CARLA PAZZINI

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS COM HEPARINA E SUA AVALIAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE TROMBOSE VENOSA

CAMPINAS

2010

CARLA PAZZINI

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS COM HEPARINA E SUA AVALIAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE TROMBOSE VENOSA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Medicina Experimental.

ORIENTADORA: *Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi/UNICAMP*

CO-ORIENTADORA: *Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoher/UNICAMP*

COLABORAÇÃO: *Prof. Dr. Nelson Duran/UNICAMP*
Dra. Priscyla D. Marcato/UNICAMP

CAMPINAS

UNICAMP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P299p

Pazzini, Carla
Preparação e caracterização de nanopartículas com heparina e sua avaliação em modelo animal de trombose venosa / Carla Pazzini. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Joyce Maria Annichino-Bizzacchi; Nelci Fenalti Hoher
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Heparina. 2. Nanopartículas. 3. Trombose venosa. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria. II. Hoher, Nelci Fenalti. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Preparation and characterization of heparin-loaded nanoparticles and its evaluation in animal model of venous thrombosis

Keywords:
- Heparin
- Nanoparticles
- Venous thrombosis

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica
Área de Concentração : Medicina Experimental

Banca examinadora:

Profª. Drª. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Profª. Drª. Sara Teresinha Olalla Saad
Profª. Drª. Patrícia da Silva Melo

Data da defesa: 12-03-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Carla Pazzini

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Membros:
Professor(a) Doutor(a) Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Professor(a) Doutor(a) Sara Teresinha Olalla Saad
Professor(a) Doutor(a) Patricia da Silva Melo

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/03/2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francismar e Elisete, meus maiores exemplos de vida, amor, sabedoria e determinação. Por acreditarem nos meus sonhos e terem sido minhas asas, mais uma vez, para que eu pudesse embarcar em mais esta viagem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar por onde é que eu esteja me dando força, coragem e confiança de que sempre posso alcançar meus sonhos.

A Dra. Joyce M. Annichino-Bizzachi, pelo exemplo de conduta e orientação nos aspectos científicos e profissionais de minha carreira.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán e à Dra. Priscyla Marcato pela colaboração e ensinamentos, fundamentais no desenvolvimento deste estudo, além da confiança, amizade, dedicação e paciência.

A Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr, pelo carinho e incentivo na minha carreira acadêmica.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia, Ucha, Deva e Cris, pela colaboração, amizade e paciência.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Hemostasia, Tânia, Silmara, Susan e Ricardo, pela colaboração, paciência e amizade.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Química, Chico, Ana Paula, Dani, Leonardo, Jeanifer, Ana Maria, Thiago, Zaine, Sandrinha, Lívia, Alessandra, Bulba, Juliana, Stefani e Marcela pela amizade e companhia.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia, Aline, Mari, Luís Fernando, Bruna, Josie, Andrey, Guilherme, Vagner, Kiara, Dani, Eloá, Suley, Carol e Lucas pela companhia, ajuda e carinho.

Aos funcionários do Núcleo de medicina experimental, Willian, Ana, Miguel e Dito, pelos ensinamentos na parte experimental e pelas coletas de sangue dos animais.

Ao João Luis, que desde o inicio deste trabalho esteve ao meu lado, por todo o seu amor, carinho, compreensão e paciência.

Aos meus irmãos, Alexandre e Fernando, a minha cunhada Deise e ao meu sobrinho Breno, pelo amor, incentivo e carinho.

As amigas, Daiane e Dani, pelo carinho, companhia e amizade no período da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula, Profa. Dra. Fátima Sonati e Profa. Dra. Nicola Conran, pela atenção, sugestões, disponibilidade e ensinamentos no exame de qualificação.

A Profa. Dra. Sara Saad e Profa. Dra. Patricia Melo, pela atenção, disponibilidade e presença na banca de defesa.

A FAPESP, que proporcionou ajuda financeira para a realização deste trabalho (Processo nº 07/56552-0).

Ao CNPq que proporcionou auxilio financeiro através do Projeto Universal (Nº 474424-2007-3).

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xix
1.INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Trombose Venosa Profunda.....	23
1.2. Heparina.....	24
1.3. Nanotecnologia.....	28
1.4. Encapsulamento de heparina em nanopartículas.....	31
1.5. Uso de nanopartículas com heparina em modelo animal de TVP.....	32
2. OBJETIVOS.....	33
3. METODOLOGIA.....	35
3.1. Preparação das nanopartículas com heparina.....	36
3.1.1. Método de dupla emulsão (a/o/a) e evaporação do solvente.....	36
3.2. Caracterização das nanopartículas com heparina.....	36
3.2.1. Eficiência de encapsulação.....	36
3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
3.2.3. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas.....	38
3.2.4. Liofilização das nanopartículas.....	38
3.2.5. Determinação da porcentagem de tensoativo residual.....	39
3.3. Liberação da heparina *in vitro*.....	39
3.4. Determinação da atividade anti-Xa *in vivo*.....	40

3.5. Padronização do método de Indução de TVP por estase em modelo animal..... 42

3.6. Avaliação *in vivo* através do modelo animal de TVP a ação antitrombótica das nanopartículas com heparina e da heparina livre..... 43

3.7. Análise estatística..... 43

4. RESULTADOS..... 44

4.1. Padronização do método de preparação de nanopartículas com heparina..... 45

4.2. Eficiência de Encapsulação..... 45

4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 47

4.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas..... 48

4.5. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas liofilizadas..... 49

4.6. Determinação da porcentagem de tensoativo residual..... 50

4.7. Liberação da heparina *in vitro*..... 51

4.8. Determinação da atividade anti-Xa *in vivo*..... 52

4.9. Modelo de trombose venosa em ratos pelo método de estase..... 56

4.10. Avaliação in vivo da atividade antitrombótica da heparina livre e encapsulada em nanopartículas de PCL no modelo animal de TVP..... 59

