



LUCAS BESSA PRADO

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DE
ENOXAPARINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS EM MODELO DE
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA EM RATOS”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUCAS BESSA PRADO

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DE
ENOXAPARINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS EM MODELO DE
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA EM RATOS”**

Orientador(a): Prof^a Dr^a Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, na área de concentração em Medicina Experimental.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO LUCAS BESSA
PRADO E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. JOYCE MARIA
ANNICHINO-BIZZACCHI.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P882a Prado, Lucas Bessa, 1986-

Avaliação da atividade anticoagulante e antitrombótica de enoxaparina encapsulada em nanopartículas em modelo de trombose venosa profunda em ratos

/ Lucas Bessa Prado. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Trombose venosa profunda. 2. Nanopartículas. 3. Enoxaparina. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the anticoagulant and antithrombotic activity of enoxaparin encapsulated in nanoparticles in model of deep vein thrombosis in rats

Palavras-chave em inglês:

Deep vein thrombosis

Nanoparticles

Enoxaparin

Área de concentração: Medicina Experimental

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi [Orientador]

Erich Vinicius de Paula

Maria Palmira Daflon Gremião

Data de defesa: 30-01-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUCAS BESSA PRADO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI



2. PROF(A). DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



3. PROF(A). DR(A). MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de janeiro de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, Luiz Antônio do Prado e Maria de Fátima de Jesus Prado, e aos meus irmãos Luiz Rafael Bessa Prado e Geovana Bessa Prado Brait.

AGRADECIMENTOS

À Deus: inteligência suprema, causa primária de todas as coisas.

À minha família: Fátima, Luiz do Prado, Jô, Sael, Brait, Tia Cida, Tio Sílvio, Tia Lúcia, Fabiano, Daniella, Tia Ivone, Tio Nadico, Fabiana e Breulim pelo carinho desde o início do trabalho e pelo apoio incondicional, apesar da distância.

À Dr^a Joyce, por ter acreditado em meu potencial, proporcionando essa oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À Dr^a Priscyla e ao Professor Néelson Durán pela colaboração e ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Erich: pela atenção e pelos valiosos ensinamentos durante todo o estudo.

Aos meus amigos: Fabiano, Marcel, Turquim, Cabidim, Zé Bétio, Betim, Rex, Thomaz, Mivleder, Renan, Gilim, Mancha, Marcelinho, Carteiro, Tibas, Bubu e Belóide pela força e companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório de Hemostasia: Cris, Deva, Ucha, Júlia, Silmara, Tânia, Susan e Ricardinho, pelos primeiros passos no Laboratório, colaboração e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Hemostasia: Ricardinho, Mari, Bruna, Barba, Kiara, Aline Aléssio, Carla, Aline Barnabé, Fernanda Santiago, Aline Urban, Stephany, Maiara, Gleice, Wanessa, Lais, Carol, Vagner, Josie pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Química Biológica: Chico, Elias, Larissa, Dani Pott, Dani Ridolfi, Jeanifer, Junko, Alessandra, Almas, Fabian, Buba e Juliana, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina Experimental: William, Ana, Miguel e Dito, pelos ensinamentos e pelos auxílios experimentais.

À Gabriela, que em grande parte deste trabalho esteve ao meu lado, com todo seu carinho, compreensão e paciência.

À FAPESP: pela ajuda financeira durante todo o trabalho.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da FAPESP, através do processo 2010/04395-1.

Responsável: Prof^a Dr^a Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1.1. Trombose Venosa Profunda.....	19
1.2. Heparina.....	21
1.3. Sistemas de liberação sustentada.....	26
1.4. Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)	29
1.5. Quitosana	29
1.6. Encapsulamento da Heparina	31
OBJETIVOS	33
JUSTIFICATIVA	35
MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Preparação das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina.....	38
4.2. Caracterização das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina	39
4.2.1. Eficiência de encapsulamento	39
4.2.2. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas	40
4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
4.3. Análises de citotoxicidade	41
4.3.1. Ensaio de citotoxicidade	42
4.3.2. Incorporação do Vermelho Neutro.....	43
4.4. Determinação da atividade anticoagulante (atividade anti-Xa) das nanopartículas com enoxaparina in vivo	44
4.5. Indução de TVP por estase e hipercoagulabilidade em modelo animal	45

4.6. Avaliação in vivo do efeito antitrombótico de enoxaparina livre e encapsulada, em modelo de TVP em ratos.....	46
4.7. Análise Estatística	47
RESULTADOS.....	48
5.1. Preparação das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina.....	49
5.2. Caracterização das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina	49
5.2.1. Eficiência de Encapsulamento	49
5.3. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas	51
5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
5.5 Análises de citotoxicidade	56
5.6. Determinação da atividade anticoagulante (atividade anti-Xa) in vivo	59
5.7. Indução de TVP por estase e hipercoagulabilidade em modelo animal	61
5.8. Avaliação in vivo do efeito antitrombótico de enoxaparina livre e encapsulada, em modelo de TVP em ratos.....	65
DISCUSSÃO	68
6.1. Preparação e caracterização das nanopartículas com enoxaparina	69
6.2. Padronização do modelo de TVP em ratos	72
6.3. Determinação da atividade anticoagulante (atividade anti-Xa) in vivo	73
6.4. Avaliação do efeito antitrombótico in vivo em modelo de TVP em ratos	76
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

a/o/a: água/óleo/água

AT III: Antitrombina III

Au/Pd: Ouro/Paládio

CEC: Circulação extracorpórea

DS: Sulfato de Dextran

EE: Eficiência de encapsulamento

Et al.: E outros (as)

FXa: Fator X ativado

HBPM: Heparina de baixo peso molecular

HNF: Heparina não fracionada

kV: Kilovolts

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mV: Milivolt

NP: Nanopartículas

PA: Poliacrilato

PLA: Polilácticos

PCL: Poli (ϵ -caprolactona)

PCS: Photons Correlation Spectroscopy

PdI: Índice de Poldispersidade

PLGA: Poli (D, L-láctico-co-glicólico)

PVA: Polivinil-álcool

rcf: Relative centrifugal force

rpm: Rotações por minuto

SAF: Síndrome do anticorpo antifosfolípide

SNAC: N-[8(2-hidroxibenzoil) amino caprilato]

TEP: Trombo embolismo pulmonar

TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial ativado

TVP: Trombose venosa profunda

UV-Vis: Ultravioleta visível

VN: Vermelho Neutro

A Trombose Venosa Profunda (TVP) é definida como uma oclusão parcial ou total da circulação venosa profunda. A heparina é um fármaco com ação anticoagulante e antitrombótica utilizado desde 1930. O custo, a via de administração (endovenosa ou subcutânea) e as doses repetidas são algumas das limitações do seu uso. Assim, o desenvolvimento de um produto que possa ser administrado por via subcutânea ou oral em um menor número de aplicações, torna-se um importante desafio e de grande aplicabilidade clínica. Sistemas de liberação sustentada permitem que o fármaco seja encapsulado e liberado gradativamente. Este estudo constituiu na preparação, caracterização e avaliação *in vivo* de nanopartículas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e quitosana como carreadores de heparina de baixo peso molecular (enoxaparina). As nanopartículas foram preparadas pelo método de dupla emulsão água/óleo/água e evaporação do solvente. A caracterização das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foram observadas partículas esféricas e homogêneas. O diâmetro médio das nanopartículas foi de $512,8 \pm 13,8$ nm e o potencial zeta foi de $+30,9 \pm 1,3$ mV. A eficiência de encapsulamento, analisada pelo método Azure II foi de $99,04 \pm 0,001$ %. A atividade anticoagulante *in vivo* da enoxaparina encapsulada foi avaliada pela atividade anti-Xa plasmática, através de método colorimétrico. Quando a enoxaparina livre foi administrada por via subcutânea observou-se um pico de atividade (0,5 UI/mL) em 1 hora, com um decréscimo gradual até 6 horas. A atividade anticoagulante da enoxaparina

encapsulada em nanopartículas manteve-se por até 14 horas, quando foi administrada por via subcutânea, sugerindo que as nanopartículas podem permitir que a enoxaparina seja liberada de forma gradual, podendo ser uma vantagem na prática clínica. Após a administração das nanopartículas por via oral não se observou nenhuma atividade em até 14 horas, sugerindo que as nanopartículas não tenham sido absorvidas ou a enoxaparina tenha sido degradada no trato gastrointestinal. Para avaliação do efeito antitrombótico foi padronizado o modelo de TVP por estase e hipercoagulabilidade em ratos. Após administração subcutânea, houve uma significativa diminuição do tamanho do trombo formado tanto com o emprego de enoxaparina livre ($p= 0,002$) como após encapsulamento em nanopartículas ($p= 0,0411$) em comparação ao grupo controle. Quando foram administradas nanopartículas por via oral, os resultados mostraram que não houve diferença estatística em comparação ao grupo controle ($p= 0,9476$) e a um grupo de nanopartículas vazias ($p= 0,9372$). Em resumo, o método de dupla emulsão a/o/a mostrou-se eficiente para o encapsulamento de enoxaparina, proporcionando a obtenção de nanopartículas esféricas e com alta eficiência de encapsulamento. Pelos estudos *in vivo*, a enoxaparina encapsulada mostrou uma atividade anticoagulante com liberação sustentada, por um período superior ao obtido com a enoxaparina livre, com excelente efeito antitrombótico quando administrada por via subcutânea. Contudo, não se observou nenhum efeito anticoagulante ou antitrombótico quando as nanopartículas foram administradas por via oral. Novos experimentos com quitosanas de diferentes massas molares serão necessários na tentativa de possibilitar a absorção oral dessas nanopartículas.

ABSTRACT

Deep vein thrombosis (DVT) is defined as partial or total occlusion of the deep venous circulation. Heparin is a drug with anticoagulant and antithrombotic action used since 1930. The costs, administration vias (intravenous or subcutaneous) and the repeated doses are some limitations of its use. Thus, the development of a product that could be administered subcutaneous or orally in a smaller number of applications becomes a major challenge with huge clinical applicability. Sustained release systems allow the medication to be gradually encapsulated and released. This study was based on the preparation, characterization and *in vivo* evaluation of nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone) (PCL) and chitosan as carriers of low molecular weight heparin (enoxaparin). The nanoparticles were prepared by the double emulsion water/oil/water method and solvent evaporation. The nanoparticles characterization was performed by scanning electron microscopy (SEM), in which were observed spherical and homogeneous particles. The average diameter of the nanoparticles was 512.8 ± 13.8 nm and the zeta potential was $+30.9 \pm 1.3$ mV. The encapsulation efficiency, analyzed by Azure II method, was $99.04 \pm 0.001\%$. The *in vivo* anticoagulant activity of the encapsulated enoxaparin was evaluated by plasmatic anti-Xa activity performed by colorimetric method. When the free enoxaparin was subcutaneously administered a peak of activity was observed (0.5 IU/mL) in 1 hour with a gradual decrease until 6 hours. The anticoagulant activity of the nanoparticles encapsulated enoxaparin was kept until 14 hours when it was administered subcutaneously, suggesting that nanoparticles may allow the enoxaparin release by a gradual way, what could be

an advantage on clinical practice. After the oral administration of the nanoparticles, any activity could be observed in until 14 hours, suggesting that or the nanoparticles might be not absorbed or the enoxaparin might be degraded on the gastrointestinal tract. In order to evaluate its antithrombotic effect, it was standardized a model of DVT by stasis and hypercoagulability in rats. After subcutaneous administration, there was a significative reduction on the thrombus size both with free enoxaparin ($p= 0.002$) and after encapsulation ($p= 0.0411$) in comparison with control group. When nanoparticles were administered orally, the results showed no statistical difference compared to the control group ($p = 0.9476$) and to a group of empty nanoparticles ($p = 0.9372$). In summary, the double emulsion method w/o/w was efficient for the enoxaparin encapsulation, providing the obtainment of spherical nanoparticles with high encapsulation efficiency. For *in vivo* studies, the encapsulated enoxaparin showed a sustained release anticoagulant activity for a higher period than that obtained with free enoxaparin, with an excellent antithrombotic effect when administered subcutaneously. However, there was no anticoagulant or antithrombotic effect when the nanoparticles were administered orally. Further experiments with chitosans of different molecular weights will be needed on the attempt to allow the oral absorption of these nanoparticles.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Trombose Venosa Profunda

A Trombose Venosa Profunda (TVP) é um dos mais importantes problemas de Saúde Pública, com uma incidência anual estimada de 67 em cada 100.000 indivíduos na população (Silverstein et al, 1998; White, 2003).

Conforme já descrito por Virchow há mais de um século, e ainda considerado um conceito aplicável, as bases fisiopatológicas da TVP são: alteração da parede do vaso, do fluxo sanguíneo, e/ou da composição sanguínea (Rosendaal, 2005).

A TVP é considerada uma doença multifatorial em que a interação de fatores genéticos e ambientais podem desencadear o processo trombótico. Contudo, nem todos os fatores são conhecidos e isto explica o fato de ocorrer TVP em pacientes aparentemente sem nenhum fator de risco evidente (Barros-Sena e Genestra, 2008).

A formação de um coágulo obstrutivo que define a trombose é o produto final de um desequilíbrio de fatores pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticos.

Em geral o membro inferior é o sítio mais frequentemente acometido pela TVP. O trombo no sistema venoso profundo pode levar à oclusão total do segmento vascular envolvido, ou a qualquer momento pode desprender-se da parede e causar tromboembolismo pulmonar (TEP). Caso o trombo permaneça aderido à parede do vaso, o sistema fibrinolítico irá pouco a pouco dissolvê-lo. Quando esta dissolução não é completa, ocorre organização e incorporação do

trombo à parede do vaso. Em geral o trombo se forma próximo às válvulas dos vasos, e sua organização pode resultar em incompetência valvular e estase venosa (Moser, 1990).

As complicações agudas da TVP incluem o aumento do trombo durante o tratamento, sua embolização, e a morte do paciente, em geral decorrente de TEP maciço. Complicações tardias podem incluir a síndrome pós-trombótica, a hipertensão pulmonar e as recorrências (Cater, 1994).

