina não polimerizada, carboxihemoglobina polimerizada com glutaraldeído, carboxihemoglobina polimerizada com PEG.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Considerações iniciais</i>	1
1.2	<i>Breve histórico das transfusões</i>	3
1.3	<i>Riscos e problemas associados às transfusões</i>	6
1.3.1	<i>Reações e riscos transfusionais</i>	6
1.3.2	<i>Efeitos de estocagem</i>	9
1.3.3	<i>O custo e a disponibilidade do sangue</i>	11
1.4	<i>O desenvolvimento de transportadores de oxigênio e o setor militar</i>	15
1.5	<i>Transportadores de oxigênio</i>	17
1.5.1	<i>Hemoglobina</i>	18
1.5.2	<i>Hemoglobina e sua remoção natural</i>	20
1.5.3	<i>Os Transportadores de oxigênio que utilizam hemoglobina</i>	22
1.5.4	<i>Mecanismos de toxicidade da hemoglobina livre e dos transportadores de oxigênio que utilizam hemoglobina</i>	25
1.5.4.1	<i>Ação hipertensiva</i>	25
1.5.4.2	<i>Reações de radiculares (Reação de Fenton)</i>	28
2.	OBJETIVOS	30
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	<i>Extração e Purificação da Hemoglobina</i>	31
3.1.1	<i>Obtenção de hemoglobina carbonilada (HbCO)</i>	31
3.2	<i>Determinação da concentração de hemoglobina por reagente de Drabkin</i>	33
3.3	<i>Obtenção de derivado succinimídico do polietilenoglicol</i>	34
3.3.1	<i>Obtenção do succinil derivado do polietilenoglicol</i>	34
3.3.2	<i>Obtenção do derivado succinimídico do polietilenoglicol (PEG bis-[succinimidil succinato])</i>	35
3.4	<i>Verificação da ativação da Bis-succinimidil succinato de PEG</i>	37
3.4.1	<i>Reação com albumina e verificação por SDS-PAGE</i>	37

3.4.2	<i>Reação com hemoglobina e verificação por SDS-PAGE</i>	37
3.5	<i>Formação da hemoglobina polimerizada</i>	38
3.6	<i>Nano estruturação da Hemoglobina por método de co-lifilização</i>	38
3.7	<i>Nano estruturação da Hemoglobina por método de dupla dessolvatação</i>	39
3.8	<i>Variações no método de formação de partículas por dupla dessolvatação</i>	40
3.9	<i>Formação de nano- e micro-partículas de gelatina utilizando como agente de cross-link o PEG bis-[succinimidil succinato]</i>	41
3.10	<i>Influência do pH e força iônica na produção de partículas contendo hemoglobina polimerizada</i>	42
3.11	<i>Análise da formação de partículas utilizando gelatina de origem óssea bovina e suína</i>	42
3.12	<i>Análise do conteúdo de hemoglobina presente nas partículas de gelatina</i>	43
3.13	<i>Análise espectrofotométrica da afinidade da micropartícula contendo hemoglobina pelo oxigênio</i>	44
3.13.1	<i>Análise da remoção do monóxido de carbono</i>	44
3.13.2	<i>Análise espectrofotométrica da afinidade pelo oxigênio</i>	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	<i>Determinação da concentração de hemoglobina por reagente de Drabkin</i>	46
4.2	<i>Análise do Bis-Succinil PEG 6000 por DSC (Differential Scanning Calorimetry) e espectroscopia RAMAN</i>	46
4.3	<i>Análise do bis-Succinil Succinato de PEG 6000 por DSC (Differential Scanning Calorimetry) e espectroscopia RAMAN</i>	50
4.4	<i>Verificação da ativação da Bis-succinimidil succinato de PEG</i>	54
4.5	<i>Nano estruturação da Hemoglobina não polimerizada</i>	57
4.6	<i>Variações no método de formação de partículas por dupla dessolvatação</i>	58
4.7	<i>Estruturação de partículas contendo hemoglobina polimerizada</i>	64

4.8	<i>Influência do pH e força iônica na produção de partículas contendo hemoglobina polimerizada</i>	69
4.9	<i>Análise da formação de partículas utilizando gelatina de origem óssea bovina e suína</i>	74
4.10	<i>Análise do conteúdo de hemoglobina presente nas partículas de gelatina</i>	77
4.11	<i>Análise da remoção do monóxido de carbono</i>	79
4.12	<i>Análise espectrofotométrica da afinidade da micropartícula contendo hemoglobina pelo oxigênio</i>	82
5.	CONCLUSÕES	85
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
7.	BIBLIOGRAFIA	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Considerações iniciais*

O desenvolvimento de um produto capaz de mimetizar a função sanguínea de transporte de oxigênio e capaz de controlar o volume de líquido circulante nos vasos (produtos comumente intitulados “substitutos sanguíneos”) terá grande impacto sobre diversas áreas médicas. Este impacto será tão grande que alguns autores consideram os “substitutos sanguíneos” como o “cálice sagrado” da traumatologia (CHEN; SCERBO; KRAMER, 2009), sendo o seu mercado global estimado em bilhões de dólares (KLUGER, 2010; RIESS, 2001). O principal objetivo de destes produtos é permitir a sobrevivência do paciente até que ele seja capaz de estabilizar por si mesmo seu meio interno fisiológico ou até que possa sofrer outras intervenções com o mesmo objetivo final.

A hemorragia é a maior causa de morte após acidentes graves, e o controle de sangramentos continua a ser a maior prioridade no tratamento de traumas. Para pacientes severamente feridos, a perda de sangue é a principal causa de morte durante o período conhecido como “*golden hour*” (período crítico que se estende até algumas horas após acidentes). A morte desses pacientes geralmente ocorre em salas de emergência ou salas operatórias decorrente de danos graves aos sistemas vascular ou hepático ou a múltiplos órgãos devido à rápida perda do volume sanguíneo circulante decorrente de hemorragias, que provoca a perda de capacidade de oxigenação de tecidos, choque e posterior morte (WALLER; FAKHRY, 2006). Pacientes em choque hemorrágico geralmente recebem grandes volumes de

soluções cristalóides (solução de Ringer lactato ou Fisiológica) antes que lhes seja administrado sangue, evento que pode requerer diversas horas para que ocorra. O sangue na maioria dos casos não é administrado imediatamente por duas razões básicas, isto é, sua indisponibilidade durante a realização dos primeiros-socorros e a necessidade de verificação de compatibilidade (WINSLOW, 2006a). Ambas as restrições apontadas seriam facilmente evitadas pelos “substitutos sanguíneos”.

Um produto transportador de oxigênio deverá também beneficiar pacientes em condições clínicas nas quais é necessária a aplicação de múltiplas transfusões por longo período de tempo, tais como pacientes com síndrome mielodisplásica e anemia aplásica. Este produto poderia ainda ser utilizado para conservação de órgãos e prevenção ou decréscimo dos danos causados pela reperfusão nos órgãos doados. Grupos religiosos ou étnicos os quais recusam a utilização terapêutica de sangue humano poderiam vir a aceitar este produto, provendo um significativo avanço para estes pacientes (MOZZARELLI, 2008).

No âmbito transfusional, diversas complicações associam-se à utilização terapêutica do sangue. Dentre as principais complicações encontram-se a transmissão de agentes patogênicos, como o HIV (*human immunodeficiency virus*), HBV (*hepatitis B virus*), HCV (*hepatitis C virus*), CMV (*cytomegalovirus*) etc., e complicações relacionadas com a imunomodulação, que podem aumentar o risco inerente à própria infecção, bem como a lesão pulmonar aguda e reações hemolíticas graves (GOODNOUGH; SHANDER; SPENCE, 2003; SILVA et al., 2008). Além destas complicações, a literatura científica apresenta evidências consideráveis indicando correlação entre transfusões e aumento do risco de morte, principalmente

em pacientes cirúrgicos (KOCH et al., 2006a, 2006b; ROBINSON et al., 2005; SILVA et al., 2008; TAYLOR et al., 2002). Repetidas transfusões sanguíneas (como as realizadas em pacientes com síndrome mielodisplásica, anemia aplásica, etc.) também podem levar a sérias complicações, tais como a maior incidência de falência múltipla de órgãos cujo risco aumenta paralelamente ao volume total transfundido. Este fato possivelmente é resultante de uma severa resposta inflamatória sistêmica provocada pelas múltiplas transfusões (CHEN; SCERBO; KRAMER, 2009).

1.2 Breve histórico das transfusões

Por toda a história humana o sangue tem sempre estado relacionado à vida e à vitalidade a tal ponto de ser afirmado que o sangue é a vida (e.g. Leviticus 7:26; Deuteronômios 12:23) (GREENWALT, 1997). Por mais de dois mil anos a prática terapêutica da sangria foi utilizada para o tratamento das mais diversas doenças devido à crença na necessidade de remoção do “sangue ruim” (RIESS, 2001). Comparativamente, o uso terapêutico do sangue é muito recente.

A descoberta da circulação do sangue ocorreu apenas em 1628 pelo médico britânico William Harvey (1578-1657) com a publicação de seu célebre livro “*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*”. Anteriormente a Harvey, a maioria dos médicos acreditava que os pulmões eram os responsáveis pelo movimento do sangue e que este último era reabsorvido nos tecidos (RIBATTI, 2009).

Apesar de controversa, a primeira transfusão em humanos realizada com

sucesso é geralmente atribuída a Jean Baptiste Denis. Denis, era médico do rei Luis XIV da França, possuía bacharelado em teologia e havia estudado medicina em Montpellier, onde posteriormente atuou como professor de matemática e filosofia (GREENWALT, 1997). Em 15 de junho de 1667, ele realizou a transfusão de cerca de 260 mL de sangue de cordeiro a um rapaz de 15 anos que sofria de uma doença obscura e havia sangrado quase até a exaustão (WINSLOW, 2006b) para a “remoção dos maus fluidos”. O rapaz, por razões talvez mais obscuras do que a própria doença, sobreviveu ao procedimento e recuperou-se de maneira formidável. Entusiasmado pelo resultado positivo, Denis prosseguiu realizando transfusões até a inevitável morte de um de seus pacientes. Este evento bastante controverso teve por consequência a proibição das transfusões na França, passando estas a necessitarem de autorização da Faculdade de Medicina de Paris. Posteriormente, proibições semelhantes foram outorgadas em Roma e pela Sociedade Real Britânica (GREENWALT, 1997; WINSLOW, 2006b).

Por mais de um século após os experimentos de Denis as transfusões permaneceram banidas da prática médica e pouco exploradas, fato que provavelmente salvou milhares de vidas. Foi somente no início do século XIX, exatamente em 22 de dezembro de 1818, que foi realizada a primeira transfusão de sangue humano, atribuída a James Blundell (GREENWALT, 1997). Até o início do século XX, os resultados obtidos com as transfusões foram em geral catastróficamente negativos. Foi somente na década de 1920, isto é, menos de 100 anos atrás, que os três maiores riscos transfusionais foram efetivamente controlados, sendo estes a coagulação, a infecção e a incompatibilidade

(WINSLOW, 2006b). Este último graças às pesquisas realizadas pelo médico austríaco Karl Landsteiner, laureado com o prêmio Nobel de Fisiologia-Medicina em 1930 por seus trabalhos que envolveram, entre outros achados, a descoberta do sistema ABO e do fator Rh. O primeiro banco de sangue foi criado em 1937 no *Cook County Hospital* em Chicago (WINSLOW, 2006b) e a partir deste momento as transfusões iniciaram sua popularização na prática médica, principalmente durante a II Guerra Mundial.

Considerando que a transfusão de qualquer material outro, que não o sangue autólogo, é na verdade uma infusão de um substituto sanguíneo, a pesquisa e a terapia com substitutos sanguíneos vêm ocorrendo há muitos séculos (GOORHA et al., 2003). Através da história, diversas substâncias foram investigadas para tal propósito, dentre elas: o leite, o vinho, a cerveja, o opium, o extrato de Bela-manhã (*Convolvulus tricolor*), o amido, derivados de caseína, soluções salinas, solução de Ringer, o sangue humano e o animal, lisado de eritrócitos, etc. (GOORHA et al., 2003; PORTÖRO et al., 2008; WINSLOW, 2006b).

O termo “substituto sanguíneo”, apesar de comum, é evidentemente incorreto uma vez que, até a presente data, não existem fluidos capazes de realizar todas as funções sanguíneas, excetuando-se o próprio sangue. Este fato é reconhecido por Amberson que em sua clássica revisão publicada em 1937 na qual escreve (tradução livre ao português):

“O sangue de vertebrados é o fluido mais complexo encontrado no mundo dos organismos vivos. É composto por dezenas de ingredientes essenciais e realiza uma multiplicidade de atividades; sendo o carreador fluido de uma variedade de

substâncias químicas e integrações de funções hormonais bem como a fonte de alimento e oxigênio para todos os tecidos, ele desafia a síntese laboratorial. É elementar o reconhecimento da inexistência de um substituto completo para o sangue. Entretanto, biólogos e fisiólogos, assim como os clínicos, deparam-se frequentemente com situações nas quais o sangue não pode ser obtido, ou onde o problema em questão somente pode ser resolvido com uma simplificação de condições, de forma que um substituto sanguíneo tem se tornado uma das maiores necessidades para os laboratórios experimentais” (AMBERSON, 1937 *apud* WINSLOW, 2006b).

A necessidade apontada por Amberson em 1937 ainda persiste e é agravada por eventos recentes como o aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, o desenvolvimento da medicina (especialmente o cirúrgico), o aumento dos custos relativos às bolsas de sangue, etc.

1.3 Riscos e problemas associados às transfusões

1.3.1 Reações e riscos transfusionais

As reações transfusionais são definidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como os eventos adversos resultantes do uso terapêutico do sangue e hemocomponentes (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012a). A ocorrência destas reações é estimada por esta agência entre 2 e 3 para cada 1000 transfusões realizadas

(BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008, 2012b). As complicações decorrentes de transfusão são geralmente classificadas em: (I) complicações infecciosas e (II) complicações não-infecciosas.