5. DISCUSSÃO..... 62

5.1. Produção nanopartículas com heparina..... 63

5.2. Avaliação da liberação *in vitro* da heparina encapsulada..... 66

5.3. Avaliação da atividade anticoagulante *in vivo* das nanopartículas..... 67

5.4. Avaliação da atividade antitrombótica *in vivo* das nanopartículas com heparina no modelo de TVP..... 68

5. CONCLUSÕES..... 70

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 72

7. ANEXOS..... 81

7.1. Tabelas com média e mediana dos trombos..... 82

7.2. Certificado do Comitê de Ética..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS

AT III	Antitrombina III
DS	Sulfato de dextran
Et al.	E outros (as)
FXa	Fator X ativado
H_3BO_3	Ácido bórico
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
HNF	Heparina não fracionada
HCL	Ácido clorídrico
KI/I_2	Iodeto de potássio
kV	Kilovolt
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mmol.	Massa molar
mV	Milivolt
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
PA	Poliacrilato
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PCS	Spectroscopia de correlação de fótons
PHA´s	Polihidroxialcanoatos
PLGA	Poli (D, L-láctico-co-glicólico)
PVA	Polivinil-álcool
rcf	Força centrífuga relativa
rpm	Rotação por minuto
SAF	Anticorpo antifosfolípideo
TEP	Trombo embolismo pulmonar
TVP	Trombose venosa profunda
UI	Unidades internacionais
UV vis	Ultravioleta visível

a/o/a	água/óleo/água
Xa	Dez ativado

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1 -	Comparação entre heparina não fracionada e HBPM.....	26
Tabela 2 -	Comparação dos estudos publicados sobre nanopartículas de heparina.....	31
Tabela 3 -	Curva de calibração da atividade Anti-Xa.....	40
Tabela 4 -	Eficiência de encapsulamento de heparina nas nanopartículas de PCL, em 5 amostras.....	46
Tabela 5 -	Tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas com heparina, em 3 amostras.....	48
Tabela 6 -	Diâmetro médio, índice de polidispersidade de nanopartículas liofilizadas com 10% e 20% de Maltose, com e sem lavagem.....	49
Tabela 7 -	Diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de nanopartículas com heparina sem lavagem e liofilizadas com 10 % de maltose, em 3 amostras.....	49
Tabela 8 -	Quantidade de tensoativo residual nas nanopartículas lavadas e não lavadas.....	50
Tabela 9 -	Peso do trombo venoso em 4 ratos.....	58
Tabela 10 -	Média do peso dos trombos logo após a retirada.....	59
Tabela 11 -	Média do peso dos trombos secos.....	59

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Estrutura de heparina..... 23

Figura 2 - Representação gráfica da inativação da trombina e do fator Xa pela heparina convencional e HBPM (Hirsh J., 2007)..... 24

Figura 3 - Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas convencionais (curva em preto) e sistemas de liberação sustentada (curva em vermelho) (Durán e De Azevedo, 2002-Modificado)..... 29

Figura 4 - Curva de calibração da atividade anti-Xa..... 41

Figura 5 - Curva de calibração da heparina obtida pelo método Colorimétrico Azure II..... 45

Figura 6 - Micrografias de nanopartículas de PCL com heparina (a) X 5000, (b) X 11000 e (c) X 25000..... 47

Figura 7 - Curva de Calibração de PVA..... 50

Figura 8 - Liberação de heparina encapsulada em nanopartículas de PCL em tampão fosfato pH (7,4) com e sem enzima esterase..... 51

Figura 9 - Atividade Anti-Xa após administração subcutânea de nanopartículas de PCL com HBPM 1000 UI/kg (■), e HBPM 1000 UI/kg (●). Média obtida através do número de 6 ratos. Em todos os tempos observou-se uma diferença estatisticamente significativa, com P<0,001 (*)..... 53

Figura 10 - Atividade anti-Xa até 14 horas após a administração subcutânea de HBPM 200 UI/kg (■), nanopartículas de PCL com HBPM 1000 UI/kg (●), e nanopartículas de PCL com HBPM 800 UI/kg (▲). Média obtida através do número de 6 ratos. (#) P<0,005 Comparação heparina livre e heparina encapsulada, (*) P>0,05 Comparação heparina encapsulada 800 UI/kg e 1000 UI/kg, (**) P<0,05 Comparação heparina encapsulada 800 UI/kg e 1000 UI/kg..... 54

Figura 11 - Isolamento de ~1,8cm da veia cava inferior com pré-nó..... 55

Figura 12 - Ligadura das veias colaterais..... 56

Figura 13 - Ligadura na veia cava inferior com fio de seda 4-0..... 56

Figura 14 - Após 3 horas, o animal foi reaberto, os pré-nós foram apertados e a parede da veia cava inferior foi cortada longitudinalmente para retirada do trombo..... 57

Figura 15 - Retirada do trombo..... 57

Figura 16 - Média e desvio-padrão do peso do trombo. * Controle *versus* nanopartículas…….. 60

Figura 17 - Média e desvio-padrão do peso do trombo seco. P<0,05. * Controle *versus* nanopartículas..... 60

RESUMO

A heparina é um anticoagulante amplamente empregado no tratamento e profilaxia da trombose venosa profunda (TVP). Algumas limitações do seu uso são o custo e a via de administração, endovenosa ou subcutânea, às vezes em doses repetidas em 24 horas. Assim, o desenvolvimento de um produto que possa ser administrado por via subcutânea em um menor número de aplicações ou por via oral, torna-se um importante desafio, e de grande aplicabilidade clínica. A utilização de um sistema de liberação sustentada de fármacos pode vir ao encontro desse objetivo, pois permite que o agente seja protegido e liberado gradativamente. Este projeto consistiu na preparação e caracterização de nanopartículas biodegradáveis de poli (-caprolactona) (PCL) como carreador de heparina de baixo peso molecular, e avaliação de sua atividade anticoagulante e antitrombótica *in vivo*. As nanopartículas foram preparadas pelo método de dupla emulsão a/o/a e evaporação de solvente. A caracterização das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), observando-se nanopartículas esféricas e homogêneas. O diâmetro médio das nanopartículas foi de 269 ± 36 nm e o potencial zeta foi de -1,20 ± 1,93 mV, indicando que as mesmas apresentam carga negativa. A eficiência de encapsulação, analisada pelo método Azure II, foi de 80 ± 2,3%. A liberação da heparina *in vitro*, avaliada pelo método de Azure II, no período de 24 horas foi de 4 ± 1,8%. Após a adição da esterase houve um aumento para 10 ± 1,9% na liberação de heparina, provavelmente pela aceleração da degradação das partículas pela enzima. A liberação *in vivo* da heparina encapsulada, após aplicação subcutânea em ratos, foi avaliada pela atividade anti-Xa plasmática através do método colorimétrico, e os resultados foram comparados aos obtidos com heparina livre. A dose de heparina encapsulada teve que ser 5 vezes maior que a dose de heparina livre. A heparina encapsulada em nanopartículas apresentou uma liberação sustentada por até 12 horas, por um período significativamente mais prolongado ($P<0,01$), mas com menor atividade anti-Xa. Esses dados sugerem que as nanopartículas podem permitir que a heparina seja liberada de uma forma mais gradual, e mesmo em dose mais elevada, não parece estar associada a um risco de