A trombofilia é definida como uma predisposição à trombose decorrente de alterações hereditárias ou adquiridas da coagulação ou da fibrinólise, que levam a um estado pró-trombótico. As trombofilias hereditárias são, na maior parte dos casos, decorrentes de alterações ligadas aos inibidores fisiológicos da coagulação (antitrombina, proteína C, proteína S), ou de mutações de fatores da coagulação (mutação G20210A no gene da protrombina e mutação G1691A no gene do FV - FV Leiden). A trombofilia é adquirida quando é decorrente de uma condição não hereditária, e são os fatores mais comuns. Entre os fatores adquiridos podemos citar: neoplasias, presença do anticorpo antifosfolípide (SAF), imobilização, cirurgias, terapia de reposição hormonal, anticoncepcionais hormonais, doenças mieloproliferativas, entre outros (D'Amico, 2003).

O tratamento da TVP baseia-se no uso de anticoagulantes, que devem ter uma ação rápida, para evitar o aumento do trombo e o TEP, e prevenir eventos recorrentes em longo prazo (Scarvelis et al, 2006).

A heparina é o principal anticoagulante utilizado, tanto para o tratamento da TVP na fase aguda, como para a prevenção em situações de risco de trombose.

1.2. Heparina

A heparina é um fármaco com ação antitrombótica, amplamente utilizada desde 1930 (Longhi et al, 2001). É um polissacarídeo sulfatado obtido a partir de tecidos animais, suíno e bovino. É o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, superado apenas pela insulina. Foi também graças à descoberta da heparina que ocorreu um dos avanços mais importantes para o desenvolvimento das cirurgias cardíacas, com utilização da circulação extracorpórea (CEC) (Melo et al, 2008).

A heparina é formada por uma mistura heterogênea de glicosaminoglicanos e polissacarídeos compostos por longas cadeias de dissacarídeos repetidos (hexosamina e ácido glucurônico ou idurônico) (figura 1). A composição das heparinas disponíveis atualmente apresenta ampla variação quanto ao peso molecular, atividade anticoagulante e propriedades farmacocinéticas. A heparina apresenta moléculas com peso que variam de 3 a 30 kDa, mas a maioria está entre 12 e 15 kDa.

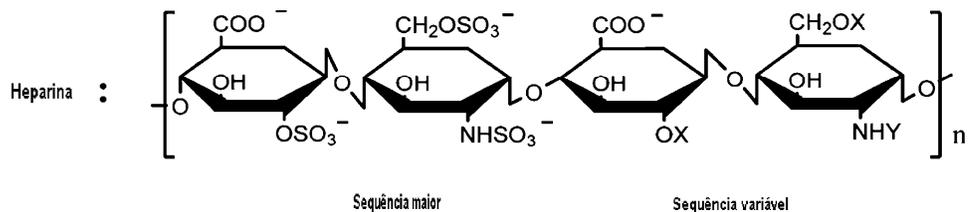


Figura 1: Estrutura da heparina

A heparina é um anticoagulante indireto que atua como cofator da antitrombina, um anticoagulante natural. Ela se liga a sítios de lisina da

antitrombina induzindo sua mudança conformacional, que expõe alguns sítios arginina, convertendo-a em um potente inibidor da coagulação. A ação anticoagulante da antitrombina ocorre pela formação de uma ligação covalente irreversível entre o sítio reativo arginina da antitrombina e os sítios serina dos fatores de coagulação.

O complexo heparina-antitrombina inativa principalmente a trombina (fator IIa) e o fator Xa e, com menor afinidade os fatores IXa, XIa e XIIa. Para inativação da trombina é necessária a formação de um complexo ternário entre a heparina e a antitrombina/trombina. A formação desse complexo promove maior aproximação dos sítios ativos da antitrombina/trombina. Somente cadeias com mais de 18 sacarídeos, contendo o pentassacarídeo de alta afinidade tem essa capacidade. Por outro lado, a inativação do fator Xa e dos outros fatores de coagulação não requer a formação desse complexo (Jiao et al, 2002).

A heparina é um fármaco macromolecular hidrofílico com carga superficial negativa. Esta propriedade físico-química da heparina limita a sua permeabilidade através da membrana, quando administrada por via oral (Park et al, 2010). Portanto, na prática clínica a heparina é administrada por via endovenosa ou subcutânea.

A heparina liga-se às plaquetas e prolonga o tempo de sangramento em humanos, além de ligar-se a várias proteínas plasmáticas, o que interfere com sua atividade anticoagulante, e contribui para a variabilidade na resposta ao tratamento. Além disso, a heparina liga-se às células endoteliais, aos macrófagos e ao fator de von Willebrand.

A depuração plasmática da heparina ocorre inicialmente através de uma saturação rápida, pela ligação aos receptores de células endoteliais e macrófagos, onde é despolimerizada. Num segundo momento, mais lento, ocorre a depuração renal. A depuração da heparina depende do comprimento de sua cadeia, e as de menor tamanho são eliminadas mais lentamente.

Em doses terapêuticas, uma proporção considerável de heparina é eliminada rapidamente pelo mecanismo de saturação, o que explica uma relação positiva entre o tempo de eliminação e a dose administrada de heparina.

Todos os fatores descritos anteriormente levam a uma grande variação na resposta ao tratamento com a heparina, o que demanda o monitoramento laboratorial através do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), e é um inconvenientes na prática clínica.

Com o desenvolvimento das heparinas de baixo peso molecular (HBPM), que apresentam peso molecular na faixa de 3 a 6,5 kDa, e são produzidas pela digestão enzimática da heparina, algumas dessas limitações foram superadas. As HBPM apresentam propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas superiores às da heparina e demonstram baixa afinidade pelas proteínas celulares e plasmáticas. Portanto, as HBPM apresentam resposta anticoagulante mais previsível e reprodutível que a heparina, não sendo necessário o monitoramento na maioria das situações clínicas (Park et al, 2012).

A depolimerização da heparina causa uma menor ligação às proteínas plasmáticas, levando a uma melhor biodisponibilidade. Por outro lado, a menor ligação aos macrófagos e células endoteliais reduz a depuração por saturação, o que aumenta a meia vida das HBPM.

Assim como a heparina, as HBPM exercem seu efeito anticoagulante pela ativação da antitrombina. Como a maior parte das cadeias das HBPM apresenta menos de 18 sacarídeos, a maioria dos fragmentos não podem se ligar simultaneamente à trombina e antitrombina, e seu papel anticoagulante principal ocorre pela inativação do fator Xa (Yildis et al, 2005). Assim, enquanto a proporção anti-Xa:anti-IIa na heparina não fracionada é de 1:1, há uma variação de 2:1 a 4:1 nas HBPM, de acordo com a proporção de suas cadeias com diferentes tamanhos.

As propriedades farmacocinéticas das HBPM são superiores à heparina, pois apresentam maior biodisponibilidade por via subcutânea quando administradas em menor dose, dose-resposta preditiva e meia-vida superior. O pico de atividade anti-Xa ocorre 3 a 5 horas após a injeção subcutânea e sua depuração não é dose dependente. Assim, as HBPM são administradas em doses fixas para tromboprolifaxia e em doses ajustáveis por Kg de peso para o tratamento da TVP. Geralmente não há necessidade de monitoramento laboratorial, e somente em situações específicas, o mesmo pode ser realizado pela aferição da atividade anti-Xa no plasma.

Em termos gerais, comparativamente à heparina, as HBPM apresentam vantagens na prática clínica, pela via de administração subcutânea, demonstrando maior absorção com uma ou duas aplicações diárias, e não necessitando de controle laboratorial na maioria dos pacientes. Assim, as HBPM são o fármaco de escolha para o tratamento agudo da TVP.

Uma situação que seria muito desejável é a possibilidade de utilização de um menor número de doses de heparina, diminuindo o desconforto das

injeções subcutâneas. Ainda, o mais interessante, seria a possibilidades de administração pela via oral.

A administração oral da heparina em humanos foi demonstrada com sucesso utilizando-se um intensificador da absorção do fármaco, o composto N-[8(2-hidroxibenzoil) amino caprilato] (SNAC). Foram obtidos resultados satisfatórios em relação à atividade anticoagulante, com uma duração de 4 horas, com doses entre 30.000 a 150.000 UI. Contudo, houve baixa adesão ao tratamento pelo sabor desagradável da formulação (Baughman et al, 1998; Hull et al, 2001; Berkowitz et al, 2003).

Outro dado interessante quanto ao uso das heparinas na fase aguda da TVP é que as mesmas apresentam uma ação anti-inflamatória que pode contribuir para a melhora do processo trombótico.

Apesar de atualmente termos no mercado novos anticoagulantes orais, que inibem diretamente o FXa ou a trombina, esse efeito anti-inflamatório não está presente. Além disso, esses novos fármacos não tem um antídoto específico e apesar de não necessitarem de controle laboratorial, não tem nenhum exame com especificidade e sensibilidade adequados para sua monitorização, quando necessário. Um outro ponto importante na prática clínica é que ainda não existem estudos clínicos para utilização desses fármacos em situações de profilaxia da TVP em cirurgias não ortopédicas ou em pacientes clínicos hospitalizados, o que faz da heparina o fármaco indicado nessas situações.

1.3. Sistemas de liberação sustentada

Esforços significativos têm sido dedicados recentemente no desenvolvimento de tecnologia para sistemas de liberação sustentada, utilizando-se sistemas coloidais como lipossomas, micro e nanopartículas. A liberação sustentada pode ser utilizada para manter o efeito do fármaco no tecido alvo, solubilizar ativos, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (Marcato e Durán, 2008, Youan et al, 2003, Miyazaki et al, 2003).

Dentre os vetores utilizados, os lipossomas vêm sendo estudados há mais tempo. No entanto, apresentam problemas de instabilidade frente ao armazenamento e também perante os fluídos gastrointestinais. As micro e nanopartículas são capazes de superar os lipossomas neste aspecto, uma vez que são estruturas poliméricas mais estáveis, principalmente quando expostos aos fluidos biológicos. O termo nanopartícula é usado de acordo com o tamanho da partícula, que deve ser menor que 1000 nm, enquanto que as partículas maiores são denominadas micropartículas (Marcato e Durán, 2008). O agente terapêutico pode estar encapsulado, adsorvido ou ligado quimicamente à superfície das nanopartículas.

O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas são formadas por

uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Marcato e Durán, 2008, Schaffazick, 2003).

A utilização de um sistema de liberação de fármacos em nanopartículas poliméricas vem atraindo a atenção dos pesquisadores, por proporcionar uma alternativa atrativa para uma liberação por período prolongado. O encapsulamento de fármacos nestes sistemas oferece muitas vantagens como, por exemplo: (1) a liberação de forma contínua e sustentada; (2) a proteção do fármaco pelas partículas; (3) a liberação em um sítio específico, (4) a alta capacidade de atravessar várias barreiras fisiológicas, (5) a redução do número de doses e (6) a diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos (Chung et al, 2010, Jiao et al, 2002).

Vários métodos são empregados para a preparação de micro e nanopartículas poliméricas, que estão diretamente relacionados com a natureza hidrofílica do ativo utilizado. Além disso, o processo de preparação das nanopartículas deve ser, preferencialmente, simples, contínuo e eficiente; viável para larga escala e aceito por autoridades regulatórias. Os processos de preparação de nanopartículas poliméricas podem ser classificados em duas principais categorias: a que requer uma reação de polimerização ou aquela em que se utiliza diretamente uma macromolécula ou um polímero pré-formado. Os métodos descritos na literatura são emulsificação e evaporação de solvente, emulsificação/difusão de solvente, nanoprecipitação, “salting-out” e polimerização interfacial *in situ* (Reis et al, 2006, Kharb et al, 2006).

No sistema de liberação sustentada, o principio ativo é encapsulado em uma matriz que deve apresentar as seguintes características: permitir a modelagem para a forma desejada e liberação da substância ativa por

mecanismos adequados, ter estabilidade adequada, e possuir baixa toxicidade incluindo qualquer produto de degradação (Panyam et al, 2003; Miyazaki et al, 2003). Através deste sistema é possível manter a concentração do fármaco no plasma na faixa terapêutica por um tempo prolongado, utilizando-se um menor número de doses. Isto é uma vantagem em relação às formas convencionais de administração (spray, injeção, pílulas) nas quais, a concentração do fármaco na corrente sanguínea aumenta, atinge um pico máximo e então declina. Uma vez que cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas, fato que pode ser problemático se a dose efetiva do fármaco estiver próxima da dose tóxica (Qurrat-ul-Ain et al, 2003; Picos et al, 2000). Além disso, há diminuição dos efeitos colaterais, um aumento da biodisponibilidade e uma diminuição do número de doses necessárias do agente terapêutico (Soppimath et al, 2001; Panyan et al, 2003).

Os materiais utilizados como suporte para a produção de micro ou nanopartículas podem ser compostos não-poliméricos como lipídeos e cera de carnaúba, poliméricos sintéticos como copolímeros de poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poliacrilatos (PA) e policaprolactonas (PCL), ou poliméricos naturais como polihidroxicanoatos (PHA's), gelatina e quitosana (Panyam e Labhasetwar, 2003; Qurrat-ul-Ain et al, 2003).

1.4. Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster semi-cristalino, biodegradável e biocompatível. Ao contrário dos polímeros comumente utilizados, tais como o PLGA e polilácticos (PLA), o PCL não gera resíduos ácidos durante a sua degradação, não alterando o pH do meio ambiente no qual se encontra. Isto, junto com suas propriedades mecânicas e custo relativamente baixo, tornam o PCL um polímero bastante atraente para a área biomédica (Luong-Van et al, 2006). De acordo com Merkli et al (1998), a vantagem de nanopartículas de PCL no encapsulamento de fármacos, como no caso de ativos para uso ocular, é a capacidade de atingir uma boa resposta terapêutica com pequena dose do fármaco, suficiente para evitar efeitos colaterais.

1.5. Quitosana

A quitosana (figura 2) é um biopolímero obtido da desacetilização da quitina, que é o maior constituinte de exoesqueletos de crustáceos e outros animais marinhos. Atualmente, a quitosana vem sendo utilizada no tratamento de águas, produção de cosméticos, fármacos e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais (Santos et al, 2003).