Dentre as complicações infecciosas encontram-se a transmissão de agentes patogênicos, como: HIV, HBV, HCV, CMV, agentes infecciosos bacterianos (principalmente *Yersinia enterocolitica*), parvovírus, HTLV-I (*human T-lymphotrophic virus type I*), HTLV-II (*human T-lymphotrophic virus type II*), vírus Epstein-Barr, leishmaniose, borreliose de Lyme, brucelose, malária, babesiose, toxoplasmose, doença de Chagas, doença de Creutzfeld-Jakob, etc.

Apesar da drástica redução do risco de transmissão destes agentes patogênicos observada em países ricos, em países tidos como pobres (segundo a classificação da OMS) este risco ainda é bastante alto, sendo apontado, por exemplo, em 2014 pela OMS que 25 de seus países membros não são capazes de analisar todo o sangue doado quanto a presença de HIV, HCV ou HBV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011, 2014). Apenas como exemplo desta redução de risco, segundo Riess (2001), os riscos de transmissão de hepatite B ou C nos Estados Unidos são estimados em 1 em 30.000 a 250.000 e 1 em 30.000 a 100.000 respectivamente, enquanto Goodnough (2005) indica incidência de 1 em 60.000 a 200.000 e 1 em 800.000 a 1.600.000 respectivamente; anteriormente a 1965 o risco combinado para as doenças supracitadas era estimado em 1 em 4 (RIESS, 2001).

Dentre as complicações não-infecciosas decorrentes da transfusão constam as relacionadas com a imunomodulação, que podem aumentar o risco inerente à

própria infecção (uma vez que uma baixa atividade do sistema imune favorece o desenvolvimento de infecções oportunistas), bem como a lesão pulmonar aguda e reações hemolíticas graves decorrentes principalmente da correlação incorreta de unidade de sangue/paciente ou erros de identificação do tipo sanguíneo. A lesão pulmonar é considerada uma das complicações mais graves dentre os eventos adversos transfusionais não-infecciosos (GOODNOUGH; SHANDER; SPENCE, 2003; SILVA et al., 2008).

Os principais efeitos adversos não-infecciosos são: (I) reações alérgicas leves (por exemplo, febre, dor e desconforto e urticária) estimadas em 1 em 30 pacientes; (II) reações hemolíticas tardias estimadas em 1 a cada 1.000 pacientes; (III) distúrbios respiratórios agudos com incidência aproximada de 1 em 5.000 pacientes; e (IV) reações hemolíticas agudas fatais com incidência estimada em 1 a cada 250.000 a 1.000.000 pacientes (RIESS, 2001).

Apesar de a incidência de eventos adversos decorrentes das transfusões ser relativamente alta, a maior causa de morbidade e mortalidade são erros de administração (incompatibilidade doador-paciente). A incidência destes eventos é estimada nos Estados Unidos em 1:14.000, no Reino Unido em 1:18.000 e no Canadá em 1:17.000. Estima-se assim que 1 em cada 33.000 unidades de sangue transfundidas seja ABO-incompatível devido a erros, que metade destas estejam relacionadas a eventos adversos transfusionais e que aproximadamente 10% sejam fatais. A fatalidade devido à incompatibilidade do sistema ABO é estimada, desta forma, em 1:800.000, estando muito acima do risco de transmissão de HIV que é estimado em 1 a cada 2.000.000 pacientes (GOODNOUGH, 2005).

Complicações não-infecciosas podem também decorrer de múltiplas transfusões sanguíneas. Repetidas transfusões sanguíneas podem levar a sérias complicações, tais como a maior incidência de falência múltipla de órgãos cujo risco aumenta paralelamente ao volume total transfundido. Este fato possivelmente é resultante de uma severa resposta inflamatória sistêmica provocada pelas múltiplas transfusões (CHEN; SCERBO; KRAMER, 2009).

1.3.2 Efeitos de estocagem

A legislação brasileira permite o armazenamento de concentrados de hemácias por um período dentre 35 a 42 dias quando a 4 ± 2 °C (dependente da solução de armazenamento utilizada) (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Entretanto, durante este período, o concentrado de hemácias sofre diversas modificações químicas e físicas, coletivamente denominadas efeitos de estocagem, as quais podem diminuir sua eficácia e/ou causar efeitos adversos (ELMER; ALAM; WILCOX, 2012). Observou-se que a transfusão de concentrado de hemácias “envelhecido” (ou seja, mais próximo do prazo de validade), enquanto comum devido ao gerenciamento de estoque, está associado com o aumento da incidência de falência de órgãos e infecções após: traumas (OFFNER et al., 2002; ZALLEN et al., 1999), cirurgias cardíacas (VAMVAKAS; CARVEN, 1999) e doenças críticas (PURDY; TWEEDDALE; MERRICK, 1997).

Sob o ponto de vista químico, durante um período de apenas três horas após

a coleta, ocorre a rápida depleção dos vasodilatadores S-nitrosotiol (SNO) e óxido nítrico (NO) ligados à hemoglobina (Hb) (BENNETT-GUERRERO et al., 2007). A depleção destes compostos compromete a capacidade vasorreguladora das hemácias podendo causar complicações clínicas.

Adicionalmente, durante o armazenamento a concentração de 2,3-difosfoglicerato reduz-se a aproximadamente zero no período de uma semana. Esta redução implica na variação da afinidade da hemoglobina ao oxigênio (a qual aumenta), dificultando desta forma a liberação de oxigênio nos tecidos (BENNETT-GUERRERO et al., 2007). Além da perda do 2,3-difosfoglicerato, verificou-se que os leucócitos retidos no concentrado de hemácias provocam a formação de compostos radiculares que causam danos à membrana dos eritrócitos (D'ALMEIDA et al., 2000). Estes danos provocam a liberação da hemoglobina eritrocitária (cuja concentração pode chegar a 20 μ M após três semanas) e de potássio (cuja concentração pode chegar a 20 mM, 5 vezes a concentração apresentada no sangue “fresco” (BENNETT-GUERRERO et al., 2007)). Finalmente, quase imediatamente após o armazenamento, ocorre a redução do pH intracelular, que varia de 7,4 para 6,9, podendo chegar a 6,7 após vinte e um dias. A redução do pH é decorrente do metabolismo anaeróbico da dextrose que causa acidose láctica, sendo a concentração de lactato aumentada em 15 vezes em um período de três semanas (BENNETT-GUERRERO et al., 2007).

Fisicamente, durante o armazenamento, as hemácias tendem a modificar sua morfologia de disco bicôncavo para a forma esférica e tornam-se menos deformáveis. A configuração esférica entretanto pode não atravessar de modo

eficiente a luz dos capilares periféricos (ELMER; ALAM; WILCOX, 2012). Hemácias normais apresentam diâmetro dentre 7 e 8 μm , sendo ligeiramente maiores que a luz dos capilares. Desta forma as hemácias sofrem naturalmente deformações quando atravessam a microcirculação. Hemácias menos deformáveis podem bloquear e obstruir capilares ou atravessar a microcirculação com uma velocidade de trânsito significativamente aumentada (evento mais comum), resultando em uma diminuição da liberação de oxigênio aos tecidos (BENNETT-GUERRERO et al., 2007).

1.3.3 O custo e a disponibilidade do sangue

Além das possíveis complicações clínicas decorrentes das transfusões e dos efeitos de estocagem, o custo e a disponibilidade do sangue são fatores de grande importância a serem considerados.

Após o advento da epidemia de AIDS em 1980, os bancos de sangue e as transfusões como um todo sofreram grandes impactos. Ao verificar-se a possibilidade de propagação da AIDS por meio de transfusões, desenvolveu-se “pânico populacional” e inerentemente críticas e questionamentos quanto ao uso de sangue. Estes questionamentos com relação à segurança e eficácia perduram até a data atual. Como consequência observa-se o progressivo aumento de custos relacionados com a coleta, análise e distribuição de unidades de sangue impulsionado pelo desenvolvimento de novas tecnologias e análises, novos requisitos de segurança e conseqüentemente novas exigências legais.

Estimar o custo do sangue é uma tarefa complexa que necessita de

conhecimentos sofisticados em medicina transfusional. Os fatores a serem considerados ultrapassam a lei da oferta e demanda (SHANDER et al., 2007) envolvendo custos de recrutamento, qualificação e fidelização de doadores, de formação, treinamento e manutenção de equipes técnicas, transporte, coleta, processamento, análise, utilização, controle de qualidade, manutenção de equipamentos e espaço físico. Envolve ainda os custos relacionados com a destruição do sangue com prazo de validade expirado ou do sangue positivamente identificado com características impeditivas à transfusão, o rastreamento e notificação de pacientes, a notificação de agências reguladoras, o seguro, os processos legais e finalmente o tratamento de eventos adversos ocasionados pelo uso do sangue, que infelizmente são muitos (SHANDER et al., 2007; “The Cost of Blood: Multidisciplinary Consensus Conference for a Standard Methodology”, 2005).

Desta forma, apesar de o sangue ser obtido por doações voluntárias não pagas, ele não é distribuído da mesma forma em que é obtido, sendo uma mercadoria bastante custosa para o paciente. Segundo a revista *Época* o valor médio do sangue em 2011 era de R\$ 1.500,00 por litro transfundido, sendo que uma bolsa de 350 mL custava entre R\$ 300,00 e R\$ 800,00, tornando o sangue uma mercadoria mais cara do que o petróleo (SEGATTO, 2011). Entretanto, apesar de parecer um contrassenso *a priori*, este custo é facilmente compreensível quando se avalia a vasta bibliografia de normas técnicas de segurança, normas regulatórias gerais e exigências legais para o uso do sangue.

Evidentemente o custo, a segurança e a disponibilidade de sangue estão intrinsecamente interligadas. Quando em 1996 houve a descrição de uma nova

variante da Encefalopatia de Creutzfeldt-Jakob (CJD) no Reino Unido, que fisiologicamente demonstrou-se bastante similar à Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), a *Food and Drug Administration* (FDA, agência dos Estados Unidos) determinou que pessoas que estiveram por mais de seis meses na Europa ou mais de três meses no Reino Unido entre 1980 e 1996 fossem excluídas das doações. Em consequência, aproximadamente 1,4 milhão de unidades de sangue deixaram de ser coletadas (RIESS, 2001). Similarmente, em 1999 identificou-se o vírus *West Nile* (WNV) nos Estados Unidos, para o qual estima-se que 1 em cada 150 infectados apresente doença de quadro grave envolvendo o sistema nervoso central. Em julho de 2003, no mesmo país, implementou-se análise experimental para WNV para as doações sanguíneas, sendo identificadas mais de 600 unidades infectadas em 2,5 milhões de doações (GOODNOUGH, 2005).

Paralelamente à percepção de novos riscos e à insurgência de novas análises, maiores custos serão envolvidos e maior número de unidades de sangue será descartado por não atenderem aos novos padrões de qualidade. A OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011) estima em 1,6 milhão o número de unidades de sangue descartadas em 2008 devido à presença de marcadores de infecção para doenças transfusionalmente transmissíveis (como AIDS, hepatites B e C e sífilis).

De modo adicional, uma grande preocupação em relação ao sangue provém da disparidade entre o aumento da demanda em relação ao estoque. A ANVISA estima que no ano de 2007 foram realizadas em torno de 3 milhões de transfusões (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA

SANITÁRIA, 2008) e a Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados aponta em 2008 a realização de 3.555.484 transfusões (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009). No Brasil, estudos realizados em 1995 indicavam que apenas 0,7% da população era regularmente doadora (SANTOS, 1995), enquanto para o ano de 2013 o Ministério da Saúde (BRASIL) relata um valor de 1,78% (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Segundo a OMS é recomendado que no mínimo 1% da população seja doador (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Nos Estados Unidos, por exemplo, mais de 14 milhões de unidades de sangue são transfundidas por ano, sendo cerca de dois terços destinados à reposição de perdas após traumas ou cirurgias e o restante para o tratamento de perdas crônicas (causadas por pequenas mas constantes perdas, comumente no sistema digestório), câncer e anemias (RINALDI, 2005). Sendo previsto um aumento desta demanda em aproximadamente 6% ao ano (CRETEUR; VINCENT, 2009), de acordo com estimativas, em 2030, caso as doações permanecerem inalteradas, haverá, nos Estados Unidos, um déficit de 4 milhões de unidades de sangue por ano (TANAKA; TANAKA, 2003).

Segundo a OMS, são atualmente feitas aproximadamente 92 milhões de doações por ano em todo o mundo, sendo metade destas realizadas em países avançados, que representam cerca de 15% da população mundial; e por volta de 65% das doações e coletas mundiais de sangue estão concentradas em apenas 10 países, Estados Unidos, China, Índia, Japão, Alemanha, Rússia, Itália, França, Coreia do Sul e Reino Unido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Utilizando a

estimativa de uso *per capita* de sangue para os Estados Unidos, que é de 1 unidade a cada 25 pessoas, foi calculado que em todo mundo deva haver um déficit anual de mais de 200 milhões de unidades de sangue, caso o mundo em desenvolvimento apresentasse o mesmo nível de qualidade em saúde pública que o mundo desenvolvido (WINSLOW, 2000), e esta estimativa permanece atual segundo levantamento mais recente da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Concomitantemente aos fatores supracitados, dificuldades logísticas e práticas (necessidade de transporte de sangue e equipamentos relacionados, dentre outras) podem reduzir consideravelmente a disponibilidade do sangue coletado ou aumentar excessivamente o custo das transfusões. Desta forma, a capacidade para responder às situações críticas de grande porte (como grandes acidentes rodoviários, casualidades no combate policial ou militar, etc.) pode tornar-se bastante limitada (CHEN, SCERBO et al., 2009).