atividade acima da faixa terapêutica. Quando se comparou a atividade anti-Xa obtida pela injeção subcutânea de nanopartículas com heparina em doses diversas, 800 UI/Kg e 1000 UI/Kg, ficou demonstrado que o efeito e o tempo de ação dependem da dose aplicada. Para avaliação da ação antitrombótica foi padronizado o modelo de TVP por estase em ratos. As doses de nanopartículas empregadas para a avaliação da ação antitrombótica foram calculadas pela atividade anti-Xa semelhante à obtida com a heparina livre, de 0,3 a 0,7 UI/mL. A heparina livre ou encapsulada em nanopartículas foi aplicada em uma única dose, por via subcutânea. Os resultados mostraram que houve diminuição significativa do trombo formado com a utilização de heparina livre, em comparação ao grupo controle (P=0,004). Praticamente não houve a formação de trombose venosa em nenhum dos ratos que receberam a heparina encapsulada em nanopartículas, com uma diferença significativa tanto em relação ao grupo controle (P<0,001) como ao grupo com heparina livre (P<0,001). Em resumo, o método de dupla emulsão a/o/a mostrou-se um método eficiente para o encapsulamento de heparina, proporcionando a obtenção de nanopartículas esféricas e com alta eficiência de encapsulação. Pelos estudos *in vivo*, a heparina encapsulada não liofilizada mostrou uma liberação sustentada, por um período superior ao obtido com a heparina livre, e com excelente ação antitrombótica. Caso esses resultados se confirmem através da continuidade deste estudo, a utilização de heparina encapsulada em nanopartículas na prática clínica poderá ser uma realidade com grandes vantagens para o paciente.

ABSTRACT

Heparin is an anticoagulant widely used in the treatment and prophylaxis of deep vein thrombosis (DVT). Some limitations of its use is the cost and route of administration, intravenous or subcutaneous, sometimes in repeated doses in 24 hours. Thus, the development of a product that can be administered subcutaneously in a smaller number of applications or orally becomes a major challenge, with interesting clinical applications. The use of a system for sustained release of drugs can come to meeting that goal, because it allows the agent to be protected and released gradually. This project consisted of the preparation and characterization of biodegradable nanoparticles of poly (ε-caprolactone) (PCL) as a carrier of heparin of low molecular weight, and its evaluation of anticoagulant and antithrombotic activity *in vivo*. The nanoparticles were prepared by the method of double emulsion w/o/w and evaporation of solvent. The characterization of nanoparticles was performed by scanning electron microscopy (SEM), which showed homogeneous spherical nanoparticles. The average diameter of nanoparticles was 269±36 nm and zeta potential was -1.20±1.93 mV, indicating negative charge. The encapsulation efficiency, assayed by Azure II, was 80±2.3%. The release of heparin *in vitro*, at the 24-hour period was 4±1.8%. After the addition of esterase the release of heparin was increased to 10±1.9%, probably by accelerating the degradation of particles by the enzyme. The *in vivo* release of encapsulated heparin after subcutaneous administration in rats, was assessed by anti-Xa plasma activity and the results were compared with free heparin. The dose of heparin encapsulated had to be 5 times the dose of heparin free. Heparin-encapsulated nanoparticles showed a sustained release for up to 12 hours for a period significantly longer ($P<0.01$), but with lower anti-Xa activity. These data suggest that nanoparticles may allow heparin to be released in a more gradual, but with lower activity. When comparing the anti-Xa activity obtained by subcutaneous injection of nanoparticles with different doses of heparin, 800 IU/kg and 1000 IU/kg, demonstrated that the effect and duration of action depends on the dose applied. To evaluate the antithrombotic action of nanoparticles with heparin a model of DVT by stasis in rats was used. The doses of nanoparticles used for the evaluation of antithrombotic action were calculated by anti-Xa activity similar to that obtained

with free heparin, 0.3 to 0.7 IU/mL. Heparin free or encapsulated in nanoparticles was applied in a single dose subcutaneously. The results showed a significant decrease of thrombus formed with the use of free heparin, compared with the control group (P=0.004). There were virtually no formation of venous thrombosis in any of the rats that received heparin encapsulated in nanoparticles, with a significant difference both in the control group (P<0.001) and the group with free heparin (P<0.001). In summary, the method of double emulsion w/o/w proved an efficient method for the encapsulation of heparin, providing spherical homogeneous nanoparticles with high encapsulation efficiency. For *in vivo* studies, heparin encapsulated showed a sustained release for a period greater than that of free heparin, and with excellent antithrombotic action. If these results are confirmed by the continuity of this study, the use of heparin encapsulated in nanoparticles in clinical practice can be of great benefits for the patient.

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 fluído sanguíneo, e/ou da composição sanguínea (Rosendaal, 2005).

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

Em geral o membro inferior é o local mais freqüentemente 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 pode ser definida como um estado de predisposição a trombose, em que fatores de risco hereditários ou adquiridos podem interagir entre si, caracterizando-a como uma patologia multifatorial.

Os fatores de risco que caracterizam a trombofilia adquirida são a gravidez, o puerpério, o uso de anticoncepcional oral ou de hormônio de reposição hormonal, imobilização prolongada, cirurgia, trauma grave, fraturas, neoplasias,

idade avançada, antecedente de TVP, e síndrome do anticorpo antifosfolipídio (SAF).