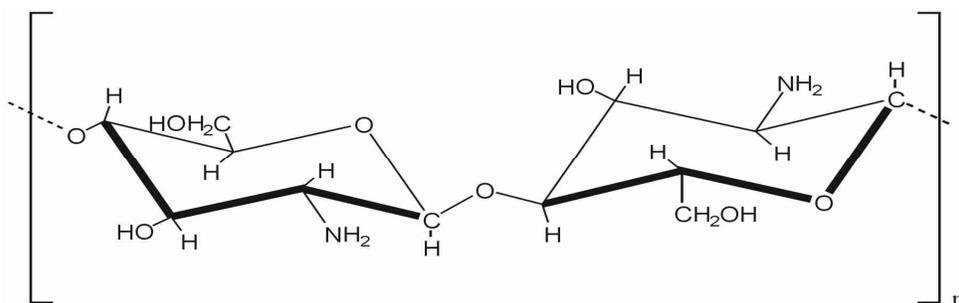


Figura 2: Estrutura da quitosana.

A quitosana tem muitas propriedades que a tornam particularmente adequada para o desenvolvimento de nanopartículas, incluindo a sua capacidade de controlar a liberação de agentes ativos, sua solubilidade em soluções aquosas ácidas, sua disponibilidade para reticulação através de seus grupos amino livres, e sua natureza catiônica, permitindo que a reticulação iônica ocorra com ânions multivalentes (Zhang et al, 2009).

Na área farmacêutica, a quitosana tem sido largamente utilizada em sistemas de transporte de fármacos (Lira et al, 2007). Além de ser um polímero biocompatível, biodegradável e atóxico, a quitosana possui propriedades biológicas interessantes como atividade antimicrobiana, potente ação analgésica tópica e aceleração do processo de cicatrização (Silva et al, 2006). Outra propriedade muito importante para a área farmacêutica e cosmética da quitosana é a bioadesividade. Devido às cargas positivas em pH fisiológico (grupos amino protonados), a quitosana tem a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente como pele e mucosas, aumentando a retenção do princípio ativo no local de aplicação (Bhattarai et al, 2006, Berger et al, 2004).

A quitosana também foi considerada eficaz, por aumentar a absorção de nanopartículas em células e tecidos, devido a sua natureza catiônica (Chung et al, 2010).

1.6. Encapsulamento da Heparina

A preparação de heparina encapsulada em nanopartículas através do método de dupla emulsão água/óleo/água (a/o/a), utilizando polímeros biodegradáveis como PCL e PLGA sozinhos ou em combinação com polímeros de carga positiva não-biodegradáveis (Eudragit RS e RL) foi empregada com sucesso. Estes estudos demonstraram resultados reprodutíveis em relação ao diâmetro, eficiência de encapsulação e atividade anti-Xa *in vitro* e em modelo animal normal (Hoffart et al, 2002; Hoffart et al, 2005; Jiao et al, 2002).

Esses estudos demonstraram que é possível a produção de nanopartículas com HBPM, com o método de dupla emulsão a/o/a com solvente orgânico, com efeito biológico *in vitro* e *in vivo* após o encapsulamento.

Um estudo recente demonstrou que a HBPM e papaína encapsulados em nanoesferas podem ser absorvidos por via oral, mesmo em baixas dosagens, o que sinaliza para possibilidade de aplicação na prática clínica em humanos. (Lanke et al, 2009). Contudo, esses estudos não avaliaram a atividade anticoagulante e antitrombótica das nanopartículas de heparina absorvidas.

Em um estudo prévio, realizado nesta universidade, através da cooperação entre o Prof. Dr. Nelson Duran do Laboratório de Pesquisa do Instituto de Química da UNICAMP, e a Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi, do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas, foram produzidas

nanopartículas de PCL com enoxaparina, uma HBPM. Esse projeto teve sucesso na padronização do método de encapsulamento, e as nanopartículas obtidas demonstraram atividade anticoagulante *in vitro* e *in vivo*, e efeito anti-trombótico *in vivo* (Pazzini, 2010).

Essas nanopartículas foram preparadas com o polímero PCL, pelo método de dupla emulsão (a/o/a) e evaporação de solvente, utilizando o poli (álcool vinílico) (PVA) como estabilizante. A % de eficiência de encapsulamento, o diâmetro e o índice de polidispersidade das nanopartículas produzidas foram adequadas. Observou-se um efeito antitrombótico quando as nanopartículas foram administradas por via subcutânea, em modelo de TVP em ratos, demonstrando a eficiência desta formulação por esta via de administração. Contudo, quando essas nanopartículas foram administradas por gavagem em ratos, não se verificou nenhum efeito anticoagulante, sugerindo que as mesmas não foram absorvidas, ou que após a absorção perderam esse efeito.

Portanto, a continuidade dessa pesquisa tornou-se interessante para investigação do emprego de algum agente na produção das nanopartículas, que propiciasse a absorção dessas nanopartículas por via oral.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Preparar e caracterizar nanopartículas de PCL-Quitossana com enoxaparina para a administração oral em sistemas de liberação sustentada.
- Caracterizar as nanopartículas quanto ao diâmetro, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulamento.
- Avaliar *in vivo* a ação anticoagulante das nanopartículas em plasma de ratos normais, após a administração por via subcutânea ou oral.
- Avaliar *in vivo* a ação antitrombótica das nanopartículas usando modelo de TVP induzida por estase e hipercoagulabilidade em ratos, após a administração por via subcutânea ou oral.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

A TVP é uma doença com elevada prevalência e de importante impacto na Saúde Pública, inclusive no Brasil. A heparina é o fármaco mais utilizado para o tratamento da TVP na fase aguda. Devido à baixa biodisponibilidade da heparina por via oral, em decorrência de seu tamanho e carga negativa, as vias de administração empregadas na prática clínica são a endovenosa (somente a heparina não fracionada) ou subcutânea, o que é desconfortável para o paciente. Em decorrência da curta vida média da heparina, torna-se necessária mais de uma aplicação diária por via subcutânea ou o uso de bomba de infusão para administração endovenosa. Além disso, o tratamento com HNF requer o monitoramento laboratorial.

Os resultados preliminares obtidos no nosso laboratório demonstraram que a enoxaparina encapsulada em nanopartículas apresentou um efeito anticoagulante *in vitro* e *in vivo*, e teve um efeito antitrombótico eficaz no modelo de TVP em ratos, sinalizando para a possibilidade do uso dessas formulações na prática clínica. Além disso, a produção de nanopartículas de enoxaparina para administração por via oral pode ser uma alternativa na resolução de algumas limitações da heparina empregada por via endovenosa ou subcutânea.

Portanto, a proposta deste estudo é muito interessante, por possibilitar o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para a TVP, por via oral e com menores riscos de complicações.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparação das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina

Método de dupla emulsão (água/óleo/água) e evaporação do solvente

A produção de nanopartículas com enoxaparina foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Instituto de Química da UNICAMP, com a colaboração da Profa. Dra. Priscyla D. Marcato e do Prof. Dr. Nelson Duran.

As nanopartículas foram preparadas com polímero biodegradável PCL poli(ϵ -caprolactona) (Aldrich), e recobertas com polímero natural quitosana (105 g/mol/ ~81% acetilação, Polymar). A preparação das nanopartículas com enoxaparina foi realizada pela técnica modificada de dupla emulsão como descrito por Meng et al. (2003). Uma solução aquosa composta por 200 μ L (2000 UI) de enoxaparina (Clexane 60 mg/ 0,6 mL, 6000UI), 1 mL de água deionizada e 0,5% de PVA (polivinil-álcool) (5 mg) foi primeiramente emulsificada com uma fase orgânica contendo 10 mL de acetato de etila e 60 mg de PCL sob agitação mecânica durante 1 minuto a 6000 rpm, formando uma emulsão água/óleo. Posteriormente, esta emulsão foi transferida em um recipiente contendo 50,1 mL de água deionizada, 1% de PVA (0,6 g), 0,9% de NaCl (0,54 g) e 9,9 mL de solução de quitosana (2 mg/mL) e homogeneizada sob agitação mecânica de 10000 rpm por 1,5 minutos, formando a dupla emulsão (água/óleo/água). Após este período a dupla emulsão foi transferida para um balão volumétrico de fundo

redondo, e o solvente evaporado à temperatura de 28°C em rota evaporador até um volume final de 10 mL.

4.2. Caracterização das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina

4.2.1. Eficiência de encapsulamento

A enoxaparina encapsulada em nanopartículas foi quantificada pelo método colorimétrico Azure II modificado, como descrito por Lam et al (1976).

Para a realização da curva de calibração foi preparada uma solução estoque de enoxaparina a concentração de 20 µL/mL. A partir desta solução diluições sucessivas foram realizadas para obtenção das concentrações: 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, e 25 µg/mL.

Na preparação da solução de Azure II (0,05 mg/mL), foi feito primeiro uma solução de Azure II de concentração de 1 mg/mL, pesando-se 5 mg de Azure II e adicionando-se 5 mL de água deionizada. Após a transferência de 2,5 mL desta solução para um balão volumétrico, completou-se até 50 mL com água deionizada.

Para a análise, 900 µL da solução de Azure II (0,05 mg/mL) foi misturada com 100 µL da solução de enoxaparina. Após 1 minuto, a absorbância desta mistura foi lida em espectrofotômetro UV-vis no comprimento de onda de 500 nm, em triplicata.

Para a quantificação da eficiência de encapsulamento, primeiramente uma alíquota de 500 µL da dispersão de nanopartículas foi misturada com 500 µL

de água deionizada e centrifugada em microcentrífuga (Eppendorf® Centrifuge 5424) a 20000 x g por 12 minutos. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foi centrifugado em filtro Microcon Ultracel YM-100 (Millipore, corte de massa molar de 1000 g/mol) por 10 minutos a 4000 x g. Alíquotas de 100 µL do material centrifugado foram misturadas com 900 µL da solução de Azure II e deixadas em repouso por 1 minuto. Após esse período, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 500 nm em um espectrofotômetro Hitachi (U-2000). A eficiência de encapsulamento (EE) da enoxaparina foi calculada pela seguinte equação (Jiao et al, 2002):

$$\% \text{ não encapsulada} = \left(\frac{[\text{enoxaparina}] \text{ na solução filtrada}}{[\text{enoxaparina}] \text{ inicial}} \right) \times 100$$
$$\text{EE (\%)} = 100 - \% \text{ não encapsulada}$$

4.2.2. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas

O diâmetro (Z-average), o índice de polidispersidade e o potencial zeta das nanopartículas foram analisados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz no equipamento Zeta Sizer da Malvern®. Para isto, primeiramente 100 µL da dispersão de nanopartículas foi diluída com 300 µL de água deionizada. Em seguida 30 µL desta diluição foi novamente diluída em 970 µL com água deionizada em uma cubeta de acrílico e, em seguida analisada no Zeta Sizer da Malvern®.

A estabilidade das nanopartículas de PCL-Quitosana com ou sem enoxaparina foi verificada em uma amostra previamente preparada e analisada durante 50 dias. A amostra ficou armazenada em geladeira a 4 °C para análise posterior. Para realizar a análise a amostra encontrava-se à temperatura ambiente (25 °C).

4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As partículas foram caracterizadas quanto à morfologia por MEV. Uma pequena quantidade de nanopartículas foi adicionada a uma fita de carbono fixada em um porta-amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pd pelo processo de Sputtering (evaporação do metal e deposição de uma fina camada - 10 nm - sobre a amostra) utilizando-se um metalizador BAL-TEC. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6360LV, utilizando-se uma tensão de aceleração de 20 kV e detectores de elétrons secundários (Rizkalla et al, 2006).

4.3. Análises de citotoxicidade

Todas as análises de citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Ambientais das Faculdades Integradas Metropolitanas de Campinas (METROCAMP), sob orientação da Prof^ª Dr^ª Patrícia da Silva Melo, com o auxílio de Larissa Barbosa de Paula.

Cultura de células V79

As células utilizadas nos experimentos foram fibroblastos da linhagem estabelecida em cultura V79, clone M-8, oriunda de pulmão de Hamster Chinês (*Cricetulus griseus*). Os fibroblastos foram mantidos em cultura contínua, através de repiques periódicos até atingirem a densidade de confluência. O cultivo foi realizado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. A incubação foi realizada em estufa a 37°C, sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂. Nos diferentes ensaios de citotoxicidade que avaliaram a viabilidade celular, o plaqueamento foi realizado utilizando-se placas de 96 cavidades, plaqueando-se 3 x 10⁴ células/mL em cada cavidade (100 µL/cavidade) – seguido de incubação a 37 °C, por 48 horas. Após este período, o meio foi retirado e as culturas foram expostas durante 24 horas ao meio DMEM suplementado contendo diferentes concentrações das nanopartículas. Após 24 horas de tratamento, as culturas foram processadas de acordo com os protocolos específicos dos testes para determinação da redução do MTT e incorporação do vermelho neutro.

4.3.1. Ensaio de citotoxicidade

Redução do MTT

O teste de redução do MTT foi realizado de acordo com o método de Denizot & Lang (1986). Após o período de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS-Ca²⁺. Em seguida, foi adicionado 100 µL de meio DMEM com MTT na concentração de 1 mg/mL em cada cavidade.

As placas foram incubadas a 37°C, durante 4 horas. Em seguida, foi adicionado etanol absoluto para solubilizar o formazan. As placas foram então agitadas durante vinte minutos e, logo após este período, foi verificada a absorvância a 570 nm, em um leitor de placas de ELISA.

4.3.2. Incorporação do Vermelho Neutro

O teste de incorporação do corante vermelho neutro (VN) foi realizado de acordo com o método de Borenfreund & Puerner (1985). Após o período de tratamento, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM, sem suplementação, contendo 50 µg/mL de vermelho neutro; as células foram então incubadas novamente por 4 horas, a 37 °C. Após o período de incubação, o meio contendo VN foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS-Ca²⁺ para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomos. Em seguida, foi adicionada uma solução aquosa contendo 1% de ácido acético glacial e 50% de etanol, para fixação das células e extração do VN incorporado pelos lisossomos. As placas foram, então, agitadas por vinte minutos e, em seguida, foi verificada a absorvância a 540 nm, em um leitor de placas de ELISA.