1.4 O desenvolvimento de transportadores de oxigênio e o setor militar

A pesar de ocorrer a mais de um século, a intensificação dos esforços para o desenvolvimento de um substituto sanguíneo é observada principalmente a partir da década de 1930. Esta intensificação de esforços foi estimulada principalmente pela descoberta (AMBERSON et al., 1933) de que lisados de sangue bovino podem transportar oxigênio quando infundidos em mamíferos. Posteriormente em 1949 verificou-se que o mesmo efeito é encontrado em lisados de sangue humano (AMBERSON; JENNINGS; RHODE, 1949). A partir desta descoberta o setor militar,

em particular o exército norte-americano, intensificou sobremaneira os esforços para desenvolvimento de um produto viável, fato não surpreendente uma vez que hemorragias apresentam-se como a maior causa de morte em campos de batalha (RINALDI, 2005). Sendo esta a causa atribuída a 90,9% das mortes possivelmente evitáveis ocorridas em campos de batalha dentre os anos de 2001 e 2011 durante as operações norte-americanas “Operação Liberdade do Iraque” (*Operation Iraqi Freedom*) e “Operação Liberdade Duradoura” (*Operation Enduring Freedom*) (EASTRIDGE et al., 2012).

Durante a Guerra do Vietnã, na década de 1960, o exército norte-americano passou a colaborar com empresas privadas e a financiar com investimentos substanciais diversas abordagens de pesquisa com tal finalidade (RINALDI, 2005). A experiência obtida, principalmente devida aos tempos de guerra, proveu as bases teóricas para o delineamento das propriedades ideais para os transportadores de oxigênio direcionados ao campo militar. Posteriormente este delineamento foi ampliado a todas as áreas médicas (RINALDI, 2005).

Atualmente, os recentes conflitos, principalmente no Oriente Médio, indicam que a necessidade militar por alternativas ao sangue pode ter se agravado. Estes conflitos tendem a apresentar confrontos de menor duração, porém de maior intensidade, os quais não estão concentrados em uma única e determinada área, como visto na Segunda Guerra Mundial, sendo necessária, portanto, a evacuação dos feridos que muitas vezes encontram-se a longas distâncias de centros médicos (WINSLOW, 2006a).

Durante a Operação Tempestade no Deserto (*Operation Desert Storm*)

realizada pelo exército norte-americano em território iraquiano, por exemplo, este exército usou extensivamente sangue congelado. Quando congelado, o sangue pode ser armazenado por prazo indefinido, porém os requisitos para sua utilização são maiores. O sangue deve ser mantido sempre congelado até seu uso (acarretando em alto custo energético), necessitando de pessoal qualificado para a realização do descongelamento, a remoção do glicerol e de grandes quantidades de água de alta pureza para a lavagem e utilização das células. Tais operações são factíveis em grandes navios-hospital, entretanto são dificilmente realizáveis em unidades terrestres e implicam em grandes dificuldades logísticas e custos exacerbados (WINSLOW, 2000).

1.5 Transportadores de oxigênio

O objetivo principal dos substitutos sanguíneos é permitir a sobrevivência do paciente até que este seja capaz de estabilizar por si seu meio interno fisiológico. Efetivamente os candidatos a substituto do sangue não objetivam a capacidade de realizar todas as funções sanguíneas sendo comumente restritos à função de transporte de oxigênio e de aumento do volume sanguíneo. Sob este ponto de vista (o transporte de oxigênio e controle do volume sanguíneo), um substituto ideal não deve apresentar toxicidade, antigenicidade e deve eliminar, ou drasticamente reduzir, o risco de infecções, além de apresentar, comparativamente ao sangue humano, boa capacidade de transporte e liberação de oxigênio. Adicionalmente, deve ser facilmente disponível, apresentando boa estabilidade e capacidade para ser armazenado à temperatura ambiente (GRETHLEIN, RAJAN; 2010).

Um substituto sanguíneo cuja exigência para armazenamento seja baixa (não necessitando, por exemplo, de refrigeração), cujo prazo de validade seja alto (viável por meses ou até mesmo anos) e que necessite de pouco ou nenhum tratamento prévio ao uso, deve contribuir imensamente nessas ocasiões para o salvamento de muitas vidas.

Duas são as principais abordagens propostas para o desenvolvimento de substitutos sanguíneos, (I) os transportadores de oxigênio que utilizam hemoglobina (conhecidos como: *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers*; HBOCs) e (II) os perfluorocarbonos. Os perfluorocarbonos são substâncias quimicamente e biologicamente inertes as quais são capazes de dissolver grandes quantidades de oxigênio (CABRALES; INTAGLIETTA, 2013). Os HBOCs, como explicitado pelo nome, são sistemas que buscam explorar a capacidade natural da hemoglobina (humana, bovina, ou de outra origem) de transportar o oxigênio, sendo predominantemente sintetizados a partir de modificações químicas na estrutura da hemoglobina (ALAYASH, 2010).

1.5.1 Hemoglobina

“A hemoglobina é uma proteína globular formada por quatro subunidades: duas α (141 resíduos cada uma) e duas β (146 resíduos). (...) A estrutura quaternária da hemoglobina é mantida por ligações não covalentes, que são muito mais numerosas entre subunidades diferentes – α/β – do que entre subunidades iguais – α/α e β/β . O resultado desta associação desigual é uma molécula tetramérica, composta por dois dímeros, denominados $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, dispostos simetricamente ao redor de um eixo

central” (MARZZOCO; TORRES, 1999). Cada cadeia da hemoglobina (α ou β) está associada a um grupo heme (grupo prostético) contendo um átomo de ferro no estado Fe^{2+} . Os grupos prostéticos de cada subunidade da hemoglobina encontram-se localizados dentro de cavidades hidrofóbicas, as quais tornam possível a ligação reversível do oxigênio ao ferro (Fe^{2+}) sem que ele seja oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}).

A afinidade por oxigênio apresentada pela hemoglobina depende principalmente de três fatores: (I) a afinidade intrínseca da hemoglobina, (II) a concentração intraeritrocitária de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e (III) a resposta da hemoglobina ao 2,3-DPG e a íons cloreto. Enquanto o 2,3-DPG é o fator de modulação de maior relevância para a hemoglobina A (forma predominante em humanos adultos) *in vivo*, a concentração de íons cloreto apresenta-se como fator fisiológico de maior relevância para hemoglobina de ruminantes, tais como a hemoglobina bovina. Esta relevância ocorre de tal forma que a hemoglobina bovina apresenta, na ausência de 2,3-DPG, porém na presença de concentrações fisiológicas de cloreto (100 mM), afinidade ao oxigênio similar ou até mesmo menor que a hemoglobina humana em condições saturadas de 2,3-DPG (MARTA et al., 1998), facilitando assim a liberação do oxigênio nos tecidos. Desta forma a utilização da hemoglobina bovina faz-se mais interessante para o desenvolvimento de um substituto sanguíneo que a própria hemoglobina humana.

1.5.2 Hemoglobina e sua remoção natural

O grupo heme presente na hemoglobina e em algumas outras proteínas (como a mioglobina) é altamente tóxico quando no meio extracelular, sendo possível observar, em mamíferos, mecanismos de alta capacidade na remoção deste composto. Os efeitos tóxicos do heme são geralmente observados quando a hemoglobina é liberada dos eritrócitos (em decorrência de doenças hemolíticas ou transfusão, por exemplo) ou diretamente injetada no sistema circulatório (como um HBOC, por exemplo) em quantidades suficientes para saturar seus mecanismos de remoção.

Duas são as principais vias para a remoção do grupo heme, sendo uma dedicada à remoção do heme ligado à hemoglobina. A remoção do heme livre ocorre por meio do complexo heme-hemopexina e do receptor CD91. A hemoglobina livre, por sua vez, tem sua remoção por meio do complexo haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb) e do receptor CD163 (NIELSEN; MØLLER; MOESTRUP, 2010).

A hemoglobina livre naturalmente estabelece um equilíbrio dinâmico entre suas formas tetramérica e dimérica, sendo prevalente a forma dimérica (SCHAER et al., 2013). Os dímeros são rapidamente capturados pela haptoglobina (Hp), formando o complexo Hp-Hb. A Hp é uma glicoproteína de fase aguda encontrada na fração α_2 -globulina na maioria das espécies de mamíferos (HWANG; GREER, 1980). Esta proteína é formada por subunidades α e β e apresenta três diferentes variações fenotípicas em humanos, a Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2. A haptoglobina apresenta alta afinidade pela hemoglobina e liga-se a seus dímeros na proporção

1:1 (um dímero de hemoglobina para uma unidade $\alpha\beta$ da haptoglobina) (ADAMS; WEISS, 1969; CHIANCONE et al., 1968; NAGEL; GIBSON, 1971). A interação Hp-Hb é tida como uma das mais fortes interações não covalentes observadas no plasma (HWANG; GREER, 1980; NIELSEN; MØLLER; MOESTRUP, 2010) e este complexo é considerado virtualmente irreversível (ANDERSEN et al., 2012). Esta interação protege a hemoglobina contra danos estruturais causados por peroxidação, como a formação de cross-link entre cadeias α e a oxidação de aminoácidos em regiões críticas presentes na cadeia β (como exemplo, Trp15, Cys93 e Cys112) (BUEHLER et al., 2009; JIA et al., 2007; NIELSEN; MØLLER; MOESTRUP, 2010).

O complexo Hp-Hb é rapidamente removido da circulação por macrófagos. A internalização nos macrófagos ocorre por meio da interação de alta afinidade ao receptor CD163 (ANDERSEN et al., 2012; JIA et al., 2013; NIELSEN; MØLLER; MOESTRUP, 2010). Este receptor apresenta também, em menor intensidade, afinidade pela hemoglobina livre, sendo este um fator importante para a remoção da hemoglobina plasmática em situações nas quais ocorre a depleção da haptoglobina, como observado após a administração de alguns HBOCs (SCHAER et al., 2006). Após a internalização por macrófagos, a digestão proteolítica libera o grupo heme da estrutura da hemoglobina, o qual é posteriormente degradado no citosol pela enzima heme oxigenase (HMOX) com a formação de biliverdina, monóxido de carbono e ferro (BELCHER et al., 2010; KNUTSON; WESSLING-RESNICK, 2003; MAINES, 1997, 2005).

Ocorrendo a saturação do sistema Hp/CD163, a remoção e degradação da

hemoglobina é realizada pelos rins (BELCHER et al., 2010). A hemoglobina livre é capaz de transpor a parede capilar glomerular e assim atingir o tubo proximal renal onde é endocitada. A endocitose da hemoglobina é mediada pelos receptores megalina e cubilina (GBUREK et al., 2002). Assim como ocorre nos macrófagos, a hemoglobina é então convertida a globina e heme, sendo este último igualmente metabolizado pela HMOX (BAINES, 2006). Uma vez saturado o mecanismo de degradação da hemoglobina nos rins, ocorre a hemoglobinúria.

1.5.3 Os transportadores de oxigênio que utilizam hemoglobina

Inicialmente os HBOCs (Tabela 1) foram desenvolvidos visando o impedimento da dimerização da hemoglobina por meio de crosslinks intramoleculares e a posterior polimerização por meio de crosslinks intermoleculares. Os produtos gerados são geralmente considerados de “primeira geração” (apesar de não haver consenso na literatura científica quanto a esta classificação); são exemplos o HemAssist, o PolyHeme, o Hemopure, e o Hemolink (ALAYASH; D’AGNILLO; BUEHLER, 2007). O impedimento da dimerização da hemoglobina objetivava principalmente a diminuição da toxicidade renal observada após a infusão de hemoglobina livre. Estes produtos apresentam como característica (I) o supracitado impedimento da dimerização da hemoglobina; (II) a afinidade por oxigênio menor ou igual à hemoglobina intraeritrocitária; (III) a baixa viscosidade e (IV) uma pressão oncótica similar à do plasma (WINSLOW, 2005).

A análise dos estudos clínicos realizados para os supracitados produtos

desenvolvidos demonstrou que eles podem causar sérios eventos adversos como aumento da pressão sanguínea, inflamação sistêmica e local, distúrbios gastrointestinais, hipertensão pulmonar, danos ao miocárdio e aumento do risco de morte (NATANSON et al., 2008; SILVERMAN; WEISKOPF, 2009; SIMONI, 2012). Em particular, a hipertensão provocada por esses produtos é capaz de provocar consequências clínicas negativas que se sobressaem a quaisquer benefícios possivelmente alcançáveis com a ampliação da capacidade de transporte de oxigênio (WINSLOW, 2005).

Tabela 1. Principais produtos propostos como HBOC.

Produto	Molécula
HemAssist / DCLHb / $\alpha\alpha$ -Hb	Cross-link de hemoglobina humana com bis-(3,5-dibromosalicil) fumarato
PolyHeme / SFH-P	Cross-link de hemoglobina humana com piridoxal fosfato (intramolecular) e com glutaraldeído (intermolecular)
Hemopure / HBOC-201	Cross-link de hemoglobina bovina com glutaraldeído (intra e intermolecular)
Hemolink	Cross-link de hemoglobina humana com O-rafinose
PHP-Hb	Hemoglobina piridoxilada e pegilada
Hemospan / MP4 / MalPEG-Hb	Hemoglobina modificada por maleimida-polietileno glicol
Optro / rHb 1.1	Hemoglobina humana recombinante

Posteriormente novas modificações moleculares foram incorporadas com o objetivo de gerar conjugados com menor atividade vasoconstritora. Dentre os produtos desenvolvidos, tidos como de “segunda geração”, o Hemospan (também conhecido como MP4 ou MalPEG-Hb) é o mais estudado. O Hemospan foi desenvolvido a partir

de novos princípios estratégicos, sendo estes: (I) aumento do tempo de retenção intravascular pelo aumento do diâmetro molecular; (II) alta afinidade pelo oxigênio; (III) baixa concentração de hemoglobina; (IV) maior viscosidade (próxima a do sangue) e (V) pressão oncótica superior aos valores plasmáticos.

Esta mudança de paradigma é decorrente da observação dos efeitos adversos provocados pela “primeira geração” de HBOCs. Verificou-se que o extravasamento da hemoglobina para o tecido intersticial provoca a depleção do óxido nítrico (NO) presente na musculatura dos vasos sanguíneos (YU; BLOCH; ZAPOL, 2009). Esta depleção tem como principal consequência o aumento da pressão sanguínea (ver item **1.5.4.1 Ação hipertensiva**) podendo provocar hipertensão intensa, necroses locais e falência de órgãos (BURHOP; GORDON; ESTEP, 2004). De modo adicional, a baixa afinidade pelo oxigênio apresentada pela “primeira geração” demonstrou contribuir concomitantemente para o aumento da pressão sanguínea. A liberação excessiva de oxigênio nas arteríolas provocada pela baixa afinidade pelo oxigênio provoca o aumento da pressão de oxigênio local e consequente vasoconstrição por meio de mecanismos autorregulatórios (WINSLOW, 2005).