A trombofilia hereditária, geralmente se expressa pela interação de fatores herdados ou adquiridos (Lane et al., 1996). Este defeito genético pode acometer um único gene que predispõe a TVP, bem como variações genéticas normais nos níveis das proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes. O primeiro episódio tromboembólico geralmente ocorre entre a segunda e quarta décadas de vida, em mais de 50% destes indivíduos é recorrente, e por vezes acomete sítios pouco usuais, como veias intra-abdominais e do sistema nervoso central (Rosendaal, 1999; Zoller et al., 1999; Middeldorp et al., 2001).

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

A heparina é o principal anticoagulante utilizado para o tratamento da TVP na fase aguda e prevenção em pacientes com risco elevado de fenômenos tromboembólico.

1.2. Heparina

A heparina (figura 1) é formada por uma mistura heterogênea de glicosaminoglicanos e, polissacarídeos compostos por longas cadeias de repetidas unidades de dissacarídeos (hesosamina e ácido glucurônico ou idurônico). 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.

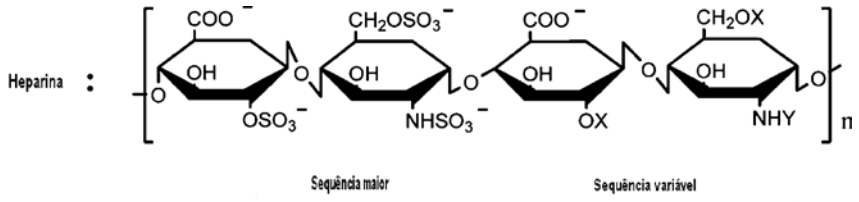


Figura 1: Estrutura da heparina.

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

A ligação entre a heparina e a antitrombina ocorre através da glucosamina presente em uma seqüência pentassacarídea de alta afinidade da heparina. Apenas um terço das cadeias de heparina contém esse pentassacarídeo, que é a fração responsável pela sua ação anticoagulante.

O complexo heparina-antitrombina inativa principalmente a trombina (fator IIa) e o fator Xa e, com menor afinidade os fatores IXa, XIa e XIIa. Particularmente, na 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 (figura 2).

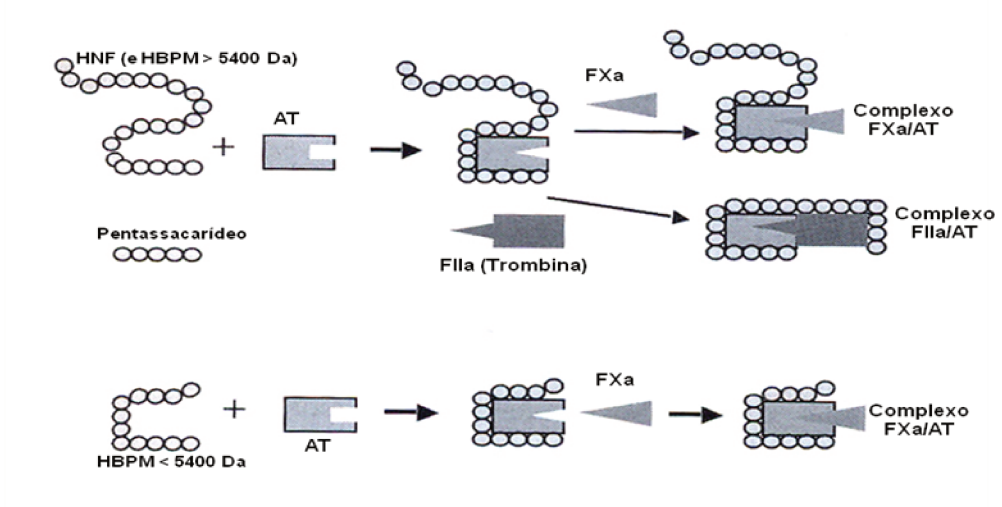


Figura 2: Representação gráfica da inativação da trombina e do fator Xa pela heparina convencional e HBPM (Hirsh J., 2007).

Após a formação do complexo trombina/antitrombina ou fator Xa/antitrombina, a heparina é dissociada e pode atuar novamente.

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

Sua administração pode ser por via endovenosa ou subcutânea. A recuperação plasmática por via subcutânea é proporcional à dose administrada.

A depuração plasmática da heparina ocorre inicialmente através de uma saturação rápida, pela ligação aos receptores de células endoteliais e macrófagos, onde a heparina 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 a inconvenientes na prática clínica.

Assim, houve o desenvolvimento das heparinas de baixo peso molecular (HBPM), obtidas pela despolimerização química ou enzimática da heparina não fracionada. O peso molecular dessas heparinas variam de 1 a 15 kDa, com uma média de 4 a 5 kDa. Devido aos diferentes métodos de preparação, há uma variabilidade nas propriedades farmacocinéticas e na atividade anticoagulante das HBPM.

A despolimerização da heparina causa uma menor ligação às proteínas, 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 (Hirsh J., 2007).

Assim como a heparina não fracionada, a HBPM exerce seu efeito anticoagulante pela ativação da antitrombina. Como a maior parte das cadeias da HBPM apresentam 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 (Blann et al., 2009). Pelo fato de virtualmente todas as moléculas de heparina não fracionada conterem 18 sacarídeos, a proporção anti-Xa:anti-IIa é de 1:1. Em contraste, as HBPM têm proporções variáveis de 2:1 a 4:1, de acordo com a distribuição de suas cadeias.

A tabela 1 mostra uma comparação entre a heparina não fracionada e a HBPM, em relação ao peso molecular, média de unidades sacarídeas e proporção da atividade anti-Xa:anti-IIa.

Tabela 1: Comparação entre heparina não fracionada e HBPM.