4.4. Determinação da atividade anticoagulante (atividade anti-Xa) das nanopartículas com enoxaparina *in vivo*

Ratos machos Wistar (5-7 semanas de vida) provenientes do CEMIB UNICAMP foram divididos em 4 grupos de 4 animais, de acordo com o fármaco ou salina aplicados. Os grupos analisados foram:

- **Grupo 1:** salina
- **Grupo 2:** nanopartículas sem enoxaparina;
- **Grupo 3:** enoxaparina livre 5 mg/kg;
- **Grupo 4:** nanopartículas com enoxaparina 50 mg/kg;

O fármaco livre ou encapsulado ou a salina foram administrados por via subcutânea na região dorsal, com agulha 26G, ou por via oral, através de gavagem, e sempre com o mesmo volume. O sangue foi coletado após 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 e 14 horas por punção caudal, para avaliação da atividade anti-Xa. Cada grupo de animais foi analisado em até 3 tempos (3 coletas), e depois foram sacrificados.

A enoxaparina foi analisada como um complexo com antitrombina presente na amostra. A concentração deste complexo é dependente da disponibilidade da antitrombina endógena do animal.

O fator Xa é neutralizado pelo complexo enoxaparina-antitrombina. O fator Xa residual é quantificado com um substrato sintético cromogênico. A paranitroanilina liberada é monitorada cineticamente a 405 nm e é inversamente proporcional ao nível de enoxaparina na amostra. Para reduzir a influência dos antagonistas da enoxaparina, tais como o fator 4 das plaquetas (PF4), incluiu-se o sulfato de dextran na mistura da reação.

Reação 1 : Heparina_{amostra} + AT_{amostra} \longrightarrow [Heparina + AT]_{complexo}

Reação 2: [Heparina + AT] + FXa \longrightarrow Fxa_{residual}
reag 1

Reação 3: Substrato cromogênico \longrightarrow Paranitroanilina + FXa_{residual}
reag 2

- **Aparelho: IL (ACL TOP-500)**

- **Reagentes:**

- Fator X (Fator Xa bovino, TRIS, EDTA, Sulfato de dextran, NaCl e albumina bovina)
- Substrato Cromogênico (S-2732)
- Controle normal e patológico.

4.5. Indução de TVP por estase e hipercoagulabilidade em modelo animal

Durante o experimento foi utilizado um microscópio óptico, fundamental para esta técnica, porque é necessário isolar a veia cava inferior, sem que a mesma seja perfurada.

Ratos machos Wistar de 5 a 7 semanas de vida provenientes do CEMIB UNICAMP foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilazina. Para administração do anestésico foi preparada uma solução de 75 mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg de Xilazina. O abdômen dos animais foi cirurgicamente

aberto e a trombose induzida pela associação de 2 métodos: método de ligadura modificado de Reyers et al (1980) e Carvalho et al (1992), e método de hipercoagulabilidade modificado de Herbert et al (1992). Após incisão abdominal mediana, a veia cava inferior foi isolada na porção superior e inferior, com a colocação de fios de seda 4-0, aproximadamente 1,5 cm abaixo da confluência da veia renal esquerda. Inicialmente foi feita a ligadura das veias colaterais com o mesmo fio, seguido da ligadura da veia cava inferior nos pontos de isolamento da mesma. Logo após a ligadura da veia cava inferior injetou-se uma solução de tromboplastina (Thromborel® S; Siemens; ≤ 60 mg/mL) com agulha 30 G, na concentração de 5 mg/Kg de peso corpóreo do animal, no segmento ligado.

Vinte minutos após a indução da trombose, os animais foram analisados para verificação da presença do trombo. O trombo foi retirado e pesado imediatamente, e após secagem em estufa a 37 °C por 24hs (Carelli et al, 2005).

4.6. Avaliação *in vivo* do efeito antitrombótico de enoxaparina livre e encapsulada, em modelo de TVP em ratos

Os ratos Wistar, provenientes do CEMIB UNICAMP, entre 5-7 semanas de vida, foram divididos em 4 grupos de 6 animais de acordo com o fármaco ou salina aplicados. Os grupos analisados foram:

- **Grupo 1:** salina
- **Grupo 2:** nanopartículas sem enoxaparina;
- **Grupo 3:** enoxaparina livre 5 mg/kg;
- **Grupo 4:** Nanopartículas com enoxaparina 50 mg/kg;

O fármaco livre ou encapsulado ou salina foram administrados por via subcutânea na região dorsal, com agulha 26G, ou por via oral, através de gavage. O mesmo volume foi utilizado em todos os procedimentos.

Conforme já padronizado anteriormente no laboratório, 1 hora após a administração subcutânea foi feita a indução da TVP, conforme descrito na padronização do modelo.

Para a avaliação do efeito antitrombótico após a administração do fármaco via oral, foram realizados experimentos com um número de 6 animais, em tempos de 1 a 10 horas, a cada hora. Assim, a indução da trombose foi feita em todos esses tempos conforme descrito no modelo.

4.7. Análise Estatística

Os resultados de eficiência de encapsulamento, diâmetro, índice de polidispersidade e potencial zeta foram analisados e expressos pela média \pm desvio-padrão.

A avaliação da diferença das medianas da atividade anti-Xa e análise da comparação do peso dos trombos entre dois grupos independentes foram realizadas através do teste de Mann Whitney.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional R Development Core Team (2009).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Preparação das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina

O método de dupla emulsão (água/óleo/água) e evaporação do solvente foi escolhido em função da alta solubilidade da enoxaparina em água e pelo sucesso na sua produção pelo nosso grupo de pesquisa. A adição de quitosana foi realizada obtendo-se partículas com carga superficial positiva e com diâmetro médio de $512,8 \pm 13,8$ nm. A adição de quitosana não comprometeu a obtenção de nanopartículas apesar de todo o processo ter sido realizado em apenas duas etapas, mostrando-se um método interessante para produção de nanopartículas com propriedades de mucoadesão.

5.2. Caracterização das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina

5.2.1. Eficiência de Encapsulamento

Inicialmente foi realizada a análise da interferência dos reagentes no método de quantificação da enoxaparina, através da medida da absorbância de soluções de PVA e NaCl no comprimento de onda de 500 nm. Os resultados mostraram que não houve absorbância destes dois componentes nesse comprimento de onda, e o mesmo foi escolhido para determinação da eficiência de encapsulação da enoxaparina.

A curva de calibração da enoxaparina foi realizada pelo método colorimétrico Azure II, obtendo-se a curva de calibração demonstrada na figura 1, cuja equação da reta foi: $Y = 0,00189 + 0,02655X$ e o coeficiente de correlação foi de 0,999.

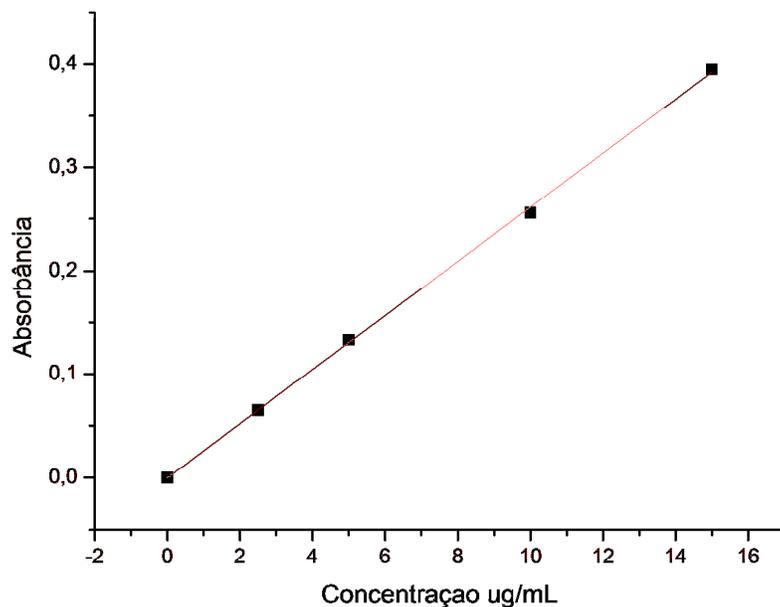


Figura 3: Curva de calibração da enoxaparina obtida pelo método colorimétrico Azure II.

A partir da curva de calibração mostrada na figura 3 foi calculada a eficiência de encapsulamento da enoxaparina nas preparações de nanopartículas. A tabela 1 mostra os resultados da quantificação de enoxaparina nas diferentes preparações de nanopartículas, demonstrando excelente eficiência de encapsulamento.

Tabela 1: Eficiência de encapsulamento (EE) da enoxaparina em nanopartículas de PCL-Quitossana, em 5 amostras.

	Amostras						
	1	2	3	4	5	Média	Desvio Padrão
EE (%)	98,90	99,20	99,00	99,20	98,90	99,04	0,001

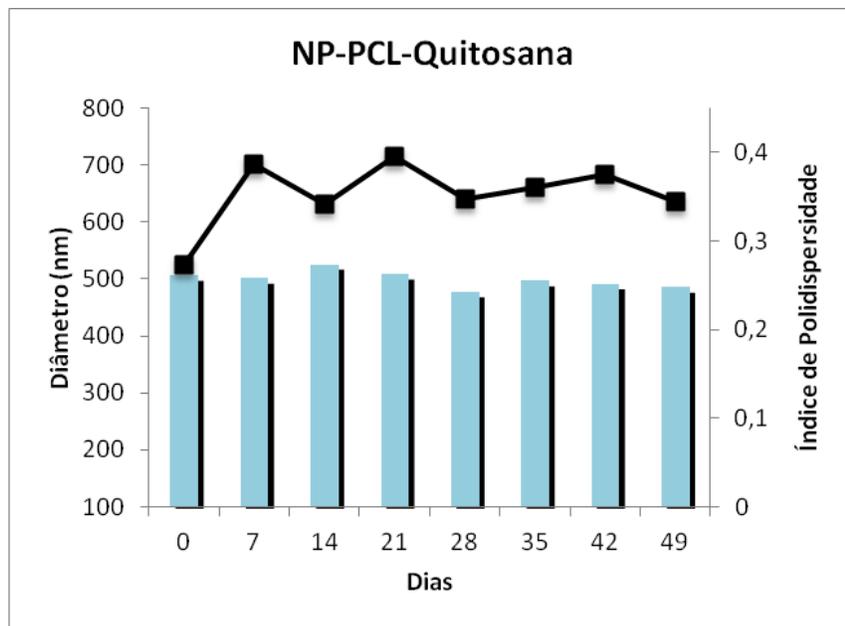
5.3. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas de PCL-Quitossana com enoxaparina estão representados na Tabela 2. O diâmetro médio das nanopartículas foi de $512,8 \pm 13,8$ nm com índice de polidispersidade de $0,409 \pm 0,04$. Esse índice de polidispersidade apesar de ser relativamente alto está dentro do esperado para partículas recobertas com quitossana (Sun et al, 2010). O potencial zeta (carga superficial) das partículas foi de $+30,9 \pm 1,3$ mV. Esta carga positiva deve-se a presença da quitossana, que está presente na superfície da partícula.

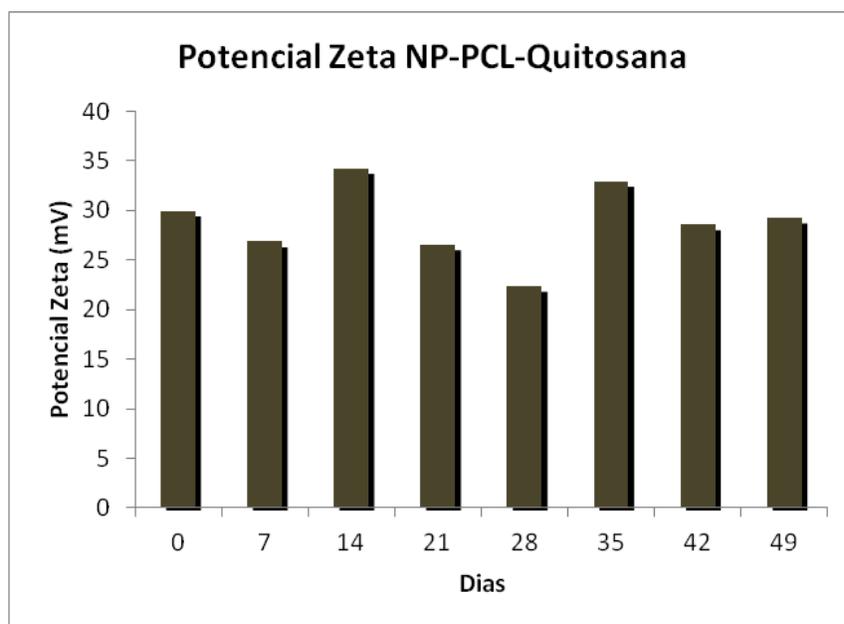
Tabela 2: Tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina, em 3 amostras.

Dispersão de partículas	Diâmetro (nm)	Índice de Polidispersidade	Potencial Zeta (mV)
1	512,5	0,458	+30,7
2	526,8	0,401	+32,3
3	499,2	0,369	+29,8
Média	512,8	0,409	+30,9
Desvio-padrão	13,8	0,04	1,3

As figuras 4 (a) e (b) mostram a estabilidade das nanopartículas de PCL-Quitosana sem enoxaparina quanto ao diâmetro, índice de polidispersidade e potencial zeta durante 50 dias. A figura (a) mostra que o diâmetro e o índice de polidispersidade das nanopartículas se mantiveram estáveis (ao redor de 500 nm e Pdl entre 0,0 e 0,4) durante 50 dias, indicando a alta estabilidade da formulação. O mesmo perfil foi observado para o potencial zeta que se manteve ao redor de + 28 mV por 50 dias (figura b). Esta alta estabilidade pode ser devido tanto a presença do estabilizante PVA quanto a presença da quitosana, que além de conferir estabilidade estérica às partículas, também confere estabilidade elétrica (Sun et al, 2012).