A maior viscosidade apresentada pela “segunda geração” contribui para o aumento da tensão de cisalhamento no endotélio capilar e como consequência contribui para o estímulo da produção de NO na musculatura destes vasos (CABRALES; INTAGLIETTA, 2013).

Entretanto, apesar dos bons resultados apresentados em estudos clínicos iniciais (fase I) o MP4 demonstrou estar associado com maior incidência de eventos adversos em pacientes submetidos a artroplastia primária de quadril, como aumento da

concentração plasmática de enzimas hepáticas e de troponina (ALAYASH, 2014; ELMER; ALAM; WILCOX, 2012).

1.5.4 Mecanismos de toxicidade de hemoglobina livre e HBOCs

1.5.4.1 Ação hipertensiva

Um dos eventos adversos mais evidentes relatados para a hemoglobina livre e a primeira geração de HBOCs é a hipertensão. Este evento observado é consequente da intensa vasoconstrição atribuída principalmente à depleção do NO na musculatura dos vasos (DOHERTY et al., 1998).

O NO é produzido pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos e é um indutor do relaxamento da musculatura lisa, apresentando importante função vasorreguladora (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988; HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987; KIM-SHAPIRO; SCHECHTER; GLADWIN, 2006). Esta função ocorre por meio da ação do NO na regulação da atividade da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) que é responsável pela produção do segundo mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (cGMP)(YU; BLOCH; ZAPOL, 2009) que, por sua vez, é um agente de regulação do relaxamento muscular por meio da redução da concentração intracelular de cálcio (LUCAS et al., 2000). Esta via de regulação é bastante conhecida e compostos doadores de NO como a nitroglicerina e o isossorbida mononitrato são utilizados no tratamento de angina pectoris e outras desordens vasculares (MILLER; MEGSON, 2007).

A hemoglobina eritrocitária também contribui para o controle da musculatura vascular por meio de sua interação com o NO (Equações 1, 2 e 3). Em situações de baixo pH fisiológico, a deoxihemoglobina reage com o nitrito produzindo NO, estimulando assim, a vasodilatação. Este efeito nitrito redutor apresenta máxima atividade próximo da transição alostérica da hemoglobina do estado oxigenado para o estado desoxigenado indicando que esta função atua como um mecanismo de controle sensível ao oxigênio (HUANG et al., 2005). Em situações opostas, ou seja, em um ambiente com alta concentração de oxigênio e consequente maior valor de pH fisiológico, a hemoglobina reage com o NO para a produção de nitrato (KIM-SHAPIRO; GLADWIN, 2014). Ambas as reações da hemoglobina (com o óxido nítrico e com o nitrito) produzem metemoglobina, a qual no interior dos eritrócitos é rapidamente reduzida a hemoglobina por via enzimática:

Sob condições fisiológicas normais (ou seja, quando a hemoglobina está contida no interior dos eritrócitos), a depleção do NO é inibida devido às barreiras de difusão impostas pelo eritrócito e à zona marginal vascular livre de hemácias formada durante o fluxo laminar do sangue (CABRALES; INTAGLIETTA, 2013; FAHRAEUS, 1929; KIM-SHAPIRO; SCHECHTER; GLADWIN, 2006; OLIVEIRA et al., 2010). Entretanto,

nenhuma barreira de difusão ou sistema enzimático de redução está disponível para a hemoglobina livre ou HBOCs.

Além da depleção do NO, outros fatores devem contribuir para a hipertensão induzida pela hemoglobina (BUEHLER; D'AGNILLO, 2010). Um fator proposto é a excessiva oxigenação provocada por HBOCs e consequente ativação de mecanismos de autorregulação vascular sensíveis ao oxigênio (WINSLOW, 2005). A oxigenação excessiva pode contribuir para maior produção e disponibilidade de ATP, facilitando deste modo a contração da musculatura vascular (WINSLOW, 2013). De modo adicional, estudos indicam que a hemoglobina pode interagir direta ou indiretamente com peptídeos vasoativos (como a endotelina e angiotensina) contribuindo para a manifestação da hipertensão (GULATI; SHARMA; SINGH, 1996; GULATI et al., 1995, 1997; SIMONI et al., 2007).

Diversas condições clínicas são relacionadas com a vasoconstrição causada por HBOCs e pela hemoglobina livre. Este efeito é tido como responsável por danos pancreáticos (provavelmente em decorrência da indução de espasmos do esfíncter de Oddi e da diminuição da perfusão sanguínea), danos hepáticos, espasmos do esôfago (associado a angina), aumento da incidência de infartos do miocárdio, lesões no ventrículo cardíaco esquerdo, hipertensão pulmonar, dentre outros efeitos (NATANSON et al., 2008; SILVERMAN; WEISKOPF, 2009).

1.5.4.2 Reações radicalares (Reação de Fenton)

Diversos tipos celulares são capazes de gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), incluindo neutrófilos, macrófagos, células da musculatura lisa vascular e endoteliais. O H_2O_2 é capaz de reagir com o ferro ferroso (Fe^{2+}) contido na hemoglobina, por meio de uma reação comumente conhecida como reação de Fenton (equação 4), com consequente formação de radicais hidroxila (ZHANG et al., 2012). Além da reação de Fenton, outras reações entre o ferro ferroso (Fe^{2+}) ou férrico (Fe^{3+}) e H_2O_2 podem ocorrer, como descritas pelas equações 5 e 6 (ALAYASH, 2006).

Em especial, a espécie ferril (Fe^{4+}) pode formar-se acompanhada de radical (${}^{\bullet}\text{Hb}$; Equação 6). Ambas estas espécies (ferril e proteína radicalar) são capazes de causar danos oxidativos a uma série de substratos, incluindo DNAs, proteínas e lipídios, como ilustrado na equação 7 (REEDER, 2010). São ainda capazes de provocar a degradação de carboidratos e a formação F2-isoprostanos estáveis, através da peroxidação do ácido araquidônico, os quais são potentes vasoconstritores (ZHANG

et al., 2012).

O acúmulo de metemoglobina nos tecidos pode promover a liberação do grupo hemina (porfirina contendo Fe^{3+}) (SCHAER et al., 2013), que devido à sua extrema lipofilicidade é capaz de intercalar-se à membrana celular e participar de reações como as descritas anteriormente (Equações 6 e 7)

2 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho é o desenvolvimento de uma rota de síntese e sintetizar nanopartículas de PolyHb (poli-hemoglobina) estabilizadas/revestidas por gelatina e posterior análise de sua aplicabilidade terapêutica, ao passo que os objetivos específicos podem ser assim resumidos:

- ✓ Realização, extração e polimerização da hemoglobina utilizando como agentes de polimerização o glutaraldeído e derivado succínico do polietilenoglicol.
- ✓ Síntese de nanopartículas de PolyHb utilizando como agente de revestimento a gelatina.
- ✓ Caracterização das partículas formadas com relação a estabilidade relativa, tamanho, geometria, potencial para agregação, etc.
- ✓ Caracterização do potencial de aplicação das nano- e micropartículas formadas por meio de ensaios de capacidade de absorção de oxigênio.

3 Material e Métodos

3.1 *Extração e purificação da hemoglobina*

A extração e purificação da hemoglobina foram realizadas por meio de uma adaptação do método descrito por Sakai e colaboradores (SAKAI et al., 1993).

Amostras de sangue animal (bovino) foram gentilmente doadas por abatedouro (devidamente registrado e licenciado junto às autoridades competentes) e suas hemácias foram concentradas até 70% em volume. O material utilizado é portanto subproduto do abate de animais zootécnicos destinados à alimentação sendo os animais submetidos à avaliação veterinária anterior ao abate conforme preconizado pelas normas do setor.

3.1.1 *Obtenção de carboxihemoglobina (HbCO)*

Alíquotas de 100 g de concentrado de hemácias foram diluídas em igual volume de solução salina fisiológica (NaCl 0,9% p/v). A este material foi introduzido, sob agitação manual, gás CO (monóxido de carbono) por período de 180 segundos. O CO utilizado foi formado a partir da reação do ácido fórmico com ácido sulfúrico, realizada *in loco*. O material foi centrifugado a 1000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após o descarte do sobrenadante o processo de diluição e centrifugação foi realizado por mais duas vezes.

Às células obtidas na etapa anterior foi adicionado diclorometano na proporção

5:1 (vol. sangue: vol. diclorometano). A mistura resultante foi agitada durante período de 15 minutos, posteriormente centrifugada a 1900 g e decantada, sendo coletada a fração aquosa. A adição de diclorometano, a agitação e a centrifugação foram repetidas por duas vezes.

As proteínas contaminantes, ainda presentes na solução de carboxihemoglobina (HbCO), foram removidas por precipitação à 60 °C por 1 hora (ao abrigo da luz). Realizou-se a filtração da suspensão resultante para a remoção das proteínas precipitadas. Adicionou-se água ultrapura sobre o precipitado para que este fosse “lavado”, ou seja, para a remoção e coleta da hemoglobina retida juntamente com o material precipitado.

Dois métodos de acondicionamento foram utilizados, a liofilização seguida de acondicionamento em dessecador a vácuo ou o acondicionamento da solução a 4°C com tolueno. Para o último, ao material obtido foi adicionado tolueno o qual formou uma fina fase acima da solução. O material foi acondicionado em recipiente de vidro e armazenado a 4°C. A adição do tolueno foi realizada com o objetivo de proteger a hemoglobina obtida, evitando seu contato direto com o oxigênio atmosférico.

A hemoglobina obtida permaneceu com coloração vermelha viva mesmo após dois meses de armazenamento a 4°C, tornando-se marrom castanho quando em contato direto com o ar atmosférico.

3.2 Determinação da concentração de hemoglobina por reagente de Drabkin

A determinação da concentração da hemoglobina foi realizada por medição espectrofotométrica do complexo cianeto de hemoglobina. Este método, considerado padrão para a determinação de hemoglobina, consiste na reação da hemoglobina com o reagente de Drabkin formando desta forma a hemoglobina complexa. O complexo cianeto de hemoglobina apresenta resposta de transmitância linear a sua concentração quando lido a 540 nm.

A determinação da concentração de hemoglobina foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, pelo Departamento de Clínica Médica, segundo protocolo recomendado pelo fabricante da solução de Drabkin (Sigma-Aldrich, USA).

Em resumo, para a realização da curva padrão realizou-se a diluição da hemoglobina padrão (Sigma-Aldrich, USA) em solução de Drabkin na concentração de 180 mg/mL. A solução obtida foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente utilizada para a preparação de amostras nas concentrações finais de 0, 60, 120 e 180 mg/mL. Os valores de absorbância destas amostras a 540 nm foram obtidos e utilizados na confecção da curva padrão. De modo similar, amostras de extrato de hemoglobina foram diluídas em solução de Drabkin e agitadas por 15 minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias destas amostras a 540 nm foram determinadas e o valores de concentração calculados a partir da curva padrão.

3.3 Obtenção de derivado succinimídico do polietilenoglicol

O derivado succinimídico do polietilenoglicol foi obtido em duas etapas. Inicialmente foi obtido o derivado succinimidil para sua posterior transformação no derivado desejado.

3.3.1 Obtenção do succinil derivado do polietilenoglicol

Esta etapa consistiu na reação do PEG 6000 com o anidrido succínico para a formação do Poli(oxi-1,2-etanodiil), α -[(3-carboxipropanoil)oxi]- ω -[3-carboxipropanoil]-(bis-succinil PEG; SPEG), conforme ilustrado na Figura 01.

Figura 01. Reação do polietilenoglicol com anidrido succínico para a formação de bis-succinil PEG.

Esta reação foi realizada em tolueno, o qual foi devidamente azeotropado para que fossem eliminados quaisquer traços de água que porventura estivessem presentes no polietilenoglicol. Para este propósito, 10 g de PEG 6000 foram adicionados a 50 mL

de tolueno e a solução resultante foi aquecida por banho de óleo, termorregulado a 150°C por 30 minutos. Desta forma, o tolueno eliminado arrastou para fora a umidade residual do sistema (tomou-se cuidado para que houvesse reposição do tolueno eliminado).

Terminada esta fase, foram adicionados ao sistema 30 g de anidrido succínico (cujo excesso estequiométrico visava à melhoria do rendimento da reação), acoplou-se ao sistema uma coluna de refluxo e a reação foi mantida por 5 horas. A massa reacional foi resfriada, precipitada e retomada em 100 mL de álcool isopropílico. Realizou-se uma série de recristalizações em álcool isopropílico (ao todo sete recristalizações) do bis-succinil PEG obtido objetivando a eliminação de quaisquer traços de ácido succínico ou anidrido succínico os quais poderiam interferir na reação posterior.

3.3.2 Obtenção do derivado succinimídico do polietilenoglicol (PEG bis-[succinimidil succinato])

Esta etapa consistiu na formação do Poli(oxi-1,2-etanodil), α -[4-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-1,4-dioxobutil]- ω -[4-[2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxy]-1,4-dioxobutoxi]- (PEG bis-[succinimidil succinato]; bis-succinimidil succinato de PEG; SSPEG) (Figura 02) necessário para a posterior polimerização da hemoglobina.

Figura 02. Reação do derivado succinimidil do polietilenoglicol com N-hidroxisuccinimida (NHS) e dicitlohexilcarbodiimida (DCC) para formação do PEG bis-[succinimidil succinato].

Esta reação foi realizada em um reator de vidro com agitação magnética.

O PEG carboxiderivado 6000 (1 g) foi dissolvido em acetato de etila a quente e resfriado até a temperatura ambiente. Adicionaram-se quantidades estequiométricas de N-hidroxisuccinimida (NHS) (0,036 g) e dicitlohexilcarbodiimida (DCC) (0,065 g). A reação foi mantida por 25 horas a temperatura ambiente. Após 25 horas de reação o meio reacional resultante foi resfriado a 4 °C por duas horas, filtrado e lavado com duas porções de acetato de etila frio (4°C). O precipitado obtido foi seco em dessecador a vácuo até peso constante. Obteve-se 0,71 g de material após secagem.