Comparação do Tamanho e Atividade Anticoagulante entre Heparina Não Fracionada e Heparina de Baixo Peso Molecular		
	Heparina Não Fracionada	**Heparina de Baixo Peso Molecular**
Média do peso molecular (Da)	12,000-15,000	4,000-6,500
Unidades Sacarídeos (Média)	40-50	13-22
Relação do Anti-fator Xa com atividade Anti-fator IIa	1:1	2:1 a 4:1

As propriedades farmacocinéticas da HBPM são superiores à heparina não fracionada, pois apresentam maior biodisponibilidade por via subcutânea quando administradas em menor dose, dose-resposta preditiva e meia-vida superior. O pico da atividade anti-Xa ocorre 3 a 5 horas após a injeção subcutânea e sua depuração não é dose dependente. Assim, a HBPM é administrada em doses fixas para tromboprofilaxia e em doses ajustáveis por Kg de peso para o tratamento de 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 não fracionada, a HBPM apresenta vantagens na prática clínica, pela via de administração subcutânea, com uma ou duas aplicações diárias, e não necessitando de controle laboratorial na maioria dos pacientes. Assim, a HBPM é a fármaco de escolha para o tratamento agudo da TVP (Hirsh J., 2007).

Por outro lado, 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 administração pela via oral.

A heparina comum e a HBPM não são absorvidas pelo trato gastrointestinal, provavelmente por causa de seu tamanho e sua carga negativa (Jiao et al., 2002). Após a ingestão oral, a heparina é degradada em fragmentos sem ação anticoagulante (Yildiz et al., 2005).

Nesse sentido, o emprego da nanotecnologia pode viabilizar essa possibilidade, como tem demonstrado em outras situações clínicas.

1.3.Nanotecnologia

A utilização de um sistema de liberação de fármaco em nanopartículas poliméricas vem atraindo a atenção dos pesquisadores por proporcionar uma alternativa atrativa para uma liberação por longo período, de agentes terapêuticos. O encapsulamento de ativos neste sistema oferece muitas vantagens: (1) o ativo pode ser liberado de forma contínua e sustentada; (2) os fármacos são protegidos pela partículas; (3) a liberação em um sítio específico pode ser atingido, e (4) a repetição da administração do fármaco pode ser diminuída ou não necessária (Jiao et al., 2002).

Nanopartículas são definidas como sistemas coloidais submicrométricos, na faixa de 10 a 999 nm, que oferecem vantagens como carreadores de fármacos, a biocompatibilidade com tecidos e células e à versatilidade para formulações. 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, que não apresentam uma fase oleosa em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Schaffazick S.R., 2003).

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 (Figura 3) (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).

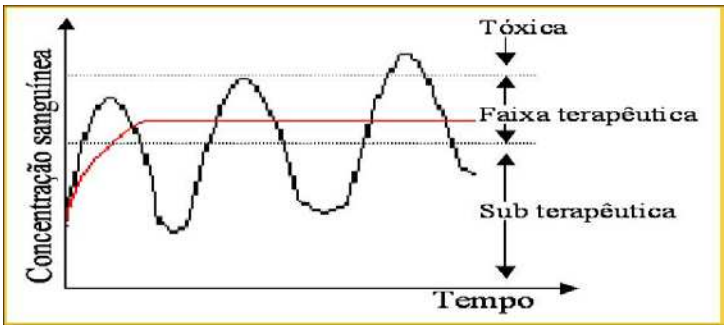


Figura 3: Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas convencionais (curva em preto) e sistemas de liberação sustentada (curva em vermelho) (Durán e De Azevedo, 2002-Modificado).

A eliminação natural do polímero após a liberação total do ativo tem a vantagem de dispensar o inconveniente da intervenção cirúrgica para remoção de implantes. Assim, sistemas micro e nanoestruturados biodegradáveis e biocompatíveis (microesferas, microcápsulas, nanocápsulas e nanoesferas) têm sido desenvolvidos para liberação sustentada de fármacos (Benoit et al., 1996; Soppimath et al., 2001).

Os materiais-suportes 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 poli(ε-caprolactonas) (PCL) ou poliméricos naturais como polihidroxialcanoatos (PHA´s), gelatina e quitosana (Panyam e Labhasetwar, 2003; Qurrat-ul-Ain et al., 2003).

Materiais poliméricos diferem na velocidade e na forma de degradação que são determinadas pela energia requerida para a quebra da ligação e pela localização da ligação (Harsici et al., 2001). Polímeros com fortes ligações covalentes na cadeia principal (C-C) e com grupos não hidrolisáveis requerem longo tempo e/ou catalisadores para sua degradação. Calor, radiação eletromagnética (UV-visível, γ-radiação), agentes químicos (água, oxigênio, ozônio, compostos halogenados) ou qualquer combinação destes fatores podem

catalisar a degradação de polímeros. Moléculas com grupos hidrolisáveis tais como (C-O-C, C-N-C) são degradadas mais facilmente e mais rapidamente.

A maioria dos polímeros biodegradáveis contém grupos hidrolisáveis como amida, éster, uréia e uretano ao longo da cadeia carbônica (Chandra et al., 1998). Contudo, os polímeros contendo ligação éster e em particular poliésteres alifáticos são bastante atrativos para aplicações na área médica, devido às suas características de biodegradabilidade e versatilidade em propriedades físicas, químicas e biológicas (Li et al., 1995). A biodegradação de poliésteres alifáticos pode ser influenciada pela composição química, peso molecular, polidispersão, mecanismo de hidrólise, porosidade, permeabilidade à água e a solubilidade do polímero (Anderson et al., 1997)

1.4. Encapsulamento de heparina em nanopartículas

Existem vários estudos de 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). Estes estudos demonstraram bons resultados em relação ao diâmetro, eficiência de encapsulação e atividade anti-Xa *in vitro* e em modelo animal (Hoffart et al., 2002; Hoffart et al., 2005; Jiao et al., 2002) (Vide Tabela 2).

Esses estudos demonstraram que é possível a produção de nanopartículas com HBPM, com o método de dupla emulsão a/o/a com solvente orgânico, sem a perda da atividade biológica do fármaco. Um dado relevante foi a absorção oral de heparina encapsulada em nanoparticulas poliméricas, mesmo em baixas dosagens, o que sinaliza para possibilidade de aplicação na prática clínica em humanos.

No Brasil, apesar da nanotecnologia já estar sendo aplicada em diversas áreas, nenhum estudo empreendeu o desenvolvimento dessa tecnologia para produção de nanopartículas com heparina, fato que motivou esta pesquisa na Unicamp.

Tabela 2: Comparação dos estudos publicados sobre nanopartículas de heparina.