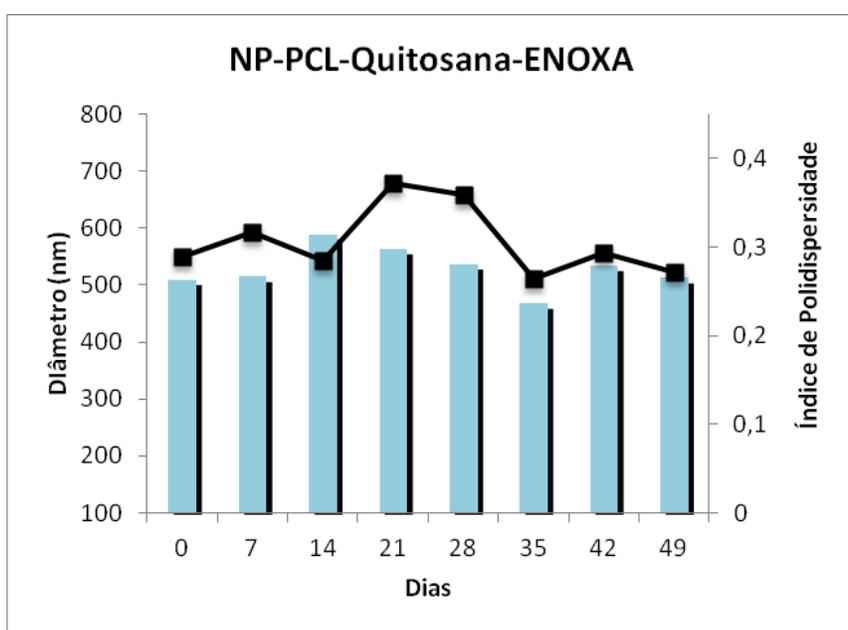
(a)



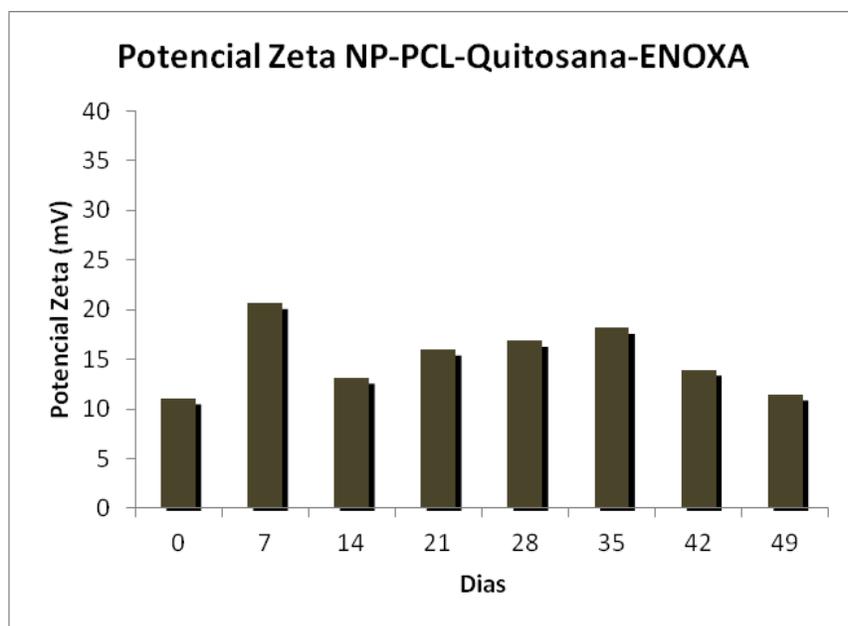
(b)

Figura 4: Análise da estabilidade de uma amostra de nanopartículas de PCL-Quitossana sem enoxaparina quanto ao diâmetro e índice de polidispersidade (a) e potencial zeta (b) durante 50 dias.

As figuras 5 (a) e (b) mostram a estabilidade das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina quanto ao diâmetro, índice de polidispersidade e potencial zeta durante 50 dias. Nesta figura pode-se observar que a adição de enoxaparina não alterou a estabilidade das partículas que manteve o diâmetro ao redor de 500 nm com índice de polidispersidade entre 0,3 e 0,4 durante 50 dias. O potencial zeta também foi estável, porém o valor ficou ao redor de + 17 mV.



(a)



(b)

Figura 5: Análise da estabilidade de uma amostra de nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina quanto ao diâmetro e índice de polidispersidade (a), e potencial zeta (b) durante 50 dias.

5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas poliméricas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), logo após o preparo. Nesta análise foram observadas partículas esféricas e homogêneas, como mostra a figura 4.

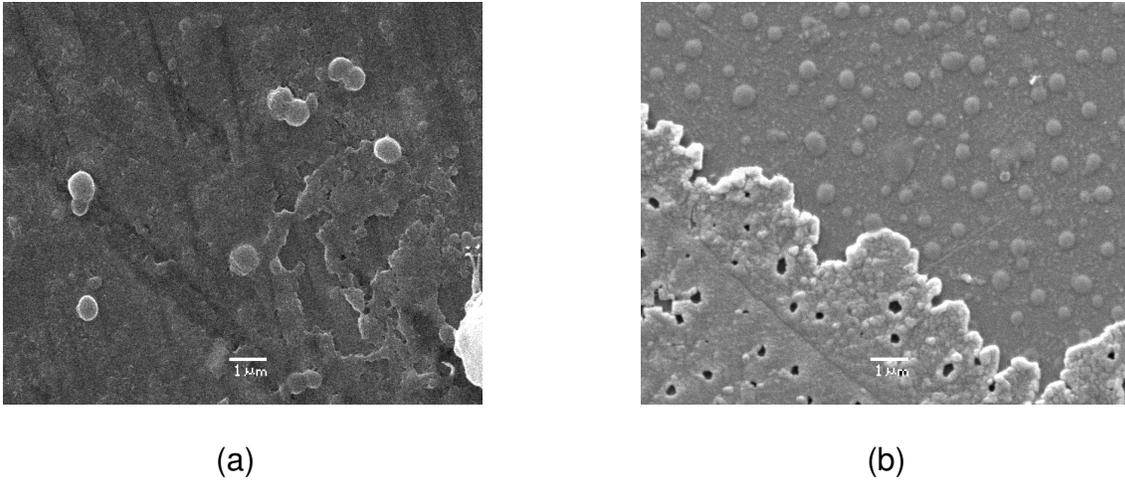


Figura 6: Micrografias de nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina (a) x 10000 e nanopartículas de PCL-Quitosana sem enoxaparina (b) x 10000.

5.5 Análises de citotoxicidade

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade com enoxaparina livre estão apresentados na figura 7.

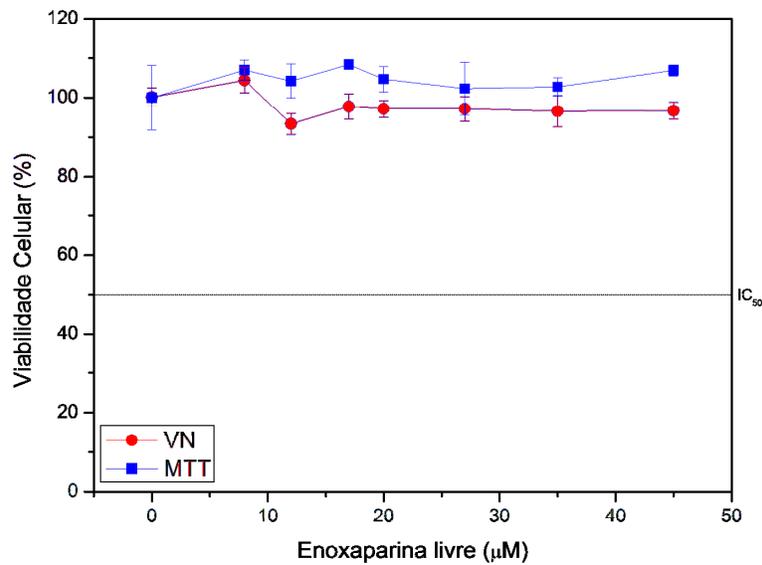


Figura 7: Viabilidade de células V79 após tratamento com enoxaparina livre por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro, redução do MTT e

conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade com nanopartículas de PCL-Quitosana, contendo ou não enoxaparina, estão apresentados nas figuras 8 e 9, respectivamente.

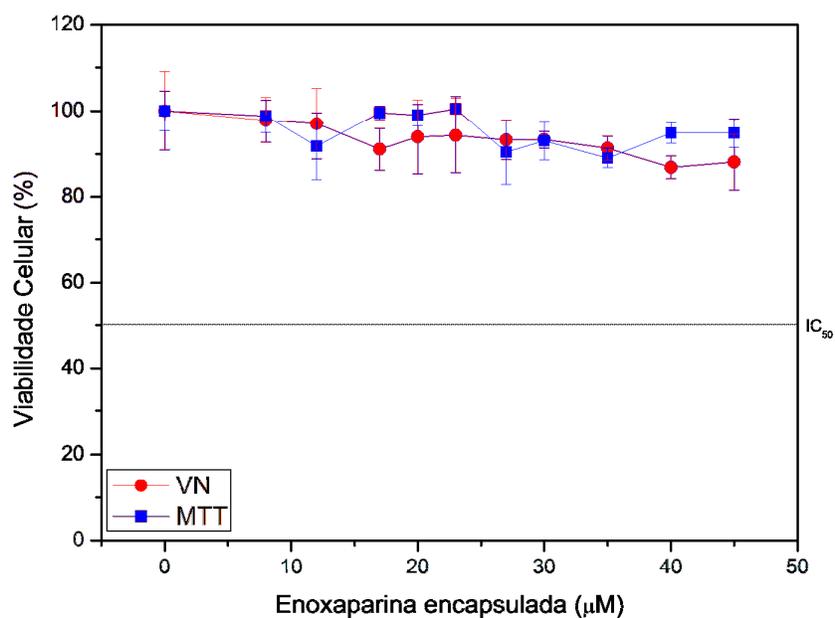


Figura 8: Viabilidade de células V79 após tratamento com enoxaparina encapsulada em nanopartículas de PCL-Quitosana por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro, redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

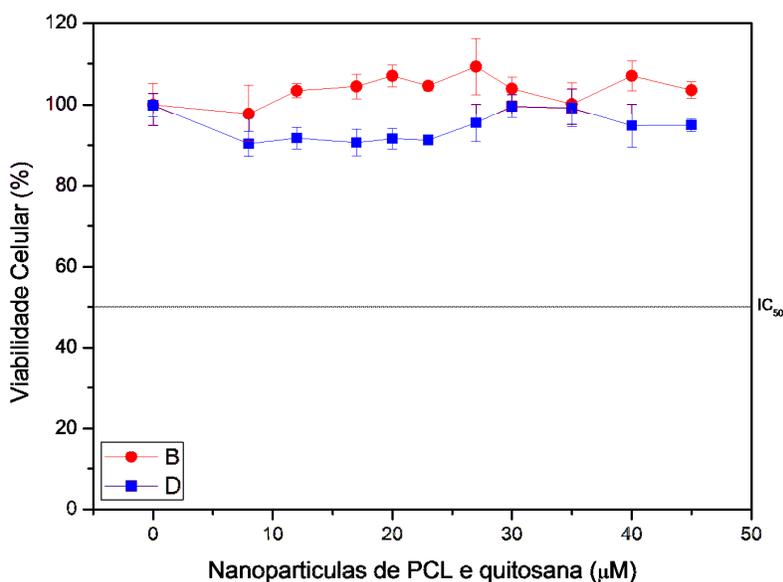


Figura 9: Viabilidade de células V79 após tratamento com nanopartículas de PCL-Quitossana por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro, redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Na máxima concentração avaliada (45 μ M), para a enoxaparina encapsulada foi observada uma redução de 11,9% na viabilidade celular em relação à capacidade de incorporação do corante vermelho neutro (figura 8), enquanto que a enoxaparina livre apenas uma redução de 3,5% na viabilidade celular foi observada (figura 7). Este resultado sugere que a enoxaparina encapsulada foi mais citotóxica que a livre e que esta maior citotoxicidade pode ser atribuída às nanopartículas. Entretanto, as nanopartículas apresentaram um estímulo de 3,6% na viabilidade celular (figura 9), indicando que a interação da enoxaparina com as nanopartículas aumentou sutilmente a citotoxicidade desta substância. Em relação ao ensaio de redução do MTT, a enoxaparina encapsulada reduziu 5,12% na viabilidade celular (figura 8), enquanto a

enoxaparina livre apresentou um estímulo de 6,9% (figura 7). Apesar do aumento da citotoxicidade da enoxaparina quando esta foi encapsulada, em todos os ensaios, até a máxima concentração avaliada, nenhuma das formulações estudadas atingiram o IC₅₀ indicando uma baixa toxicidade das amostras.

5.6. Determinação da atividade anticoagulante (atividade anti-Xa) *in vivo*

Ratos machos Wistar (5-7 semanas de vida) provenientes do CEMIB UNICAMP foram divididos em 4 grupos de 4 animais, de acordo com o fármaco aplicado por via subcutânea ou oral. Os grupos analisados foram:

- **Grupo 1:** salina
- **Grupo 2:** nanopartículas sem enoxaparina;
- **Grupo 3:** enoxaparina livre 5 mg/kg;
- **Grupo 4:** Nanopartículas com enoxaparina 50 mg/kg;

A figura 10 demonstra a comparação da atividade anti-Xa entre os grupos de animais que receberam salina, enoxaparina livre (5 mg/Kg), nanopartículas sem e com enoxaparina nas doses de 50 mg/Kg por via subcutânea. Quando foi administrada a enoxaparina livre na dosagem de 5 mg/Kg, houve um pico de atividade anti-Xa plasmático em 1 hora, que desapareceu em 6 horas. Quando as nanopartículas de PCL-Quitossana com enoxaparina foram administradas, observou-se um pico de atividade anti-Xa plasmático em 3 horas, muito superior ao obtido com enoxaparina livre, e que se manteve constante por até 10 horas. No último horário de análise (14 horas), observou-se ainda atividade

anti-Xa de 0,6 UI/mL. Quando foi administrado nanopartículas de PCL-Quitosana sem enoxaparina não se observou atividade anti-Xa plasmática, assim como, quando foi administrada salina.