Verificou-se, por análise calorimétrica e espectrofotométrica (DSC e RAMAN), que com esta reação obteve-se baixo rendimento (pouca formação de PEG bis-[succinimidil succinato]). Desta forma o material foi descartado e nova produção foi realizada ajustando-se a concentração dos reagentes no meio reacional.

A reação foi refeita com maiores quantidades de DCC e NHS com a finalidade de obter melhores rendimentos. As quantidades utilizadas de NHS e DCC foram 0,11 e 0,20 g, respectivamente, para cada grama de bis-succinil PEG. O excesso utilizado de

NHS e DCC favoreceu a formação do produto melhorando o rendimento da reação.

3.4 Verificação da ativação do PEG bis-[succinimidil succinato]

3.4.1 Reação com albumina e verificação por SDS-PAGE

A ativação da SSPEG (PEG bis-[succinimidil succinato]) foi verificada por meio de sua reação com albumina. A escolha da albumina foi decorrente de sua disponibilidade e amplo conhecimento científico quanto a sua estrutura e seu comportamento.

Em um reator de vidro contendo 0,8 g de albumina dissolvida em 5 mL de tampão de fosfato de sódio (10 mM, pH 7,2) adicionou-se 0,45 g de SSPEG e a reação foi agitada a temperatura ambiente por 24 horas. Após o término do período de reação o material resultante foi submetido à verificação eletroforética (SDS-PAGE).

Estas eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida 7% e 10% com aplicação de 150 V por 1,5 hora e 200 V por 1,3 hora, respectivamente. Após o período de aplicação da corrente elétrica, o gel foi corado com azul de comassie.

3.4.2 Reação com hemoglobina e verificação por SDS-PAGE

A ativação da SSPEG foi também verificada por meio de sua reação com a hemoglobina.

Em um reator de vidro contendo 0,20 g de hemoglobina dissolvida em 20 mL de

tampão de fosfato de sódio (100 mM, pH 8,3) adicionou-se 0,14 g de SSPEG e a reação foi agitada a temperatura ambiente por 4 horas. Após o término do período de reação o material resultante foi submetido à mesma verificação eletroforética descrita no item anterior.

A eletroforese da hemoglobina foi realizada em gel de poliacrilamida 10% com aplicação de 200 V por 0,83 hora (50 minutos). Após o período de aplicação da corrente elétrica, o gel foi corado com azul de comassie.

3.5 *Formação da hemoglobina polimerizada*

A polimerização da hemoglobina foi realizada por reação com glutaraldeído ou PEG bis-[succinimidil succinato]. Produziram-se duas amostras de 20 mL de água ultrapura contendo 0,8 g de hemoglobina (Sigma-Aldrich, USA) cada e adicionou-se o agente de cross-link (0,09 g de PEG bis-[succinimidil succinato] para a amostra 1 e 4,3 μ L de solução de glutaraldeído 25% para a amostra 2). A reação de cross-link foi mantida por 4 horas sob agitação constante de 200 rpm para que ocorresse total depleção do reagente.

3.6 *Nanoestruturação da hemoglobina por método de coliofilização*

Prepararam-se 25 mL de uma suspensão contendo 100 mg de gelatina (Pb Leiner Brasil, Acorizal-MT, Brasil) e 250 mg de PEG 6000, a qual foi resfriada a -70 °C. O material foi liofilizado a -20°C segundo o protocolo descrito por Morita e

colaboradores (MORITA et al., 2001). Ao material sólido resultante adicionaram-se 25 mL de cloreto de metileno e realizou-se a sonicação do material. Nesta etapa o procedimento foi interrompido devido a não dispersão das amostras. Devido às dificuldade da técnica, à necessidade de ajustes na relação gelatina/PEG e à necessidade de controles finos nos parâmetros da liofilização, optou-se pelo abandono desta técnica em favor da técnica de dupla dessolvatação, a qual demonstrou em ensaios preliminares maior viabilidade.

3.7 Nanoestruturação da hemoglobina por método de dupla dessolvatação

O procedimento aqui descrito foi realizado para a formação de partículas contendo hemoglobina não polimerizada assim como de partículas contendo hemoglobina polimerizada. A gelatina utilizada nesta etapa é de origem exclusivamente coriácea bovina (Tipo 2 ou Tipo B).

A gelatina (2 g) foi solubilizada em água (25 g) a 40 °C sob agitação de 500 rpm. Posteriormente foi realizada sua precipitação com a adição de 25 mL de acetona e o sobrenadante foi descartado. Esta precipitação visava a remoção de impurezas assim como a maior uniformidade do material de partida. O material foi ressuspenso em 25 mL de água a 40 °C e 500 rpm. O pH da solução foi ajustado para 12 com hidróxido de sódio 0,1 M. Adicionaram-se 10 mL de extrato de hemoglobina e ajustou-se o pH novamente para 12. O material foi precipitado com 75 mL de acetona e adicionaram-se 200 µL de glutaraldeído 25% em água. O material foi mantido sob agitação e aquecimento (500 rpm e 40 °C) por um período de 4 horas. Após este período o

material resultante foi rotoevaporado para a remoção total da acetona e o ajuste do volume total da suspensão para 20 mL.

As nanopartículas formadas diluídas (5 mL de água para 100 μ L de amostra) foram analisadas quanto ao seu tamanho e potencial zeta em um Zeta sizer nano series Zs (Malvern, Westborough-MA, EUA) a 25°C. As análises de potencial zeta foram realizadas utilizando a equação de Helmholtz-Smoluchowski a partir de medições da mobilidade eletroforética em suspensão aquosa pH 9,5 com condutividade média de 0,0396 mS/cm. Cada amostra foi analisada em triplicata.

3.8 Variações no método de formação de partículas por dupla dessolvatação

Buscou-se estudar o efeito da variação de parâmetros como temperatura, quantidade de glutaraldeído e pH durante a formação das partículas de gelatina (Pb Leiner Brasil, Acorizal-MT, Brasil). Os procedimentos aqui descritos foram efetuados sem que houvesse a adição de hemoglobina.

Inicialmente foi verificada a possibilidade de formação de partículas em pH 7. Desta forma realizou-se a formação de partículas segundo o método de dupla dessolvatação ajustando-se o pH para o valor citado. Checaram-se também os efeitos da quantidade de glutaraldeído e da temperatura do meio na realização de cross-link na estrutura de gelatina (Pb Leiner, Brasil). Foram utilizadas as seguintes quantidades de solução de glutaraldeído 25%: 100 μ L, 200 μ L (padrão) e 300 μ L a temperatura constante de 50°C.

3.9 Formação de nano- e micropartículas de gelatina utilizando como agente de cross-link o PEG bis-[succinimidil succinato]

Buscou-se realizar a estruturação de nano- e micropartículas de gelatina utilizando-se como agente de cross-link o PEG ativado. O procedimento utilizado foi o método de dupla dessolvatação conforme relatado em item anterior com a exceção da utilização do PEG ativado em substituição ao glutaraldeído.

Após a primeira precipitação e ressuspensão da gelatina corrigiu-se o pH, e a temperatura constante de 40°C e sob agitação de 500 rpm adicionaram-se 3,8 g de PEG 6000 ativado (aproximadamente o equivalente estequiométrico à solução de glutaraldeído 25%; $5,3 \times 10^{-4}$ mol) solubilizado em 10 mL de água ultrapura. Durante o período da reação de cross-link observou-se progressiva formação de agregados até finalmente a precipitação intensa do material. Desta forma verificou-se que o PEG ativado, apesar de ser um eficiente agente de cross-link, provoca instabilidade no material utilizado.

Dentre as possíveis causas de instabilidade encontra-se a maior massa molecular do PEG 6000 quando comparada com a do glutaraldeído. Para verificar esta possibilidade, quantidades progressivamente menores de PEG foram utilizadas, a saber: 1,7 g (suspensão em acetona) e 0,5 g (suspensão em acetona e água na mesma proporção do meio em que se encontrava a gelatina). Entretanto, apesar da variação na quantidade de PEG adicionada, não houve variação no resultado final, ou seja, verificou-se a instabilidade e precipitação do material sem que houvesse a formação de

partículas.

3.10 Influência do pH e da força iônica na produção de partículas contendo hemoglobina polimerizada

Verificou-se o efeito de diluição das partículas (contendo hemoglobina polimerizada) em solução salina 0,9% (meio isotônico fisiológico) e em pH 7,5 das formulações realizadas. Para tanto, diluíram-se 100 µL da suspensão de partículas em 5 mL de solução salina e de modo similar 100 µL da suspensão em 5 mL de tampão PBS pH 7,5. Após diluição as suspensões foram analisadas quanto ao diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.

3.11 Análise da formação de partículas utilizando gelatina de origem óssea bovina e suína

Verificou-se a possibilidade de utilização de gelatina de origem óssea bovina e suína para a formação de partículas. Sendo a gelatina um material de origem animal, suas características (como massa molecular, capacidade de gelificação, ponto isoelétrico, organização estrutural, etc.) são variáveis. Tais variações são provenientes de diversos fatores como, por exemplo, a espécie de origem (suína, bovina, fauna ictíaca); a idade do animal quando abatido; a fonte de colágeno (óssea, coriácea, etc.); o processo de pré-tratamento e de extração (ácido ou básico), entre outros.

Para tal finalidade, a princípio realizou-se a formação de partículas “em branco” e partículas contendo hemoglobina polimerizada com glutaraldeído utilizando o método

de dupla dessolvatação (conforme descrito no **item 3.7**) com acetona. Entretanto, devido a não precipitação do material durante a primeira etapa de dessolvatação, optou-se por realizar uma única etapa de dessolvatação, ou seja, sem a primeira etapa de precipitação descrita no **item 3.7**. Posteriormente estudou-se a possibilidade de utilização do isopropanol como agente de dessolvatação.

3.12 *Análise do conteúdo de hemoglobina presente nas partículas de gelatina*

A quantidade de hemoglobina “encapsulada” foi verificada de modo indireto. Utilizou-se para esta análise partículas geradas com gelatina de origem óssea bovina e suína segundo o método de única dessolvatação. Para tanto, amostras de suspensões de partículas foram centrifugadas a 12.680 g por 25 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e analisado com o método de Drabkin. As amostras foram analisadas quanto à absorção de luz em 540 nm, enquanto seus espectros de absorção foram realizados na faixa de comprimentos de onda de 650 nm a 450 nm.

Devido aos resultados insatisfatórios obtidos com este método, realizou-se posteriormente análise de espectroscopia de absorção atômica. Para tanto, soluções de hemoglobina em concentrações prefixadas (36, 27, 18 e 9 mg/L) foram diluídas em triplicata com solução de ácido clorídrico e a concentração de ferro foi determinada em triplicata por absorção atômica, obtendo-se assim uma curva de calibração. Posteriormente, três amostras foram produzidas de modo idêntico, segundo o método de única dessolvatação, e as suspensões de partículas foram centrifugadas a 12.680 g

por 25 minutos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram adequadamente diluídos e analisados. As concentrações de hemoglobina nos sobrenadantes foram determinadas por comparação com a curva de calibração.

3.13 Análise espectrofotométrica da afinidade da micropartícula contendo hemoglobina pelo oxigênio

3.13.1 Análise da remoção do monóxido de carbono

A remoção do monóxido de carbono foi analisada por meio de uma adaptação da metodologia descrita por Sakai e colaboradores (SAKAI et al., 1993).

A uma solução de 0,1 g de hemoglobina em 50 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,4 foi injetado, sob agitação manual, CO por um período de 180 segundos. Após a injeção de CO, o pH da solução de carboxihemoglobina foi ajustado para 7,4 (quando necessário). A solução foi separada em amostras de 1 mL em tubos tipo Eppendorf e adicionou-se 0,0027 g de inositol hexafosfato a cada frasco.

Os frascos contendo carboxihemoglobina e inositol hexafosfato foram colocados em banho de gelo ao abrigo da luz por 5 minutos para a homogeneização da temperatura (0,5 °C). Após esta etapa, os frascos em banho de gelo foram expostos a luz de intensidade 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ gerada por lâmpada fluorescente. Removeu-se um frasco do banho de gelo a intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos. As amostras assim obtidas foram analisadas por espectrofotometria.

3.13.2 *Análise espectrofotométrica da afinidade pelo oxigênio*

O estudo da afinidade da micropartícula pelo oxigênio foi realizado por meio de técnica espectrofotométrica. Amostras contendo metemoglobina, carboxihemoglobina, hemoglobina polimerizada com SSPEG, micropartículas com poli-hemoglobina (SSPEG ou glutaraldeído como agente de cross-link), micropartículas com carboxihemoglobina e micropartículas com metemoglobina foram preparadas em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,4). As soluções foram seladas em cubeta de plástico, permeadas com nitrogênio por 5 minutos e submetidas a análise de absorbância por varredura no intervalo de comprimentos de onda entre 450 e 650 nm. Posteriormente a atmosfera de nitrogênio foi substituída por oxigênio. As amostras foram mantidas em atmosfera contendo 100% de oxigênio por 10 minutos com agitação branda periódica e após este período foram novamente submetidas a varredura nos comprimentos de onda supracitados. As análises foram realizadas a temperatura ambiente (20-25°C) na qual, segundo a literatura científica (SAMAJA et al., 1983), a hemoglobina apresenta valor aproximado de P_{50} de 10 a 12 mmHg.

Buscou-se analisar os valores de absorbância nos comprimentos de onda de 540, 560 e 576 nm, que correspondem a picos de máxima (540 e 576 nm) e mínima (560 nm) absorbância da oxihemoglobina, respectivamente, cuja intensidade é proporcional à saturação de oxigênio. Esperava-se, assim, a partir da variação média da intensidade de absorbância calcular a percentagem de oxihemoglobina presente na solução.