Autores	Polímeros	Diâmetro (nm)	Eficiência de Encapsulação (%)	Conclusão
Hoffart et al., 2002 "*in vitro*"	PCL e PLGA +RS e RL	240-490	PCL – 16±2,6 PLGA – 10,6±3,3 RS – 37,9±3,1 RL – 56±2,3 RS/PCL – 31±2,3 RS/PLGA – 23,3±4 RS/RL/PLGA – 24,9±2,5	Nanopartículas representam um bom veículo para administração oral de heparina.
Hoffart et al., 2005 "*in vivo*" modelo animal	PCL + RS	408	RS/PCL – 31±2,3	Nanopartículas de heparina apresentam eficácia oral, com efeito anticoagulante prolongado.
Jiao et al, 2002 "*in vivo*" modelo animal	PCL e PLGA + RS e RL	260 – 300	RS – 59±16 PLGA – 14±4 PCL – 8±1 RL – 97±2 RL/PCL – 53±2 RS/RL/PLGA 38±1 RS/PLGA 36±2	Aumento significante na atividade anti-fator Xa e TTPA após administração oral, em coelhos.

1.5. Uso de nanopartículas com heparina em modelo animal de TVP

Até o momento os estudos realizados com nanopartículas com heparina apenas avaliaram seu efeito hemostático, através da medida da atividade anti-Xa, em modelo animal normal. Assim, um próximo passo para análise da ação das nanopartículas com heparina, é a avaliação de sua atividade antitrombótica, em modelo animal de TVP. O emprego de modelo animal de TVP pode possibilitar a análise de parâmetros que não são exeqüíveis em humanos, como a avaliação do tamanho e peso do trombo venoso logo após a oclusão do vaso.

A indução de TVP por estase venosa, após a ligadura da veia cava é um modelo bem estabelecido na literatura, particularmente para avaliação da ação da heparina (Carelli et al., 2005). Assim, esse modelo foi o eleito na parte experimental deste estudo.

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Sintetizar nanopartículas à base de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis;

2. Encapsular heparina de baixo peso molecular em nanopartículas;

3. Analisar *in vitro* as nanopartículas com heparina, caracterizando a eficiência de encapsulação, diâmetro, morfologia e liberação do fármaco;

4. Padronizar o modelo *in vivo* de TVP induzida por estase em ratos;

5. Avaliar *in vivo* a ação anticoagulante das nanopartículas com heparina, em ratos normais;

6. Avaliar *in vivo* a ação antitrombótica das nanopartículas com heparina, usando modelo de TVP induzida por estase em ratos.

3 - METODOLOGIA

3.1. Preparação das nanopartículas com heparina

A produção de nanopartículas com heparina foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Prof. Dr. Nelson Durán do Instituto de Química da Unicamp, com a colaboração da Dra. Priscyla D. Marcato.

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

A nanopartícula foi preparada com polímero biodegradável PCL poli(ε-caprolactona) (Aldrich). A preparação da nanopartícula com heparina foi realizada pela técnica de dupla emulsão descrita por Meng et al. (2003). A solução de heparina aquosa com 50 µL (500 UI) de heparina de baixo peso molecular (Clexane 60 mg/ 0,6 mL, 6000UI), 1 mL de água deionizada e 0,5% de PVA (polivinil-álcool) foi primeiramente emulsificada com a fase orgânica contendo 10 mL de acetato de etila e 60 mg de PCL por agitação mecânica durante 1 minuto a 6000 rpm, formando uma emulsão água/óleo. Posteriormente, esta emulsão foi transferida em um recipiente contendo 60 ml de água deionizada, 1% de PVA (0,6 g) e 0,9% de NaCl (0,54 g) e homogeneizada rapidamente em agitação mecânica por 1,5 minutos a 10000 rpm, formando a dupla emulsão (água/óleo/água). Após este período a dupla emulsão foi colocada em um balão de fundo redondo e o solvente evaporado por 30 minutos à temperatura de 28ºC em rotaevaporador. Em seguida as nanopartículas foram centrifugadas, lavadas com água destilada, congeladas em nitrogênio líquido e, secas em um liofilizador LB 3000 TT (Terroni-Fauvel) (Marcato, 2006).

3.2. Caracterização das nanopartículas com heparina

3.2.1. Eficiência de encapsulação

A heparina encapsulada em nanopartícula foi quantificada com o método colorimétrico Azure II descrito por Lam et al. (1976) modificado.

Para a realização da curva de calibração foi preparada uma solução estoque de heparina com a concentração de 20 µl/mL, onde misturou-se 0,05 mL de Clexane (10000 UI/mL) em 25 mL de água deionizada. A partir desta solução diluições sucessivas foram realizadas para obtenção das concentrações: 20 µg/mL, 15 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL e 2,5 µg/mL.

Na preparação da solução de Azure II (0,05 mg/mL, 500UI), foi feito primeiro uma solução 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.

A medida no espectrofotômetro UV-vis foi realizada no comprimento de onda de 500 nm em triplicata. Para esta análise, 500 µL da solução de heparina foi misturada com 4,5 mL da solução Azure II (0,05 mg/mL). Esta mistura foi deixada em repouso por 1 minuto antes da medida da absorbância.

Para a quantificação da eficiência de encapsulamento, o preparado de nanopartículas foi centrifugado em filtro Microcon Ultracel YM-100 (Millipore, corte de massa molar de 1000 g/mol) por 40 minutos a 4000 x g. Alíquotas de 500 µL do material centrifugado foram misturadas com 4,5 mL de solução Azure II (0,01 mg/mL) e deixadas em repouso por 1 minuto. Após este período, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 500 nm em um espectrofotômetro Hitachi (U-2000). A eficiência de encapsulamento (EE) da heparina foi calculada pela seguinte equação (Jiao et al., 2002).

% não encapsulada = ([Heparina] na solução filtrada/[Heparina] inicial) x 100

EE (%) = 100 - % não encasulada

3.2.2. 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 e elétrons retro-espalhados (Rizkalla et al., 2006).

3.2.3. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas

O diâmetro (Z-average) e o potencial zeta do preparado de nanopartículas foram analisados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz. Para isto, 30 µL do preparado foi diluído com 970 µL de água destilada em uma cubeta de acrílico e, em seguida analisado no Zeta Sizer Malvern®. A carga superficial (Potencial Zeta) das nanopartículas foi medida adicionando-se 10 µL do preparado em 990 µL de água destilada

3.2.4. Liofilização das nanopartículas

O método de liofilização foi empregado com o objetivo de obter partículas sólidas que pudessem ser estocadas para uso posterior.