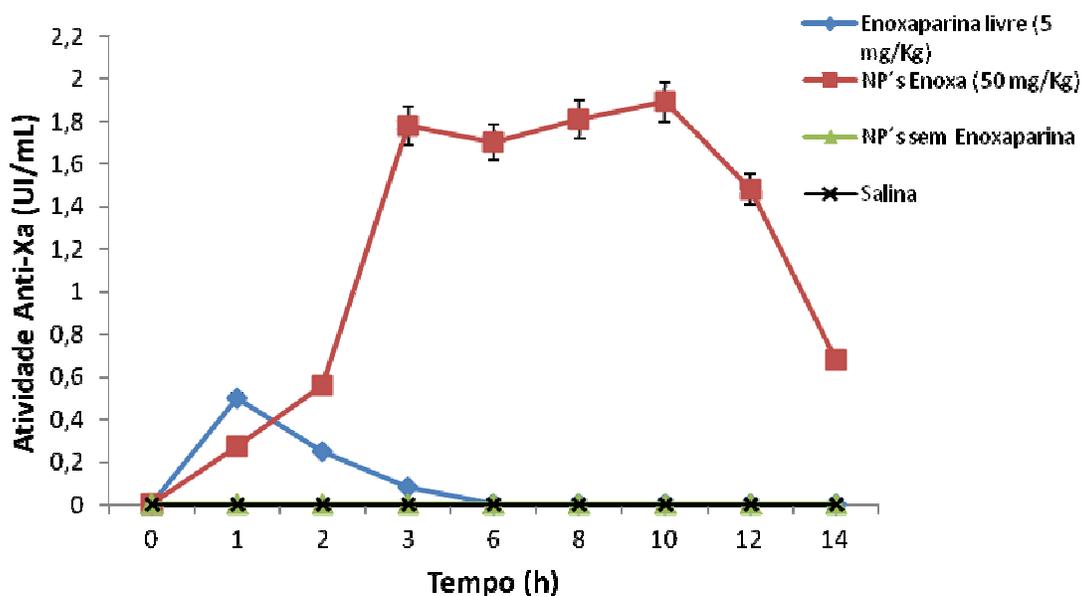


Figura 10: Atividade anti-Xa até 14 horas após administração subcutânea de enoxaparina livre 5 mg/Kg (♦), nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina 50 mg/Kg (■), nanopartículas de PCL-Quitosana sem enoxaparina (▲) e salina (x). Média obtida através do número de 4 ratos. $p= 0,0043$ comparação enoxaparina livre e enoxaparina encapsulada.

A figura 11 demonstra a comparação da atividade anti-Xa entre os grupos de animais que receberam salina, enoxaparina livre (5 mg/Kg), nanopartículas sem e com enoxaparina nas doses de 50 mg/Kg por via oral. Não foi observada atividade anti-Xa plasmática em nenhuma das soluções administradas.

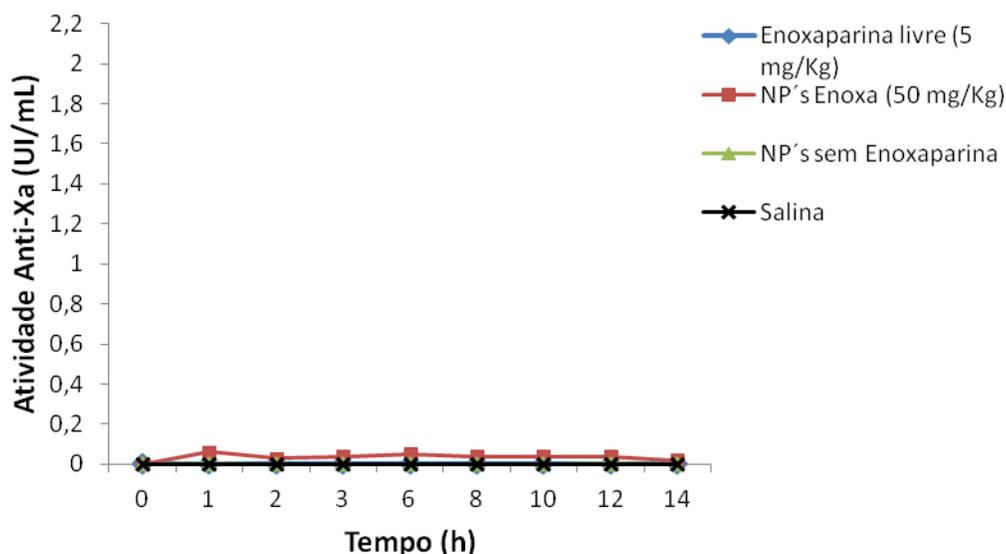


Figura 11: Atividade anti-Xa até 14 horas após administração oral de enoxaparina livre 5 mg/Kg (◆), nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina 50 mg/Kg (■), nanopartículas de PCL-Quitosana sem enoxaparina (▲) e salina (x). Média obtida através do número de 4 ratos. $p > 0,05$ em todas as comparações.

5.7. Indução de TVP por estase e hipercoagulabilidade em modelo animal

A padronização do modelo de TVP em ratos foi realizada no biotério do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas.

As figuras 12 a 16 mostram todas as etapas para a indução da trombose e retirada do trombo.

A figura 10 mostra o abdômen aberto e o isolamento de ~1,5 cm da veia cava inferior, abaixo da confluência da veia renal esquerda.

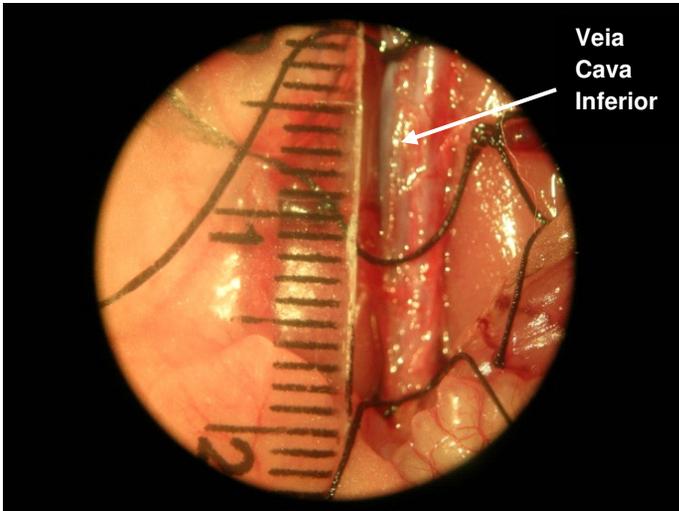


Figura 12: Isolamento de ~1,5 cm da veia cava inferior

A figura 13 mostra a ligadura das veias colaterais da veia cava. Esta ligadura teve o intuito de bloquear qualquer fluxo sanguíneo na região da ligadura da veia cava, que pudesse interferir com a formação do trombo. A figura 4 demonstra a ligadura da veia cava inferior utilizando fio de seda 4-0 e o local de administração da solução de trombolastina.

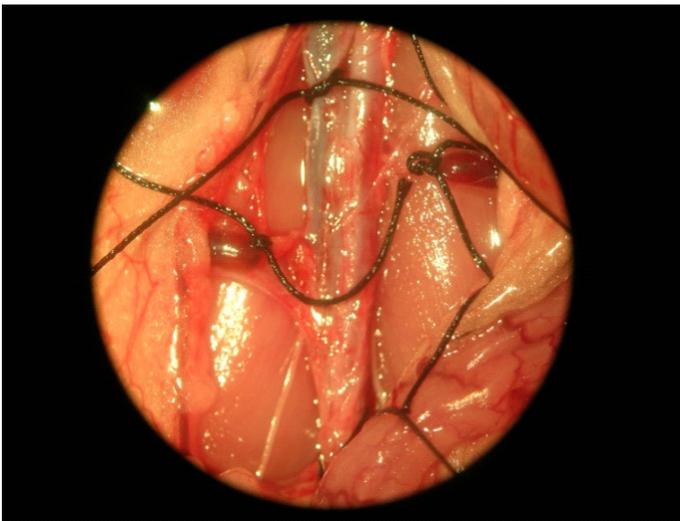


Figura 13: Ligadura das veias colaterais

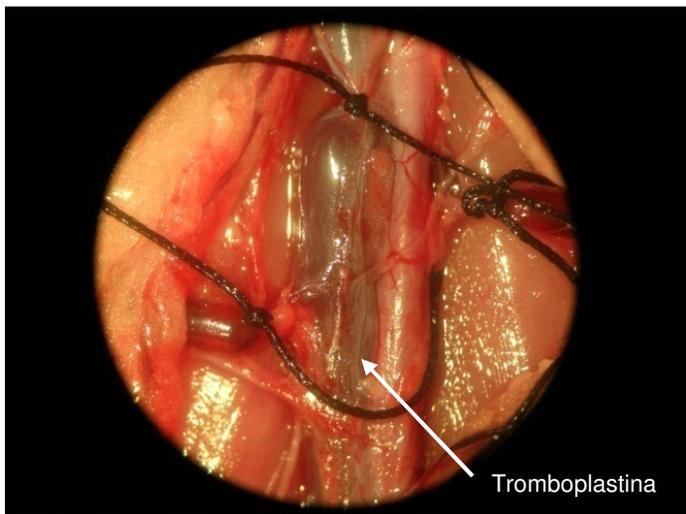


Figura 14: Ligadura da veia cava inferior utilizando fio seda 4-0 e local de administração da solução de trombolastina.

A figura 15 mostra o abdômen aberto observando-se o trombo formado após a abertura longitudinal da veia cava. Este método de retirada do trombo através do corte da parede da veia cava contribuiu para a preservação do material trombótico.



Figura 15: Após 20 minutos a parede da veia cava inferior foi cortada longitudinalmente para retirada do trombo.

A figura 16 mostra a retirada do trombo formado, para pesagem e secagem posterior.

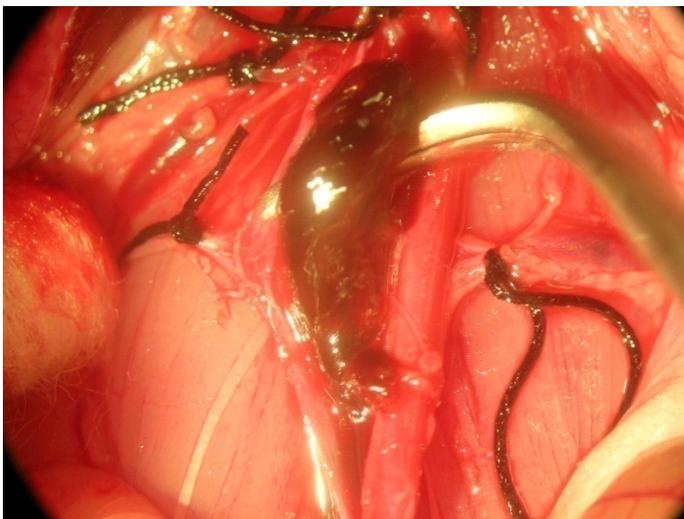


Figura 16: Retirada do trombo.

A tabela 3 mostra a média, desvio padrão e o peso individual em gramas dos trombos formados. A média dos pesos dos trombos foi de 0,0212 g. Não se observou correlação entre o peso dos ratos e o peso do trombo.

Tabela 3: Peso do trombo venoso em 8 ratos.

	Peso do Rato (g)	Idade (semanas)	Peso do trombo (g)
1	256	7	0,0227
2	222	6	0,0225
3	216	6	0,0282
4	249	7	0,0190
5	174	5	0,0183
6	180	6	0,0203
7	188	5	0,0187
8	172	5	0,0197
Média	207,1	6	0,0212
Desvio-padrão	33,5	1	0,0033

5.8. Avaliação *in vivo* do efeito antitrombótico de enoxaparina livre e encapsulada, em modelo de TVP em ratos

Para avaliar o efeito antitrombótico de enoxaparina livre utilizou-se o tempo de 1 hora após a administração do fármaco para se verificar a presença do trombo, de acordo com os resultados preliminares realizados e padronizados em nosso laboratório. Quanto à enoxaparina encapsulada, avaliou-se os trombos formados nos tempos de 1 a 10 horas, a cada hora. De acordo com resultados

encontrados, o tempo eleito para análise foi o de 6 horas, de acordo com a reprodutibilidade do método nesse tempo.

As figuras 17 (a) e (b) demonstram a análise do efeito antitrombótico, avaliada pelo peso do trombo de animais tratados com salina, enoxaparina livre e encapsulada em nanopartículas de PCL-Quitossana, administradas por via subcutânea. Observou-se uma diferença estatística significativa entre o grupo de animais tratados com salina ou enoxaparina livre ($p=0,0022$) (figura a).

A comparação do peso do trombo entre o grupo de animais tratados com nanopartículas de enoxaparina (50 mg/Kg) ou salina por via subcutânea mostrou diferença estatística significativa ($p= 0,0411$) (figura b).