4 Resultados

4.1 Determinação da concentração de hemoglobina por reagente de Drabkin

A concentração de hemoglobina do material extraído foi determinada em 0,42 g/dL de extrato. O valor bastante baixo desta concentração demonstra a necessidade de concentrar o extrato após a obtenção da hemoglobina ou de alterar a metodologia de extração para produzir um material mais concentrado.

4.2 Análise do bis-succinil PEG 6000 por DSC (Differential Scanning Calorimetry) e espectroscopia RAMAN

O derivado succínimidil do polietilenoglicol 6000 sintetizado foi analisado por técnica calorimétrica e comparado com o comportamento calorimétrico do polietilenoglicol 6000. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 03:

Figura 03. Resultados de análise calorimétrica (DSC). A linha vermelha indica o comportamento do polietilenoglicol 6000 (produto de partida, P6000) e a linha azul indica o comportamento observado para o bis-succinil polietilenoglicol 6000 (resultado reacional, SP6000).

O resultado observado indica a ocorrência da reação, evidenciada pela diferenciação do comportamento entre as amostras do PEG 6000 e do bis-succinil PEG 6000. No entanto, este resultado não indica o tipo de modificação ocorrida ou a estrutura formada. Apesar da não identificação da estrutura, a análise é um indicativo do sucesso da reação uma vez que o bis-succinil PEG é o único produto possível para o tipo de reação realizada.

Possíveis traços de anidrido succínico ou de ácido succínico não foram

observados nesta análise, o que era esperado pelo fato de o anidrido succínico apresentar ponto de fusão de 119 °C e o ácido succínico ponto de fusão dentre 185 ° e 187 °C, enquanto a análise foi realizada no máximo a 100°C.

A análise por espectrometria RAMAN apresentou os resultados ilustrados nas Figuras 04 e 05.

Figura 04. Resultados da análise de espectrometria RAMAN. A linha azul indica o comportamento do polietilenoglicol 6000 (produto de partida) e a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietilenoglicol 6000 (resultado reacional).

G:\Alunos Pos\Marco _ farmacia\Raman\0	PEG 6000	po/128scans/50mW/RLaser/offline	08/03/2012
G:\Alunos Pos\Marco _ farmacia\Raman\S-PEG 6000.0	S-PEG 6000	po/128scans/50mW/RLaser/offline	08/03/2012

Page 1/1

Figura 05. Aproximação na faixa de número de onda entre 1400 e 2000 cm^{-1} do resultado da análise de espectrometria RAMAN. A linha azul indica o comportamento do polietilenoglicol 6000 (produto de partida) e a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietilenoglicol 6000 (resultado reacional).

O espectro observado (Figura 04) para a análise de RAMAN indica a similaridade entre os compostos de partida e o produto reacional. É possível identificar na Figura 05 a existência de grupos éster no produto reacional, evidenciado pelo pequeno pico na região 1736 cm^{-1} .

O resultado observado no espectro RAMAN não possibilita obter informações quantitativas do material analisado. Porém é esperado que o pico gerado por grupos éster no produto reacional tenha baixa intensidade devido à pequena ocorrência deste

grupo frente ao tamanho total da molécula (bis-succinil PEG 6000).

4.3 Análise do bis-succinimidil succinato de PEG 6000 por DSC (Differential Scanning Calorimetry) e espectroscopia RAMAN

A análise calorimétrica (DSC) do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000 foi realizada e apresentou os resultados ilustrados na Figura 06.

Figura 06. Resultados da análise calorimétrica (DSC). A linha azul (pico à direita, P6000) indica o comportamento do polietileno glicol 6000; a linha vermelha e marrom (picos na região central, SP6000 e SNP6000) indicam ambas o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 e a linha verde (pico à esquerda, SSP) indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000.

O resultado observado indica a ocorrência da reação, evidenciada pelo aparecimento de um pico em uma região diferente da observada pelo produto de partida (bis-succinil polietileno glicol). Pois mais uma vez este resultado não indica o tipo de modificação ocorrida ou a estrutura formada, realizou-se também análise espectrométrica RAMAN para o bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000, cujos resultados estão apresentados nas Figuras de 07 a 09.

Figura 07. Resultados da análise de espectrometria RAMAN na faixa de número de onda de 200 a 1000 cm^{-1} . A linha azul indica o comportamento do polietileno glicol 6000 (amostra S-PEG 6000), a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 (amostra S-PN 6000) e a linha preta indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000 (amostra SSP).

Figura 08. Resultado da análise de espectrometria RAMAN na faixa de número de onda de 1100 a 1900 cm^{-1} . A linha azul indica o comportamento do polietileno glicol 6000 (amostra S-PEG 6000), a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 (amostra S-PN 6000) e a linha preta indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000 (amostra SSP).

Page 1/1

Figura 09. Resultado da análise de espectrometria RAMAN na faixa de número de onda de 2400 a 3600 cm^{-1} . A linha azul indica o comportamento do polietileno glicol 6000 (amostra S-PEG 6000), a linha vermelha indica o comportamento observado para o bis-succinil polietileno glicol 6000 (amostra S-PN 6000) e a linha preta indica o comportamento do bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000 (amostra SSP).

Os resultados da análise RAMAN observados indicam o sucesso da reação realizada. Com efeito, é possível observar para a amostra de bis-succinimidil succinato de polietileno glicol 6000 o aparecimento de um pico em 803 cm^{-1} , o qual foi identificado como correspondente à ligação N-O do composto. De forma similar, os picos observados na região de 1813 a 1623 cm^{-1} indicam, conforme esperado, a

presença de ligações C=O.

4.4 Verificação da ativação do bis-succinimidil succinato de PEG

Figura 10. Resultados da SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. As bandas representam da esquerda para a direita, de forma alternada, albumina / albumina peguilada, em concentrações progressivamente maiores.

Na análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% (Figura 10), observou-se após a coloração do gel que o material obtido a partir da reação do SSPEG com albumina apresentou maior retenção que o padrão de albumina. Este fato comprova a ativação do SSPEG. O material obtido apresentou-se, em sua maioria, retido no início do gel o que indica que sua massa molecular é maior que 150 kDa (tamanho médio do poro do gel).

Figura 11. Resultados da SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7%. As bandas representam da esquerda para a direita: padrão de massa molecular; padrão de albumina; reação sspeg-albumina concentração 1:1 (mol/mol); reação sspeg-albumina concentração 2:1 (mol/mol); reação sspeg-albumina concentração 3:1 (mol/mol); reação sspeg-albumina concentração 4:1 (mol/mol); reação sspeg-albumina concentração 5:1 (mol/mol); reação sspeg-albumina concentração 6:1 (mol/mol).

Verificou-se também por meio de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7% (Figura 11) que na proporção molar de 6 succinimidil succinato de polietileno glicol para 1 de albumina conseguiu-se a depleção quase total da albumina livre (não conjugada com o polietileno).

De modo adicional, a reação realizada com hemoglobina reafirma a ativação do PEG. Similarmente ao observado para a reação com albumina, verificou-se a retenção do produto reacional na região superior do gel (Figura 12), indicando a formação de

produtos de alta massa molecular.

Figura 12. Resultados da SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% com hemoglobina e conjugados. Da esquerda para a direita: 1) padrão de massa molar (de cima a baixo: 178, 121, 80, 53, 41, 25 kDa; 2) hemoglobina padrão (Sigma-Aldrich); 3) hemoglobina polimerizada com glutaraldeído; 4) hemoglobina polimerizada com SSPEG.

4.5 Nanoestruturação da hemoglobina não polimerizada

A análise de tamanho de partícula demonstrou que as partículas formadas apresentam diâmetro médio de 457,0 nm com índice de polidispersão de 0,217. Foi possível observar (Figura 13) que a distribuição das partículas é uniforme e apresenta uma única população. Com efeito, o índice de polidispersão observado indica que a população de partículas apresenta variações pequenas em seu diâmetro médio, indicando a uniformidade das estruturas do material. O potencial zeta observado foi de -25,8 mV (Figura 14) o que indica boa estabilidade da suspensão.

Figura 13. Resultados da análise de tamanho de partícula por técnica de DLS para partículas formada por gelatina e hemoglobina não polimerizada.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -25,8	Peak 1: -24,5	96,7	5,28
Zeta Deviation (mV): 8,80	Peak 2: -64,4	3,3	2,59
Conductivity (mS/cm): 0,168	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

Figura 14. Resultados da análise de potencial zeta para a nanoestrutura da gelatina com hemoglobina.

4.6 Variações no método de formação de partículas por dupla dessolvatação

Inicialmente foi verificada a possibilidade de formação de partículas em pH 7. Desta forma realizou-se a formação de partículas segundo o método de dupla dessolvatação ajustando-se o pH para o valor desejado (7,75). Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 15 e 16.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1551	Peak 1: 828,3	82,7	216,6
Pdl: 0,762	Peak 2: 5367	17,3	330,3
Intercept: 0,617	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Refer to quality report

Figura 15. Análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação em pH 7,75.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31,8	Peak 1: -31,8	100,0	3,77
Zeta Deviation (mV): 3,77	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0223	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

Figura 16. Análise de potencial zeta para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação em pH 7,75.

Os resultados obtidos demonstram que é possível reduzir o pH durante a formação da estrutura de gelatina, porém, devido a observação da formação de duas populações de partículas, alto índice de polidispersão e maior valor de diâmetro médio, esta variação deve ser melhor estudada.

Buscou-se também variar a quantidade de glutaraldeído e a temperatura do meio para realizar o cross-link na estrutura da gelatina. Para este propósito, foram utilizadas as seguintes quantidades de glutaraldeído: 100 μL , 200 μL (padrão) e 300 μL à temperatura constante de 50°C. Os resultados obtidos estão visualizados nas Figuras de 17 a 19.

Figura 17. Resultados da análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 100 μL de glutaraldeído à temperatura de 50°C.

Figura 18. Resultados da análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 200 μ L de glutaraldeído (padrão) à temperatura de 50°C.

Figura 19. Resultados da análise de tamanho de partícula para partículas geradas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 300 μ L de glutaraldeído à temperatura de 50°C.

Os resultados obtidos indicam que a temperatura de 50°C para a formação de partículas de gelatina reduz ligeiramente seu diâmetro médio, o que está de acordo com o observado por Zwioerek (2006). Adicionalmente observou-se que tanto uma redução como um aumento da quantidade de glutaraldeído utilizada (100 e 300 µL) impactaram de modo similar na formação das nanopartículas, a saber: ambas produziram partículas de maior diâmetro médio assim como maiores índices de polidispersividade. A menor homogeneidade das partículas formadas torna desta forma a variação na concentração de glutaraldeído desinteressante no âmbito deste projeto.

Observou-se também que a temperatura e a quantidade glutaraldeído não influenciaram o potencial zeta apresentado pelas partículas geradas (Figuras 20 a 22). Em todas as análises o potencial médio apresentou-se sempre ligeiramente menor que -30 mV.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31,6	Peak 1: -31,6	100,0	4,93
Zeta Deviation (mV): 4,93	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0493	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

Figura 20. Resultados da análise de potencial zeta para partículas formadas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 100 μ L de glutaraldeído à temperatura de 50°C.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36,6	Peak 1: -36,6	100,0	5,37
Zeta Deviation (mV): 5,37	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0406	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

Figura 21. Resultados da análise de potencial zeta para partículas formadas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 200 μ L de glutaraldeído à temperatura de 50°C.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -34,9	Peak 1: -34,9	100,0	4,32
Zeta Deviation (mV): 4,32	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0547	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

Figura 22. Resultados da análise de potencial zeta para partículas formadas pelo método de dupla dessolvatação utilizando 300 μ L de glutaraldeído à temperatura de 50°C.

4.7 Estruturação de partículas contendo hemoglobina polimerizada

Tem-se como ideal a capacidade de controle do tamanho médio final das partículas que permita a obtenção de partículas de até 1,5 μ m e potencial zeta de valor igual ou menor que -30 mV. Este tamanho é desejável tendo em vista a contenção das partículas à luz dos vasos sanguíneos promovendo assim a) considerável aumento no tempo de meia-vida plasmática, b) redução total do efeito vasoconstritor e nefrotóxico da hemoglobina, e c) baixo risco de formação de êmbolos nos capilares (que em geral

apresentam diâmetro médio de 5 μm). O potencial zeta igual ou menor que -30 mV é desejável para a obtenção de estabilidade ótima da suspensão de partículas evitando desta forma sua agregação e precipitação. Adicionalmente um potencial negativo indica uma desejável tendência das partículas a não aderirem à parede celular de macrófagos, dificultando desta forma a endocitose. As Figuras 23 e 24 mostram os valores médios do tamanho das partículas obtidas usando bis-succinimidil succinato de PEG 6000 e glutaraldeído como agentes polimerizantes e as Figuras 25 e 26 os respectivos valores do potencial zeta.

Figura 23. Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000.

Figura 24. Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36,1	Peak 1: -36,1	100,0	5,65
Zeta Deviation (mV): 5,65	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0250	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

Figura 25. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32,6	Peak 1: -32,6	100,0	4,69
Zeta Deviation (mV): 4,69	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0265	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good

Figura 26. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído.

Verificou-se, conforme esperado, que com a polimerização o tamanho médio das partículas aumentou de forma significativa. O valor médio encontrado para partículas contendo hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 foi de 1370 nm, enquanto o das partículas contendo hemoglobina polimerizada com glutaraldeído foi de 1250 nm. Ambas as formulações apresentaram excelente índice de polidispersão (inferiores ou iguais a 0,2) indicando pequena variação no diâmetro médio das partículas obtidas. Entretanto, observou-se que a formulação obtida usando PEG 6000 como agente de cross-link apresentou menor índice de polidispersão e consequentemente maior homogeneidade da população. De modo adicional, observou-se para ambas as formulações a formação de uma única população de partículas. Por fim, o potencial zeta obtido para ambas as formulações estudadas apresentou-se na faixa ideal, ou seja igual ou menor que -30 mV.

4.8 Influência do pH e da força iônica na produção de partículas contendo hemoglobina polimerizada

Os resultados obtidos variando tanto a força iônica do meio de diluição como o pH demonstram que ambos estes fatores influenciaram diretamente o tamanho, o índice de polidispersão e o potencial zeta das partículas obtidas (Figuras de 27 a 34).