O preparado de nanopartículas foi centrifugado por 30 min a 14000 rpm em temperatura de 4ºC e o sobrenadante foi retirado. A cada 5 mL de suspensão de nanopartículas foi adicionado 0,5 g de maltose (10%) (crioprotetor), e o sistema foi congelado em nitrogênio liquido e seco em um liofilizador LB 3000 TT (Terroni-Fauvel).

Para verificar possíveis alterações no diâmetro após o processo de liofilização, as partículas foram redispersas em água e o seu diâmetro foi medido como descrito anteriormente. Para isto, 0,0300 g do liofilizado foi redisperso em 3 mL de água destilada, e 30 µL desta dispersão foram diluídos com 970 µL de água destilada e, o diâmetro e o Potencial Zeta foram medidos.

3.2.5. Determinação da porcentagem de tensoativo residual (Sahoo e col., 2002).

Este método foi incluído para avaliar a toxicidade residual, que poderia interferir com o uso *in vivo* das nanopartículas.

Inicialmente foram preparadas as soluções:

NaOH (0,5 mol/L), HCl (1 mol/L), H_3BO_3 (0,65 mol/L), KI/I_2 (0,15/0,05 mol/L)

Determinação da porcentagem de tensoativo residual:

Adicionou-se 2 mL de NaOH 0,5 mol/L a 2 mg de partícula de PCL sob banho–maria a 60 ºC por 15 minutos. Depois foi adicionado 1 mL de HCl 1 mol/L (usado para neutralizar a solução). O volume foi completado com água destilada para um balão volumétrico de 5 mL. A esta solução foram adicionados 3 mL de solução de ácido bórico 0,65 mol/L; 0,5 mL de solução de iodeto de potássio/iodo (0,15/0,05 mol/L); 1,5 mL de água destilada. Após um período de reação de 15 minutos, realizou-se a leitura no espectrofotômetro UV-VIS (Equipamento HP8542A) a 680 nm. A concentração de PVA residual foi calculada de acordo com a curva analítica Y= -0,001100406 + 0,03444X.

Para a obtenção da curva analítica foi preparada uma solução mãe (0,0125 g de PVA em 25 mL de água destilada), e por meio da diluição desta solução obtiveram-se concentrações entre 2,5 e 20 µg/mL.

Em seguida foram adicionados em 5 mL das soluções já diluídas, 3 mL de ácido bórico (0,65 mol/L), 0,5 mL de iodeto de potássio/iodo (0,15/0,05 mol/L) e 1,5 mL de água destilada.

As soluções foram deixadas em descanso para que ocorresse a reação completa por 15 minutos, e em seguida foram lidas em espectrofotômetro na absorbância de 680 nm.

3.3. Liberação da heparina *in vitro*

O preparado de nanopartículas com heparina total foi adicionado em 30 mL de tampão fosfato 50 mmol.L-1 (pH 7,4) em tubos Falcon. Os tubos foram mantidos em uma incubadora Orbital (modelo MA 83/A) termostatizados a

36,5±0,1 °C sob agitação de 120 rpm. Em determinados intervalos de tempo, uma alíquota de 500 µl da suspensão foi coletada e centrifugada a 4000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante, separado para análise. O mesmo volume de alíquota retirado foi reposto com tampão fosfato 50 mmol.L-1 (pH 7,4). A heparina liberada foi determinada pelo método colorimétrico Azure II como descrito no item 3.2.1.

A segunda parte do experimento foi feita adicionando-se esterase (25 mg, 50 U/mL) ao preparado de nanopartículas com tampão fosfato. Para compensar a perda da atividade enzimática a 36,5±0,1 °C, foram adicionados 25 mg de esterase a cada 6 horas (Jiao et al., 2002).

3.4. Determinação da atividade anti-Xa *in vivo*

Ratos machos Wistar (250-350 g) provenientes do CEMIB UNICAMP foram divididos em 4 grupos, contendo 6 animais por grupo, de acordo com o fármaco aplicado.

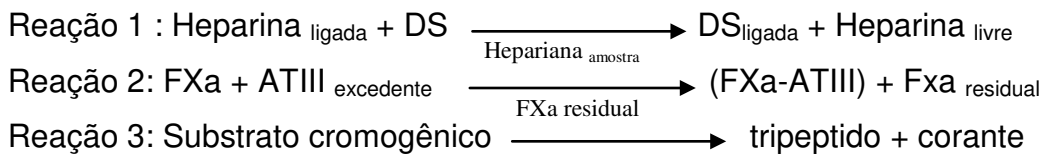
- **Grupo 1:** HBPM 200 UI/kg;
- **Grupo 2:** HBPM 1000 UI/kg;
- **Grupo 3:** Nanopartículas com HBPM 800 UI/kg;
- **Grupo 4:** Nanopartículas com HBPM 1000 UI/kg.

O fármaco foi administrado via subcutânea, e o sangue coletado após 1, 3, 6, 9, 10, 12, 14 e 16 horas (punção caudal), para avaliação da atividade anti-Xa.

- **Princípio do teste:**

O fator Xa é inibido pela antitrombina III (AT III) em uma incubação prévia, sendo ambos os reagentes fornecidos pelo kit. Esta reação é catalizada pela ação anti-Xa da heparina contida na amostra teste. Um terceiro reagente é utilizado, o sulfato de dextran (DS) que libera a heparina ligada aos fatores de interferência contidos no plasma teste, tornando-a acessível para a determinação. A quantidade de fator Xa (FXa) remanescente após a fase de incubação, é determinada por intermédio de um substrato cromogênico, em uma absorbância de 405 nm. Desta forma, quanto maior a absorbância encontrada na reação final,

maior será a quantidade de FXa residual, e conseqüentemente, menor será a concentração de heparina da amostra teste, conforme demonstrado nas reações abaixo.



- **Aparelho: Simens (BCS-XP)**
- **Reagentes:**

- Fator Xa;
- Sulfato de destran (DS);
- AT III;
- Substrato;
- Controle normal e patológico.