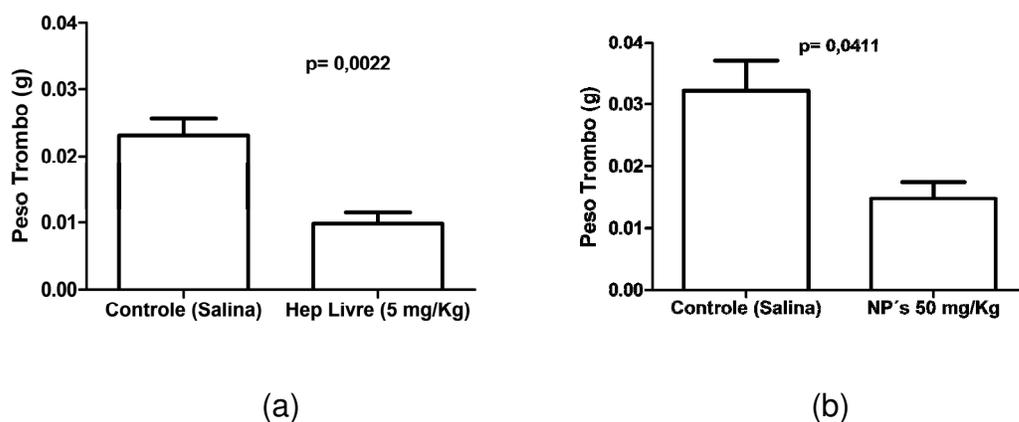


Figura 17: Efeito antitrombótico *in vivo* avaliado pelo peso do trombo. Comparação entre um grupo de animais administrados com salina ou enoxaparina livre (a), e salina ou nanopartículas de PCL-Quitossana com enoxaparina (b), todos por via subcutânea. Valores obtidos através do número de 6 ratos.

As figuras 18 (a) e (b) demonstram a análise do efeito antitrombótico, avaliado pelo peso do trombo de animais tratados com salina, nanopartículas de PCL-Quitossana sem enoxaparina e nanopartículas de PCL-Quitossana com enoxaparina, administradas por via oral. Os resultados mostraram que o peso dos

trombos formados foi muito semelhante, e que não houve nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos analisados.

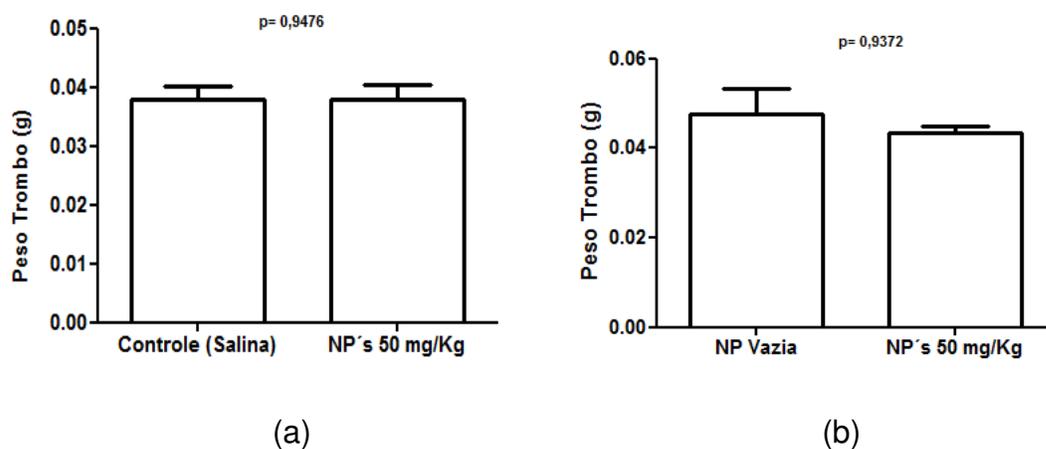


Figura 18: Efeito antitrombótico *in vivo* avaliado pelo peso do trombo. Comparação entre o grupo de animais administrados com salina ou com nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina (a); e entre o grupo de animais administrados com nanopartículas de PCL-Quitosana sem enoxaparina ou nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina (b), todos administrados por via oral. Valores obtidos através do número de 6 ratos.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Preparação e caracterização das nanopartículas com enoxaparina

A heparina é o anticoagulante de escolha para prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso. Contudo, as limitações biológicas e farmacocinéticas, que exigem administração endovenosa ou várias doses subcutâneas ao dia e controle laboratorial, levaram ao desenvolvimento da heparina fracionada, também denominada de HBPM. Estas são derivadas da heparina (não fracionada) por depolimerização química ou enzimática. Entre as grandes vantagens da HBPM estão a sua elevada biodisponibilidade (Handeland et al, 1990) e menor ligação aos macrófagos e células endoteliais, levando a uma maior meia-vida plasmática (Brzu et al, 1985).

A utilização de métodos de liberação sustentada para administração de fármacos utilizando-se nanopartículas é bastante promissora, pois pode trazer inúmeros benefícios na prática clínica. Nesse sentido, a proposta de desenvolvimento de uma nanopartícula com HBPM, como descrito anteriormente, um anticoagulante com eficácia comprovada para o tratamento da TVP, e que possa ser administrada por via oral, tem uma grande relevância clínica.

O nosso grupo de pesquisa tem trabalhado nesse sentido, e anteriormente foi produzida uma nanopartícula de PCL e enoxaparina, que mostrou um efeito anticoagulante *in vitro*, mais prolongado quando comparado à enoxaparina livre *in vivo*. O efeito antitrombótico em modelo de TVP em ratos também foi evidenciado (Pazzini, 2010).

Este estudo avançou nessa pesquisa, desenvolvendo nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina, para avaliar a possibilidade de sua utilização por via oral.

O método de dupla emulsão e evaporação do solvente empregado neste estudo permitiu a obtenção de nanopartículas esféricas e relativamente homogêneas. Estas são propriedades importantes quanto à qualidade das nanopartículas produzidas.

O tamanho das nanopartículas tem relevância quanto à farmacocinética, e partículas com menor diâmetro tendem a ser melhor absorvidas pela parede da mucosa gastrointestinal. Este trabalho demonstrou que o diâmetro de nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina foi de $512,8 \pm 13,8$ nm.

Sun et al (2010) relataram recentemente que, complexos de polieletrólitos com quitosana e enoxaparina com diâmetros semelhantes foram absorvidos por via oral. Contudo, esse estudo analisou a atividade anticoagulante dessas nanopartículas pelo TTPa, demonstrando um aumento de apenas 2 segundos em relação ao controle com salina, o que pode ser uma crítica à metodologia empregada. O estudo também não referiu a concentração de enoxaparina das nanopartículas. Por outro lado, um estudo utilizando nanopartículas de PCL, Eudragit e PVA com tinzaparina (200 a 600 UI/Kg), com diâmetro de aproximadamente 400 nm, demonstrou absorção e atividade anticoagulante, quando as mesmas foram administradas por via oral em coelhos, gerando um aumento na atividade anti-Xa no plasma (Hoffart et al, 2006).

Portanto, em relação ao diâmetro, as nanopartículas de PCL-Quitosana produzidas neste estudo são semelhantes ao descrito por outros autores, o que não deve ter sido um obstáculo para a absorção das mesmas.

As análises de estabilidade das nanopartículas de PCL-Quitosana com ou sem enoxaparina mostra que em 50 dias de avaliação essas nanopartículas mantiveram-se praticamente estáveis, variando muito pouco em diâmetro (em torno de 500 nm), e índice de polidispersidade, e apresentaram sempre carga positiva, fator importante para a absorção em células e tecidos.

Uma dificuldade importante no encapsulamento da enoxaparina é a sua natureza hidrofílica, pois conduz a uma maior difusão do ativo para a fase aquosa externa antes da precipitação do polímero, diminuindo desta forma a eficiência de encapsulamento (Hoffart et al, 2002). Estudos prévios mostraram uma eficiência de encapsulamento variável, de 8 a 97%, o que pode ser decorrente da natureza do polímero empregado e de sua carga (Jiao et al, 2002). Polímeros com carga positiva podem comprometer a liberação da enoxaparina encapsulada.

Em relação à eficiência de encapsulamento, os resultados obtidos de 99% em média, reforçam a ideia de que o polímero natural quitosana utilizado no revestimento das nanopartículas encapsulou a enoxaparina na formulação, fator muito importante, principalmente quando esta dispersão de partículas entra em contato com a mucosa do estômago, que contém um pH ácido (1.2 a 2.0).

As análises de citotoxicidade indicaram que a enoxaparina apresentou baixa toxicidade, podendo ser utilizada como anticoagulante no tratamento da fase aguda e na prevenção da TVP em pacientes com risco elevado de fenômenos tromboembólicos.

A enoxaparina encapsulada foi mais citotóxica que a livre. Este aumento na citotoxicidade pode ser atribuído às nanopartículas, já que as nanopartículas vazias apresentaram uma redução de 4,95% na viabilidade celular, isto sugere que a maior citotoxicidade da enoxaparina encapsulada, em relação à livre, pode ser atribuída à citotoxicidade das nanopartículas. Entretanto, as nanopartículas com ou sem enoxaparina não atingiram o IC₅₀ até a máxima concentração avaliada (45 uM) indicando que estas formulações apresentam baixa toxicidade, podendo assim serem utilizadas em estudos visando o tratamento ou prevenção da TVP.

6.2. Padronização do modelo de TVP em ratos

A indução da TVP pelo modelo de estase em ratos é um método amplamente empregado em estudos experimentais, particularmente para avaliação de fármacos com atividade antitrombótica e anticoagulante (Carelli et al, 2005). Inicialmente propôs-se o emprego do método de estase por ligadura da veia cava, mas os resultados foram insatisfatórios após inúmeras tentativas. Houve uma grande variabilidade em relação ao tamanho do trombo formado no interior da veia cava, e mesmo, muitas vezes não houve a sua formação. Assim, realizou-se a padronização do método de estase, juntamente com um sistema com indução de hipercoagulabilidade.

Nesse método foi empregado um agente que acelera o processo de coagulação e conseqüentemente da formação do trombo. O agente empregado foi a tromboplastina extraída de placenta humana (Thromborel® S; Siemens; ≤60

mg/mL), o que resultou em um trombo com uma grande quantidade de fibrina e eritrócitos (Heit, 2003), onde o sistema de coagulação tem um efeito preponderante.

Com esse método obtivemos resultados mais homogêneos e reprodutíveis visto que, com o modelo empregado no início do trabalho, não estávamos demonstrando reprodutibilidade nos testes *in vivo*. Vogel et al (1989) e Fonseca et al (2006) demonstraram que quando há uma combinação completa de estase e hipercoagulabilidade resulta na formação reprodutível de trombos venosos com pequenos focos de agregados plaquetários e grande quantidade de fibrina e eritrócitos em inspeções histológicas. Atualmente, este modelo de estase e hipercoagulabilidade está sendo bastante utilizado em trabalhos para avaliação da atividade anticoagulante e antitrombótica de novos fármacos.

6.3. Determinação da atividade anticoagulante (atividade anti-Xa) *in vivo*

A atividade anticoagulante *in vivo*, após a administração das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina ou enoxaparina livre, foi avaliada após a administração por via subcutânea e oral. A ação anticoagulante *in vivo* foi avaliada pela determinação da atividade anti-Xa.

Os resultados obtidos com a administração subcutânea da enoxaparina livre mostraram que o aumento da atividade anti-Xa foi significativamente menor quando comparado à nanopartícula de PCL-Quitosana com enoxaparina (50

mg/Kg) ($p= 0,0043$). Provavelmente esses resultados são decorrentes da dose de enoxaparina 10 vezes maior utilizada nas nanopartículas.

Além de uma maior atividade com as nanopartículas com enoxaparina, observou-se também que o tempo de elevação do anti-Xa foi prolongado, em relação ao grupo que recebeu a enoxaparina livre. Nesse grupo houve o desaparecimento da atividade anti-Xa após 6 horas, e o pico de ação foi alcançado em 1 hora, enquanto que a mesma permaneceu por 14 horas com o emprego da enoxaparina encapsulada e o pico foi observado com 3 horas, mantendo-se constante até 10 horas. Estes dados sugerem que as nanopartículas proporcionam a liberação da enoxaparina mais tardiamente e de uma forma mais gradual e sustentada, e na prática clínica isso poderia propiciar menor número de doses de enoxaparina.

A administração da enoxaparina por via oral, livre ou encapsulada em nanopartículas de PCL-Quitosana não gerou nenhuma atividade anticoagulante, por até 14 horas, o que sugere que a enoxaparina não foi absorvida pelo trato gastrointestinal, por degradação precoce ou por falha na absorção.

As nanopartículas contendo apenas enoxaparina apresentam carga negativa, não favorecendo sua absorção, pois a mucosa gastrointestinal possui a mesma carga. Portanto, a utilização da quitosana, que contém carga positiva, poderia proporcionar a absorção dessas nanopartículas pelo trato gastrointestinal dos ratos, após administração por via oral.

Contudo, nossos resultados demonstraram que o encapsulamento da enoxaparina, mesmo com a utilização da quitosana, não contribuiu para a

absorção da enoxaparina por via oral. Esse resultado contraria o descrito por Sun et al (2010), que demonstraram que derivados de quitosana com diferentes massas molares e enoxaparina propiciaram uma atividade anticoagulante em ratos, quando administrados por via oral. Contudo, como referido anteriormente, a atividade anticoagulante foi sugerida por um aumento de apenas 2 segundos no TTPa.

Além desses resultados, muitas tentativas para melhorar a absorção oral de heparina estão sendo feitas através do uso de adjuvantes, complexos com diamida, e surfactantes. O N-(8-(2-hidroxibenzoil) amino) caprilato (SNAC) quando associado à heparina não fracionada e enoxaparina mostrou um efeito anticoagulante quando administrado por via oral em humanos, aumentando o TTPa e os níveis do fator anti-Xa. Recentemente, um estudo fase III randomizado duplo-cego comparou a profilaxia de TVP em prótese de quadril utilizando SNAC-heparina não fracionada em altas e baixas doses com a enoxaparina subcutânea (PROTECT TRIAL). Os resultados mostraram que a SNAC-heparina em altas doses foi eficaz e segura quando comparada à enoxaparina subcutânea, mas como esse estudo tinha como *end point* a análise de superioridade, esse objetivo não foi alcançado. Contudo, como esses resultados são muito promissores e um dos problemas relatados foi a baixa adesão ao tratamento, em decorrência do sabor muito desagradável da apresentação oral líquida, o desenvolvimento de comprimidos talvez possa contornar esse problema e ser investigado em outro estudo.

Talvez a produção de uma SNAC-heparina palatável, que propicie maior adesão ao tratamento, permitirá a administração oral, como uma alternativa promissora em relação ao maior número de doses e à via subcutânea.