Figura 27. Resultados da análise de tamanho de partículas para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em solução salina 0,9%.

Figura 28. Resultados da análise de tamanho de partículas para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em tampão PBS pH 7,5.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -6,96	Peak 1: 0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV): 0,00	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 16,8	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

Figura 29. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em solução salina 0,9%.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -6,01	Peak 1: 0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV): 0,00	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 14,7	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			

Figura 30. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG 6000 diluídas em tampão PBS pH 7,5.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 790,4	Peak 1: 1076	100,0	578,8
Pdl: 0,253	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,882	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good

Figura 31. Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em solução salina 0,9%.

Figura 32. Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em tampão PBS pH 7,5.

Figura 33. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em solução salina 0,9%.

Figura 34. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina e hemoglobina polimerizada com glutaraldeído diluídas em tampão PBS pH 7,5.

Acredita-se que a variação na força iônica seja o fator predominante para as alterações observadas. Verificou-se que as partículas contendo hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG apresentaram redução do diâmetro médio, porém, o índice de polidispersão, apesar de variar, tendeu a permanecer dentro de valores aceitáveis (menores que 0,2) demonstrando assim homogeneidade das partículas suspensas. Esta manutenção de homogeneidade é atribuída à maior homogeneidade inicial da suspensão que em geral apresentou índice de polidispersão menor quando foi utilizada a hemoglobina polimerizada com bis-succinimidil succinato de PEG. De modo similar, as partículas contendo hemoglobina polimerizada com glutaraldeído igualmente apresentaram redução de diâmetro médio, entretanto, as variações sofridas no índice de polidispersão demonstram uma menor homogeneidade da população suspensa.

Os valores de potencial zeta, igualmente influenciados pelos meios diluentes, apresentaram significativa redução. Os valores obtidos, apesar de não inviabilizarem a utilização das formulações, demonstram a necessidade de estudos adicionais quanto à capacidade de agregação das partículas na presença de sangue (e.g. quando infundidas em organismos vivos). Tais estudos de caracterização da interação das partículas com tecidos vivos são pretendidos em etapa posterior ao doutorado aqui relatado.

4.9 *Análise da formação de partículas utilizando gelatina de origem óssea bovina e suína*

As partículas “em branco” geradas segundo o método de única dessolvatação apresentaram diâmetro médio de 222,6 nm e índice de polidispersão médio de 0,065; conforme ilustrado na Figura 35. O potencial zeta observado foi de -39,4 mV (Figura 36), indicando boa estabilidade da suspensão.

Figura 35. Resultados de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas “em branco” de gelatina óssea bovina e suína produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -39.4	Peak 1: -39.4	100.0	6.66
Zeta Deviation (mV): 6.66	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0802	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			

Figura 36. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas “em branco” de gelatina óssea bovina e suína produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.

Comparativamente, as partículas “em branco” geradas com gelatina óssea bovina e suína apresentaram menores valores de diâmetro médio e índice de polidispersão que os observados para a gelatina de origem coriácea bovina (Figura 18). Tais variações evidenciam (I) a influência do material de partida sobre as características das partículas formadas e (II) a importância da padronização deste material para a formação de partículas com pouca variabilidade.

As partículas contendo hemoglobina polimerizada apresentaram diâmetro médio de 438,4 nm, índice de polidispersão médio 0,563. Este índice de polidispersão apresenta-se acima do limite máximo estipulado de 0,2 e é indicativo da não homogeneidade da suspensão. A falta de homogeneidade é também vista nos gráficos de distribuição dos diâmetros das partículas (Figura 37) onde é possível identificar a presença de duas ou mais populações de partículas. A falta de homogeneidade observada pode indicar a má formação das partículas, instabilidade das partículas formadas ou tendência a formação de aglomerados ou precipitados.

Figura 37. Resultado de análise de tamanho de partícula para amostra contendo partículas de gelatina óssea bovina e suína e hemoglobina polimerizada produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.

Os valores de potencial zeta obtidos para as partículas contendo hemoglobina (Figura 38) demonstraram-se igualmente variáveis (podendo variar de -13 a -35 mV), sendo em média -24,5 mV.

Figura 38. Resultados de análise do potencial zeta para amostra contendo partículas de gelatina óssea bovina e suína e hemoglobina polimerizada produzidas pelo método de única dessolvatação utilizando-se acetona como agente de dessolvatação.

Tendo em vista os resultados obtidos, estudou-se a utilização do isopropanol

como agente de dessolvatação para a formação de partículas de gelatina de origem óssea bovina e suína. A utilização do isopropanol, entretanto, não demonstrou-se eficiente na formação de partículas mais homogêneas. Os resultados obtidos indicaram a formação de partículas de diâmetro médio de 335,5 nm, índice de polidispersão médio de 0,6 e potencial zeta médio de -33,4 mV. De modo similar ao uso de acetona, as partículas geradas com isopropanol mostraram a presença de múltiplas populações, indicando a não homogeneidade do material formado.

4.10 Análise do conteúdo de hemoglobina presente nas partículas de gelatina

A análise dos espectros dos sobrenadantes segundo o teste de Drabkin sugeriu que a gelatina residual poderia ter provocado interferência nos espectros obtidos (Figura 39). Esta interferência pôde ser observada ao comparar os espectros dos sobrenadantes diluídos em reagente de Drabkin e o da cianometemoglobina. Na esperança de remover tal interferência, buscou-se realizar a precipitação da gelatina residual com a adição de ácido tânico (em diversas concentrações) aos sobrenadantes. Entretanto, os espectros obtidos após o uso do ácido tânico indicaram que este procedimento é ineficiente para realizar a análise de Drabkin.

Figura 39. Espectros obtidos para a cianometemoglobina, o sobrenadante proveniente da centrifugação da suspensão de partículas após diluição em reagente de Drabkin, o sobrenadante proveniente da centrifugação da suspensão de partículas após a adição de ácido tânico e diluição em reagente de Drabkin.

Tendo em vista a interferência acima mencionada, realizou-se posteriormente a análise da concentração de hemoglobina presente nos sobrenadantes por meio de espectroscopia de absorção atômica. A técnica de espectroscopia de absorção atômica é uma técnica comumente empregada para a detecção e quantificação de metais (Fe no caso em questão), sendo portanto, uma alternativa para a quantificação indireta da concentração de hemoglobina. Os resultados obtidos (Tabela 2) indicam que a eficiência média de encapsulação obtida foi de 24,97 % ($\sigma = 7,38$).

Tabela 2. Resultados obtidos nas análises de espectroscopia de absorção atômica indicando a concentração de hemoglobina presente no sobrenadante, a percentagem calculada de hemoglobina não encapsulada e a percentagem calculada de hemoglobina encapsulada.

Amostra	Concentração de hemoglobina no sobrenadante (mg/mL)	Hemoglobina não encapsulada (%)	Hemoglobina encapsulada (%)
1	4,51	78,98	21,02
2	3,80	66,52	33,48
3	4,55	79,60	20,40

4.11 *Análise da remoção do monóxido de carbono*

Após a exposição das soluções de carboxihemoglobina e inositol hexafosfato à luz, realizou-se a análise espectrofotométrica das amostras na região de 450 a 650 nm. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 40.

Figura 40. Análise espectrofotométrica de amostras de soluções de carboxihemoglobina e inositol hexafosfato após período de exposição de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos à temperatura de 0,5 °C à luz de intensidade 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ gerada por lâmpada fluorescente.

A análise dos gráficos obtidos indicou que, sob as condições utilizadas, a exposição à luz por período de 40 minutos apresentou a melhor conversão da carboxihemoglobina a oxihemoglobina, conforme destacado na figura 41.

Figura 41. Resultados obtidos na análise espectrofotométrica de amostras de soluções de carboxihemoglobina e inositol hexafosfato após período de exposição de 0 e 40 minutos à temperatura de 0,5 °C à luz de intensidade 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ gerada por lâmpada fluorescente.

Em acordo com o descrito por Zijlstra e Buursma (1997), foi possível identificar, para a amostra não exposta à luz, os picos de mínima absorbância em 496 e 554 nm e os picos de máxima absorbância em 540 e 570 nm indicando a presença de carboxihemoglobina. Comparativamente, para a amostra com tempo de exposição de 40 minutos observou-se o deslocamento dos picos de mínima absorbância de 496 e 554 nm para 508 e 560 nm, respectivamente. De modo similar, o pico de máxima absorbância, anteriormente presente em 570 nm foi deslocado para 576 nm. As alterações nos espectros, assim observadas, demonstram a conversão da carboxihemoglobina em oxihemoglobina.

4.12 *Análise espectrofotométrica da afinidade pelo oxigênio das micropartículas contendo hemoglobina*

Abaixo são apresentados os gráficos realizados a partir dos resultados da absorbância entre 450 e 650 nm para hemoglobina em suas diversas formas (Figura 42) e partículas contendo hemoglobina (Figura 43).

Figura 42. Espectros na faixa de comprimento de onda de 650 a 450 nm da metemoglobina, cianometahemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina.

Figura 43. Espectros na faixa de comprimento de onda de 650 a 450 nm das partículas de gelatina “em branco” ou contendo carboxihemoglobina não polimerizada, metemoglobina não polimerizada, carboxihemoglobina polimerizada com glutaraldeído, carboxihemoglobina polimerizada com PEG.

Ao realizar-se a análise dos espectros das partículas contendo hemoglobina, verificou-se que a estruturação das partículas interfere drasticamente no espectro da hemoglobina. Verificou-se então se a intensidade do pico de máxima absorção presente em 540 nm variava quando as amostras eram submetidas a diferentes atmosferas controladas, a saber, 100% nitrogênio e 100% oxigênio, e, caso isso ocorresse, se essa variação pudesse ser relacionada com a saturação de oxigênio da hemoglobina. Entretanto, não foi obtida variação da intensidade do pico sob ambas as atmosferas estudadas.

Desta forma, chegou-se à conclusão de que a afinidade das partículas pelo oxigênio não pode ser determinada por via espectrofotométrica. Uma possível alternativa para esta determinação é o método descrito por Aberman e colaboradores (1975), o qual, apesar de não determinar ponto-a-ponto a curva de saturação da hemoglobina, é capaz de estimar a pressão de oxigênio necessária para a saturação de 50% da hemoglobina (P_{50}) em solução.

5 CONCLUSÕES

- A síntese do PEG bis-[succinimidil succinato] foi realizada com sucesso, e o produto é capaz de polimerizar a hemoglobina;
- A gelatina coriácea bovina formou partículas contendo hemoglobina bovina não polimerizada, cujo diâmetro médio é de 457,0 nm com índice de polidispersão de 0,217 e potencial zeta de -25,8 mV; assim como formou partículas contendo hemoglobina bovina polimerizada com PEG bis-[succinimidil succinato] cujo diâmetro médio é de 1370 nm com índice de polidispersão de 0,029 e potencial zeta de -36,1 mV;
- Variações na metodologia de formação de partículas (temperatura, estequiometria dos reagentes de glutaraldeído, e pH) provocam variações sobre o tamanho de partícula e a dispersividade das partículas formadas;
- Mudanças na força iônica e o pH do meio no qual as partículas contendo hemoglobina polimerizada são suspensas provocam variações sobre a dimensão e dispersividade das partículas;
- A utilização de gelatina de origem óssea bovina e suína formam partículas de hemoglobina não homogêneas com a presença de múltiplas populações de partículas;
- O teste de Drabkin não pôde ser utilizado para a avaliação da taxa de encapsulação da hemoglobina polimerizada, entretanto, por espectroscopia de absorção atômica foi possível determinar a encapsulação média em 24,97 %;

- A metodologia utilizada para a remoção do monóxido de carbono ligado à hemoglobina (exposição à luz de fonte fluorescente de intensidade de $40 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ à temperatura de $0,5^\circ\text{C}$ por 40 minutos) converteu carboxihemoglobina em oxihemoglobina;
- Não foi possível utilizar o método espectrofotométrico para a análise da afinidade pelo oxigênio das micropartículas contendo hemoglobina devido à interferência provocada pela estruturação das partículas sobre o espectro da hemoglobina.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas futuras apresentam-se as seguintes propostas:

- I) o estudo da taxa de encapsulamento da hemoglobina em partículas de gelatina de origem coriácea bovina;
- II) a determinação da curva de afinidade pelo oxigênio e do valor P_{50} das partículas de gelatina coriácea bovina contendo poli-hemoglobina;
- III) a determinação da curva de afinidade pelo oxigênio e do valor P_{50} das partículas de gelatina óssea bovina e suína;
- IV) a caracterização do PEG bis-[succinimidil succinato] por técnica de ressonância magnética nuclear;
- V) o estudo da produção de partículas de gelatina coriácea e hemoglobina utilizando-se outros sistemas de dessolvatação, como por exemplo, misturas de etanol e 1-butanol;

7 BIBLIOGRAFIA

ABERMAN, A. et al. Blood P50 calculated from a single measurement of pH, PO₂, and SO₂. **Journal of applied physiology**, v. 38, n. 1, p. 171–6, jan. 1975.

ADAMS, E. C.; WEISS, M. R. Calorimetric studies of the haemoglobin-haptoglobin reaction. **The Biochemical journal**, v. 115, p. 441–447, 1969.

ALAYASH, A. I. Redox and Radical Reactions of Hemoglobin Solutions : Toxicities and Protective Strategies. In: WINSLOW, R. M. (Ed.). **Blood Substitutes**. London: Elsevier, 2006. p. 197–205.

ALAYASH, A. I. Setbacks in blood substitutes research and development: a biochemical perspective. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 2, p. 381–9, jun. 2010.

ALAYASH, A. I. Blood substitutes: Why haven't we been more successful? **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 177–185, abr. 2014.

ALAYASH, A. I.; D'AGNILLO, F.; BUEHLER, P. W. First-generation blood substitutes: what have we learned? Biochemical and physiological perspectives. **Expert opinion on biological therapy**, v. 7, n. 5, p. 665–75, maio 2007.

AMBERSON, W. R. et al. MAMMALIAN LIFE WITHOUT RED BLOOD CORPUSCLES. **Science (New York, N.Y.)**, v. 78, n. 2014, p. 106–7, 4 ago. 1933.

AMBERSON, W. R. BLOOD SUBSTITUTES. **Biological Reviews**, v. 12, n. 1, p. 48–86, jan. 1937.

AMBERSON, W. R.; JENNINGS, J. J.; RHODE, C. M. Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. **Journal of applied physiology**, v. 1, n. 7, p. 469–89, jan. 1949.

ANDERSEN, C. B. F. et al. Structure of the haptoglobin–haemoglobin complex. **Nature**. Nature Publishing Group, 20 set. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11369>>. Acesso em: 5 set. 2014

BAINES, A. D. Renal Toxicity. In: WINSLOW, R. M. (Ed.). **Blood Substitutes**. London: Elsevier, 2006. p. 217–226.

BELCHER, J. D. et al. Heme degradation and vascular injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 2, p. 233–248, 2010.

BENNETT-GUERRERO, E. et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 43, p. 17063–8, 23 out. 2007.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Queda na taxa de doação por habitantes é registrada na Semana Nacional do Doador de Sangue.** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=15862&catid=174&Itemid=406>. Acesso em: 22 jan. 2015.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004.** Brasília, 2004.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim de Hemovigilância nº 1: 2008.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e5fd0004927e12ca375b314d16287af/boletim_hemo_1_2008.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 5 ago. 2014.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim de Hemovigilância nº 2: 2009.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/aeb95f804927e1b9a37eb314d16287af/Boletim_hemo_2_2009.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 5 ago. 2014.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - www.anvisa.gov.br.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/posuso!/ut/p/c5/rY_JdoJAE EW_hQ_QbgSasGQK3TLJ4EBvOGAMDgyNGtD--nhOVInEbHxvWa_q1gMUPNwWw6EqroeuLWqwARTlpqNjWfUgDHEAIQIV350vLAixCNZgA-U8Od4Z4SceH-F485d7NzkuR9-yue9FMEIDKbFF93laRT1i2by-FA5tmcK73q2Ifk95gCtBeL>. Acesso em: 18 dez. 2014a.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim de Hemovigilância nº 5: 2012.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b38ebb004dc642d7861dbed6059e5711/boletim_5_atualizado.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 5 ago. 2014b.

BUEHLER, P. W. et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. **Blood**, v. 113, n. 11, p. 2578–86, 12 mar. 2009.

BUEHLER, P. W.; D'AGNILLO, F. Toxicological consequences of extracellular hemoglobin: biochemical and physiological perspectives. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 2, p. 275–291, 2010.

BURHOP, K.; GORDON, D.; ESTEP, T. Review of Hemoglobin-Induced Myocardial Lesions. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 353–374, 25 ago. 2004.

CABRALES, P.; INTAGLIETTA, M. Blood substitutes: evolution from noncarrying to oxygen- and gas-carrying fluids. **ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)**, v. 59, n. 4, p. 337–54, 2013.

CHEN, J.-Y.; SCERBO, M.; KRAMER, G. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 64, n. 8, p. 803–13, jan. 2009.

CHIANCONE, E. et al. Studies on the reaction of haptoglobin with haemoglobin and haemoglobin chains. I. Stoichiometry and affinity. **Journal of molecular biology**, v. 34, p. 347–356, 1968.

CRETEUR, J.; VINCENT, J.-L. Potential uses of hemoglobin-based oxygen carriers in critical care medicine. **Critical care clinics**, v. 25, n. 2, p. 311–24, Table of Contents, abr. 2009.

D'ALMEIDA, M. S. et al. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. **Transfusion medicine (Oxford, England)**, v. 10, n. 4, p. 291–303, dez. 2000.

DOHERTY, D. H. et al. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 672–6, jul. 1998.

EASTRIDGE, B. J. et al. Death on the battlefield (2001-2011): implications for the future of combat casualty care. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 73, n. 6 Suppl 5, p. S431–7, dez. 2012.

ELMER, J.; ALAM, H. B.; WILCOX, S. R. Hemoglobin-based oxygen carriers for hemorrhagic shock. **Resuscitation**, v. 83, n. 3, p. 285–92, mar. 2012.

FAHRAEUS, R. The suspension stability of the blood. **Physiological Reviews**, v. 9, n. 2, p. 241–274, 1929.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 385–8, 24 nov. 1988.

GBUREK, J. et al. Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 13, n. 11, p. 423–430, 2002.

GOODNOUGH, L. T. Risks of blood transfusion. **Anesthesiology clinics of North America**, v. 23, n. 2, p. 241–52, jun. 2005.

GOODNOUGH, L. T.; SHANDER, A.; SPENCE, R. Bloodless medicine: clinical care without allogeneic blood transfusion. **Transfusion**, v. 43, n. 5, p. 668–676, maio 2003.

GOORHA, Y. et al. Artificial blood. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 59, n. 1, p. 45–50, jan. 2003.

GREENWALT, T. A short history of transfusion medicine. **Transfusion**, v. 37, n. 5, p. 550–563, maio 1997.

GULATI, A.; SHARMA, A C.; SINGH, G. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. **Critical care medicine**, v. 24, n. 1, p. 137–147, 1996.

GULATI, A. et al. Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. **Life sciences**, v. 56, n. 17, p. 1433–1442, 1995.

GULATI, A. et al. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 2 Pt 2, p. H827–H836, 1997.

HIBBS, J.; TAINTOR, R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 473–476, 23 jan. 1987.

HUANG, Z. et al. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 8, p. 2099–107, ago. 2005.

HWANG, P. K.; GREER, J. Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin. Haptoglobin complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 3038–3041, 1980.

JIA, Y. et al. Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: A novel oxidative pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 7, p. 4894–4907, 2007.

JIA, Y. et al. Haptoglobin preferentially binds β but not α subunits cross-linked hemoglobin tetramers with minimal effects on ligand and redox reactions. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59841, jan. 2013.

KIM-SHAPIRO, D. B.; GLADWIN, M. T. Mechanisms of nitrite bioactivation. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 38, p. 58–68, 30 abr. 2014.

KIM-SHAPIRO, D. B.; SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 4, p. 697–705, abr. 2006.

KLUGER, R. Red cell substitutes from hemoglobin--do we start all over again? **Current opinion in chemical biology**, v. 14, n. 4, p. 538–43, ago. 2010.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 61–88, 2003.

KOCH, C. G. et al. Transfusion in coronary artery bypass grafting is associated with reduced long-term survival. **The Annals of thoracic surgery**, v. 81, n. 5, p. 1650–7, maio 2006a.

KOCH, C. G. et al. Morbidity and mortality risk associated with red blood cell and blood-component transfusion in isolated coronary artery bypass grafting. **Critical care medicine**, v. 34, n. 6, p. 1608–16, jun. 2006b.

LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 375–414, set. 2000.

MAINES, M. D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 37, n. 1, p. 517–554, 1997.

MAINES, M. D. The heme oxygenase system: update 2005. **Antioxidants & redox signaling**, v. 7, n. 11-12, p. 1761–1766, 2005.

MARTA, M. et al. Anionic binding site and 2,3-DPG effect in bovine hemoglobin. **Biochemistry**, v. 37, n. 40, p. 14024–9, 6 out. 1998.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 305–21, jun. 2007.

MORITA, T. et al. Preparation of gelatin microparticles by co-lyophilization with poly(ethylene glycol): characterization and application to entrapment into biodegradable microspheres. **International journal of pharmaceutics**, v. 219, n. 1-2, p. 127–37, 21 maio 2001.

MOZZARELLI, A. Hemoglobin-based oxygen carriers as blood substitutes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1784, n. 10, p. 1363–4, out. 2008.

NAGEL, R. L.; GIBSON, Q. H. The binding of hemoglobin to haptoglobin and its relation to subunit dissociation of hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 1, p. 69–73, 10 jan. 1971.

NATANSON, C. et al. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 299, n. 19, p. 2304–2312, 21 maio 2008.

NIELSEN, M. J.; MØLLER, H. J.; MOESTRUP, S. K. Hemoglobin and heme scavenger receptors. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 2, p. 261–273, 2010.

OFFNER, P. J. et al. Increased rate of infection associated with transfusion of old blood after severe injury. **Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)**, v. 137, n. 6, p. 711–6; discussion 716–7, jun. 2002.

OLIVEIRA, M. A. B. DE et al. [Concepts of basic physics that every cardiovascular surgeon should know: part I - mechanics of fluids]. **Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 1, p. 1–10, 2010.

PORTÖRO, I. et al. Towards a novel haemoglobin-based oxygen carrier: Euro-PEG-Hb, physico-chemical properties, vasoactivity and renal filtration. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1784, n. 10, p. 1402–9, out. 2008.

PURDY, F. R.; TWEEDDALE, M. G.; MERRICK, P. M. Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients. **Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie**, v. 44, n. 12, p. 1256–61, dez. 1997.

REEDER, B. J. The redox activity of hemoglobins: from physiologic functions to pathologic mechanisms. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 7, p. 1087–1123, 2010.

RIBATTI, D. William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. **Journal of angiogenesis research**, v. 1, p. 3, jan. 2009.

RIESS, J. G. Oxygen Carriers ("Blood Substitutes") Raison d'Etre, Chemistry, and Some Physiology Blut ist ein ganz besonderer Saft 1. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 9, p. 2797–2920, set. 2001.

RINALDI, A. A bloodless revolution. A growing interest in artificial blood substitutes has resulted in new products that could soon improve transfusion medicine. **EMBO reports**, v. 6, n. 8, p. 705–8, ago. 2005.

ROBINSON, W. P. et al. Blood Transfusion Is an Independent Predictor of Increased Mortality in Nonoperatively Managed Blunt Hepatic and Splenic Injuries. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 58, n. 3, p. 437–445, mar. 2005.

SAKAI, H. et al. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. **Protein expression and purification**, v. 4, n. 6, p. 563–569, dez. 1993.

SAMAJA, M. et al. Effect of temperature on the p50 value for human blood. **Clinical chemistry**, v. 29, n. 1, p. 110–4, jan. 1983.

SANTOS, L. A. DE C. Doação, transfusão e laços de sangue: cultura e sociedade no Brasil contemporâneo. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 2, n. 1, p. 167–170, jun. 1995.

SCHAER, D. J. et al. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 373–380, 1 jan. 2006.

SCHAER, D. J. et al. Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blood**, v. 121, n. 8, p. 1276–1284, 2013.

SHANDER, A. et al. Estimating the cost of blood: past, present, and future directions. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 21, n. 2, p. 271–289, 2007.

SILVA, J. M. et al. Complications and prognosis of intraoperative blood transfusion. **Revista brasileira de anesthesiologia**, v. 58, n. 5, p. 454–61, 447–54, 2008.

SILVERMAN, T. A.; WEISKOPF, R. B. Hemoglobin-based oxygen carriers: Current status and future directions. **Transfusion**, v. 49, n. 11, p. 2495–2515, nov. 2009.

SIMONI, J. et al. Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE)-like activity of acellular hemoglobin. **Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 191–210, 2007.

SIMONI, J. Artificial oxygen carriers: renewed commercial interest and scientific/technological advances. **Artificial organs**, v. 36, n. 2, p. 123–6, fev. 2012.

TANAKA, P. P.; TANAKA, M. A. A. Substâncias carreadoras de oxigênio à base de hemoglobina: situação atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Anesthesiologia**, v. 53, n. 4, p. 543–554, ago. 2003.

TAYLOR, R. W. et al. Impact of allogenic packed red blood cell transfusion on nosocomial infection rates in the critically ill patient. **Critical care medicine**, v. 30, n. 10, p. 2249–54, out. 2002.

The Cost of Blood: Multidisciplinary Consensus Conference for a Standard Methodology. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, n. 1, p. 66–78, jan. 2005.

VAMVAKAS, E. C.; CARVEN, J. H. Transfusion and postoperative pneumonia in coronary artery bypass graft surgery: effect of the length of storage of transfused red cells. **Transfusion**, v. 39, n. 7, p. 701–10, jul. 1999.

WALLER, M.; FAKHRY, S. M. Hemorrhagic Shock and the Use of Blood Substitutes. **Perioperative Nursing Clinics**, v. 1, n. 2, p. 135–148, jun. 2006.

WINSLOW, R. M. Blood substitutes: refocusing an elusive goal. **British journal of haematology**, v. 111, n. 2, p. 387–96, nov. 2000.

WINSLOW, R. M. Targeted O₂ delivery by low-p50 hemoglobin: a new basis for hemoglobin-based oxygen carriers. **Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 1–12, out. 2005.

WINSLOW, R. M. Clinical Indications for Blood Substitutes and Optimal Properties. In: WINSLOW, R. M. (Ed.). **Blood Substitutes**. London: Elsevier, 2006a. p. 115–125.

WINSLOW, R. M. Historical Background. In: WINSLOW, R. M. (Ed.). **Blood Substitutes**. London: Elsevier, 2006b. p. 5–16.

WINSLOW, R. M. Oxygen: The poison is in the dose. **Transfusion**, v. 53, n. 2, p. 424–437, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Towards 100 % Voluntary Blood Donation: A Global Framework for Action**. Disponível em: <http://www.who.int/bloodsafety/publications/9789241599696_eng.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Database on Blood Safety: Summary Report 2011**. Genebra: [s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Blood safety and availability: Fact sheet N°279 updated June 2014**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/>>. Acesso em: 9 dez. 2014.

YU, B.; BLOCH, K. D.; ZAPOL, W. M. Hemoglobin-based red blood cell substitutes and nitric oxide. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 19, n. 3, p. 103–7, abr. 2009.

ZALLEN, G. et al. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. **American journal of surgery**, v. 178, n. 6, p. 570–2, dez. 1999.

ZHANG, W. et al. A novel hemoglobin-based oxygen carrier, polymerized porcine hemoglobin, inhibits H₂O₂-induced cytotoxicity of endothelial cells. **Artificial organs**, v. 36, n. 2, p. 151–60, fev. 2012.

ZIJLSTRA, W. G.; BUURSMA, A. Spectrophotometry of hemoglobin: Absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 4, p. 743–749, 1997.