6.4. Avaliação do efeito antitrombótico *in vivo* em modelo de TVP em ratos

A indução da TVP utilizando os modelos de estase e hipercoagulabilidade propicia o desenvolvimento de trombos homogêneos e reprodutíveis, além de acelerar o processo de formação dos mesmos, o que favorece a análise do efeito antitrombótico de fármacos.

A diminuição do trombo formado após o emprego das nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina administradas por via subcutânea demonstra que o efeito antitrombótico *in vivo* está presente. Esse resultado é importante, pois afasta a hipótese de que não houve efeito das nanopartículas de enoxaparina por via oral em decorrência do encapsulamento.

Quando a enoxaparina foi administrada por via oral, livre ou encapsulada, observou-se que não houve nenhum efeito antitrombótico. Portanto, esses resultados sugerem que, ou a enoxaparina foi precocemente degradada, ou não absorvida. Outra hipótese é que a enoxaparina estivesse total ou parcialmente localizada na interface quitosana / PCL, ocorrendo assim sua degradação assim que foi realizada a gavagem no animal, uma vez que a enoxaparina em sua forma livre se degrada rapidamente em pH ácido.

Pelo fato da avaliação do efeito antitrombótico ser considerado um método menos sensível que o anticoagulante, a absorção de pequenas quantidades de enoxaparina poderia não ser suficiente para alterar a formação do trombo. Contudo, como a atividade anti-Xa também estava ausente quando a enoxaparina livre ou encapsulada foi administrada por via oral, esse resultado deve refletir a ausência de ação anticoagulante.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Neste estudo partículas com diâmetro nanométrico (500 nm) e com carga positiva foram obtidas através do método de dupla emulsão e evaporação de solvente. O método foi reprodutível e, além disso, as partículas obtidas foram estáveis por 50 dias. Uma alta eficiência de encapsulação (~99%) foi obtida para o fármaco hidrofílico enoxaparina indicando que o método escolhido foi adequado para o encapsulamento desta molécula.

As análises de citotoxicidade mostraram que a enoxaparina livre e as nanopartículas (contendo ou não enoxaparina) foram pouco citotóxicas, podendo assim serem utilizadas em estudos visando o tratamento ou prevenção da TVP.

A padronização do modelo de TVP em ratos por estase e hipercoagulabilidade mostrou-se viável na prática, de fácil execução e reprodutível, o que o torna adequado para a análise antitrombótica de fármacos.

O estudo mostrou que as nanopartículas de PCL-Quitosana com enoxaparina apresentam atividade anticoagulante e antitrombótica em ratos, quando administradas por via subcutânea.

A adição de quitosana não propiciou um efeito antitrombótico ou anticoagulante, quando as nanopartículas de enoxaparina foram administradas por via oral em ratos. Esse resultado pode ser decorrente da não absorção das nanopartículas ou da degradação precoce da enoxaparina no trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arbit, E.; Goldberg, M.; Gomez-Orellana, I.; Majuru, S. Oral heparin: status review. *Thromb J.* 2006; 4:6.

Barros-Sena, M.A.; Genestra, M. Profilaxia da trombose venosa profunda em pós-operatório de cirurgias ortopédicas em um hospital de traumatologia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2008, vol. 30,n.1, pp. 29-35.

Batharai, N.; Ramay, H. R., Chow, S., Zhang, M; Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* 2006:1(2) 181–187.

Baughman, R.A.; Kapoor, S.C.; Agarwal, R.K.; Kisicki, J.; Catella-Lawson, F.; FitzGerald, G.A. Oral delivery of anticoagulant doses of heparin. A randomized, double-blind, controlled study in humans. *Circulation* 1998, 98:1610-1615.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt. O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* (2004) 57, 19-34.

Berkowitz, S.D.; Marder, V.J.; Kosutic, G.; Baughman, R.A. Oral heparin administration with a novel drug delivery agent (SNAC) in healthy volunteers and

patients undergoing elective total hip arthroplasty. *J Thromb Haemost* 2003, 1:1914-1919.

Borenfreund, E.; Puerner, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alteration and Neutral Red absorption. *Tox. Lett.* 1985, 24, 119–124.

Brzu, T.; Molho, P.; Tobelem, G.; Petitou, M.; Caen, J. Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1985; 845: 196-203.

Carelli, G.; Maffei, F.H.; Mattar, L.; Ferrari, I.C.; Thomazini-Santos, I.A.; de Carvalho, L.R. Combinations of low doses of unfractionated heparin and of low-molecular-weight heparin prevent experimental venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* (2005); 34 (6): 263-8.

Carvalho, I.; Thomazine, I.A.; Maffei, F.H.A.; Curi, P.R.; Mattar, L. Trombose venosa experimental por ligadura de veia cava no rato: comparação entre diferentes técnicas. 7. Reunião anual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental, Caxambu. *Anais* 1992, p 69.

Cater, J.C. The natural history and epidemiology of venous thrombosis. *Prog Cardiovas Dis* (1994) 36: 423-38.

Chung, Y.I.; Kim, J.C.; Kim, Y.H.; Tae, G.; Lee, S.Y.; Kim, K.; Kwon, I.C. The effect of surface functionalization of PLGA nanoparticles by heparin- or chitosan-conjugated Pluronic on tumor targeting. *J. Control. Release* (2010), doi:10.1016/j.jconrel.2010.01.017.

D'Amico, E.A. Trombofilia: quando suspeitar e como investigar? *Rev. Assoc. Med. Bras.* [online]. 2003, vol.49, n.1, pp. 7-8.

Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 1986 May 22; 89(2): 271-7.

Dos Santos, J.E.; Soares, J.P.; Dockal, E.R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros* [online]. 2003, vol.13, n.4, pp. 242-249.

Fonseca, R.J.C.; Mourão, P.A.S. Fucosylated chondroitin sulfate as a new oral antithrombotic agent. *Thromb Haemost* 2006; 96: 822-9.

Handeland, G.F.; Abildgaard, U.; Holm, H.A.; Arnesen, K.E. Dose adjusted heparin treatment of deep venous thrombosis. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 39: 107-12.

Heit JA. Risk factors for venous thromboembolism. *Clin Chest Med* 2003; 24: 1–12.

Herbert, J.M.; Bernat. A.; Maffrand, J.P.; Importance of platelets in experimental venous thrombosis in the rat. *Blood*. 1992 Nov 1; 80(9): 2281-6.

Hoffart, V.; Lamprecht, A.; Maincent, P.; Lecompte, T.; Vigneron, C.; Ubrich, N. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J Control Release* 2006; 113: 38-42.

Hoffart, V.; Ubrich, N.; Simonin, C.; Babak, V.; Vigneron, C.; Hoffman, M. Low molecular weight heparin-loaded polymeric nanoparticles: Formulation, characterization and release characteristics. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28(9): 1091-9.

Hull, R.; Kakkar, A.K.; Marder, V.J.; Baughman, R.; Leone-Bay, A.; Goldberg, M. Oral SNAC-heparin vs, enoxaparin for preventing venous thromboembolism following total hip replacement. *Blood* 2001, 100: abstract No 558.

Jiao, Y.; Ubrich, N.; Marchand-Arvier, M.; Vigneron, C.; Hoffman, M.; Lecompte, T.; Maincent, P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Oral Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles in Rabbits. *Circulation*, Jan 2002; 105: 230 - 235.

Kharb, V.; Bhatia, M.; Dureja, H.; Kaushik, D. Nanoparticle Technology for the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutical Technology*, Feb 2006, v.30 Issue 2, p82-92.

Lam, L.H.; Silbert, J.E.; Rosemberg, R.D. The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 69: 570-7.

Lanke, S.S.S., Gayakwad, S.G., Strom, J.G., D'Souza, M.J., Oral delivery of low molecular weight heparin microspheres prepared using biodegradable polymer matrix system. *Journal of Microencapsulation*, (2009) 26:6, 493-500.

Lira, A.A.M.; Nanclares, D.M.A.; Neto, A.F.; Marchetti, J.M.; Drug-polymer interaction in the all-trans retinoic acid release from chitosan microparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. (2007) 87, 899-903.

Longhi, F.; Laks, D.; Kalil, N.G.N. Trombocitopenia induzida por heparina. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. 2001, vol.23, n.2, pp. 93-99.

Luong-Van, E., Grondahl, L., Chua, K. N., Leong, K. W., Nurcombe, V. Cool, S. M., Controlled release of heparin from poly([epsilon]-caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials*, Vol 27, Issue 9, March 2006, p. 2042-2050.

Marcato, P.D.; Durán, N. (2008). New Aspects of Nanopharmaceutical Delivery Systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, (2008) 8, 2216-2229.

Melo, E.I.; Pereira, M.S.; Cunha, R.S.; de Sá, M.P.L.; Mourão, P.A.S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. Rev Bras Cir Cardiovasc [online]. 2008, vol.23, n.2, pp. 169-174.

Meng, F.A.; Ma, G.H.; Qiu, W.; Su, Z.G. W/O/W Double emulsion technique using ethyl acetate as solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. J Control Release 2003; 91: 407-416.

Merkli, A.; Tabatabay, C.; Gurny, R.; Heller, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. Prog. Polym. (1998) Sci. 23, 563-580.

Miyazaki S.; Takahashi A.; Kubo W. Poly n-butycyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration. J Pharmaceut Sci 2003; 6: 240-5.

Motlekar, N.A., Youan, B.B. The quest for non-invasive delivery of bioactive macromolecules: a focus on heparins. J. Control Release (2006) 113, 91–101.

Moser, K.M. Venous thromboembolism. Am Rer Respir Dis 1990; 141: 235-49.

Paliwal, R., Paliwal, SR., Agrawal, GP., Vyas, SP. Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 422 (2012) 179– 184.

Panyam, J.; Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 329-47.

Park, J.W.; Jeon, O.C.; Kim, S.K.; Al-Hilal, T.A.; Moon, H.T.; Kim, C.Y.; Byun, Y. Anticoagulant Efficacy of Solid Oral Formulations Containing a New Heparin Derivative. *Molecular Pharmaceutics* 2010 Vol. 7, NO. 3, 836–843.

Park, J.W.; Jeon, O.C.; Kim, S.K.; Al-Hilal, T.A.; Lim, K.M.; Moon, H.T.; Kim, C.Y.; Byun, Y. Pharmacokinetic evaluation of an oral tablet form of low-molecular weight heparin and deoxycholic acid conjugate as a novel oral anticoagulant. *Thromb Haemost* 2012; 105: 1060–1071.

Pazzini, C. Preparação e caracterização de nanopartículas com heparina e sua avaliação em modelo animal de trombose venosa. Campinas, 2010 (Tese-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).

Picos, D.R.; Carril, M.G.; Mana, D,F.; Fuent,e L.N. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev Cubana Farm* 2000; 34: 70-7.

Qurrat-ul-Ain S.; Sharma S.; Khuller G.K.; Garg S.K. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 931-8.

Reis, C.P.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2006) 2, 8– 21.

Reyers, I.; Mussoni, L.; Donati, M.B.; Gaetano, G. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats. *Thromb Res* 1980; 18: 669-674.

Rizkalla, N.; Rangué, C.; Lacasse, F.X.; Hildgen, P. Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method. *J Microencapsul* 2006; 23: 39-57.

Rosendaal, F.R. Venous thrombosis: The role of genes, environment and behavior. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 1-12.

Sacchetti, M.; Van Oor, M.M. Inhalation aerosols—physical and biological basis for therapy. Marcel Dekker, USA 1996.

Scarvelis D.; Wells, P.S. Diagnosis and treatment of deep-vein thrombosis. *Can Med Assoc J* 2006; 175(9): 1087-92.

Schaffazick, S. R.; Guterrez, S.S. Caracterizacao e estabilidade fisico-quimica de sistemas polimericos nanoparticulados para administracao de farmacos. *Química Nova*, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

Silva, H.S.R.; Santos, K.S.C.R.; Ferreira, E.I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*. 29, 776-785, 2006.

Silverstein, M.C.; Heit, J.A.; Mohr, D.N.; Petterson, T.M.; O'Fallon, W.M.; Melton III L.J. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A 25-year population-bases study. *Arch Intern Med* 1998; 158(6): 585-93.

Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.H.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001; 70: 1-20.

Sun, W.; Mao, S.; Wang, Y.; Junyaprasert, V.B.; Zhang, T.; Na, L.; Wang, J. Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *International Journal of Pharmaceutics* 386 (2010) 275-281.

Sun, W.; Tian, W.; Zhang, Y.; He, J.; Mao, S.; Fan, L. Effect of novel stabilizers—cationic polymers on the particle size and physical stability of poorly soluble drug nanocrystals. *Nanomedicine: NBM* 2012; 8:460-467.

Vogel, G.M.T.; Meuleman, D.G.; Bourgondiën, F.G.M.; Hobbelen, M.J. Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. *Thromb Res* 1989; 54: 399-410.

White, R.H. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107 (1): 14-8.

Wienen, W.; Stassen, J.M.; Priepke, H.; Ries, U.J.; Huel, N. Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate, on thrombus formation and bleeding time in rats. *Thromb Haemost* 2007; 98: 333–338.

Yildiz, A.; Okyar, A.; Baktir, G.; Araman, A.; Özsoy Y. Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly(lactic acid). *IL Farmaco* 2005; 60:919-24.

Youan, B.B.C.; Hussain, A.; Nguyen, N. Evaluation of Sucrose as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. *AAPS Pharm. (2003) Sci.* 5, 1-9.

Zeng, J.; Chen, X.S.; Xu, X.Y.; Liang, Q.Z.; Bian, X.C.; Yang, L.X. Ultrafine fibers electrospun from biodegradable polymers, *J Appl Polym Sci* 89 (2003), pp. 1085–1092.

Zhang, J.; Chen, X.G.; Sun, G.Z.; Huang, L.; Cheng, X.J. Effect of molecular weight on the oleoyl-chitosan nanoparticles as carriers for doxorubicin. *Colloids Surf: Biointerfaces* (2010), doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.12.020.

ANEXO

9. ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2145-1, sobre "Avaliação da atividade anticoagulante e antitrombótica de nanopartículas com heparina em modelo animal de trombose venosa profunda", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi / Lucas Bessa Prado, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2145-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>