Curva de calibração: A curva de calibração foi construída através da intersecção entre os pontos da atividade Anti-Xa (UI/min) no plasma-eixo X, com suas respectivas absorbâncias no eixo Y, conforme tabela abaixo.

Tabela 3 – Curva de calibração da atividade Anti-Xa.

Diluição	Concentração (UI/mL)	Absorbância (mA/min)
	1,5	123,6
1:1,0	1,00	229,3
1:1,3	0,77	266,3
1:2,0	0,50	348,1
1:4,0	0,25	473,7
1:10,0	0,10	561,8
0:1,0	0,00	690,4

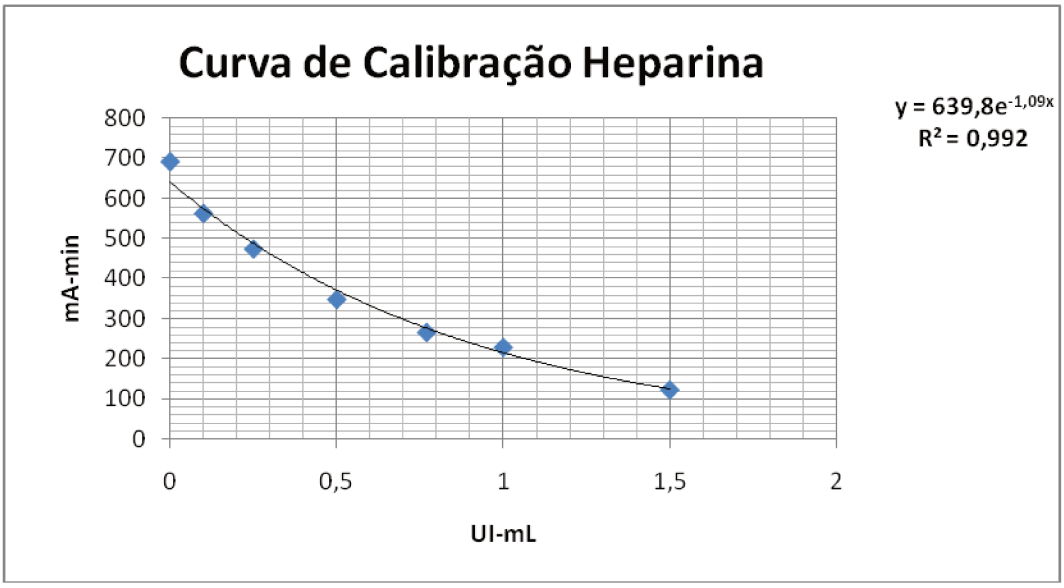


Figura 4: Curva de calibração da atividade anti-Xa.

Procedimento do teste:

Adicionam-se 50 uL da amostra teste, 50 uL de ATIII, 500 uL de FXa. Após mistura e incubação por 1 minuto a 37°C, adicionou-se 100 uL de substrato cromogênico. A determinação da atividade anti-Xa é calculada através da equação:

(absorbância final – absorbância inicial) por minuto.

O limite de detecção de atividade anti-Xa desse método é de 0,05 UI/mL.

3.5. Padronização do método de Indução de TVP por estase em modelo animal

Foram utilizados ratos machos Wistar (250-350 g) provenientes do CEMIB UNICAMP. Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilazina. Para administração do anestésico foi preparada uma solução de 75 mg/kg de Ketamina, 10 mg/kg de Xilazina e 0,75 mL de água deionizada. Desta solução foram aplicadas 0,2 mL para cada 100 g do animal (Flecknell, 1996). O abdômen dos animais foi cirurgicamente aberto e a trombose foi induzida de acordo com o método modificado de Reyers et al. (1980) e Carvalho et al.

(1992). Após incisão abdominal mediana, foi isolada a veia cava inferior, aproximadamente 1,8 cm abaixo da confluência da veia renal esquerda, com pré-nós. A ligadura da veia cava foi feita com fio de seda 4-0. Também foi realizada a ligadura das veias colaterais com o mesmo fio.

Três horas após a indução do trombo, os animais foram reanestesiados e o abdômen reaberto para verificar a presença do trombo. O trombo foi retirado e pesado imediatamente e após secagem em estufa a 37ºC por 24hs foi novamente pesado (Carelli et al., 2005).

3.6. Avaliação *in vivo* através do modelo animal de TVP a ação antitrombótica das nanopartículas com heparina e da heparina livre

Os ratos Wistar, provenientes do CEMIB UNICAMP, pesando entre 250 e 350 g, foram divididos em 3 grupos, contendo 6 animais por grupo, de acordo com o fármaco aplicado.

- **Grupo 1:** Salina;
- **Grupo 2:** Heparina HBPM: 200 UI/kg;
- **Grupo 3:** Nanopartículas com heparina HBPM: 1000 UI/kg;

O fármaco foi administrado via subcutânea, e após 1 hora iniciada a indução da TVP, conforme descrito na padronização do modelo.

3.7. Análise Estatística

Os resultados de eficiência de encapsulação, diâmetro, índice de polidispersidade, potencial zeta e liberação *in vitro*, foram analisados e expressos pela média ± desvio-padrão.

A avaliação da diferença das medianas da atividade anti-Xa e análise da comparação do peso dos trombos entre 2 grupos independentes foram realizados através do teste de Mann Whitney.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p<0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional *R Development Core Team* (2009), versão 2.10.1.

4 – RESULTADOS

4.1. Padronização do método de preparação de nanopartículas com heparina

O método de dupla emulsão (água/óleo/água) e evaporação do solvente foi escolhido em função da solubilidade da heparina. Este método foi padronizado para o encapsulamento de heparina em PCL.

4.2. Eficiência de encapsulação

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

A curva de calibração da heparina foi realizada pelo método colorimétrico Azure II. Inicialmente, foi utilizada uma concentração de Azure II de 0,01 mg/mL, como descrito na literatura (Lam et al., 1976). Entretanto, as curvas de calibração não foram reprodutíveis. Por este motivo utilizou-se a concentração de 0,05 mg/mL de Azure II, obtendo-se a curva demonstrada na Figura 5, cuja equação da reta foi: $Y = 0,00493 + 0,02076X$ e o coeficiente de correlação foi de 0,999.

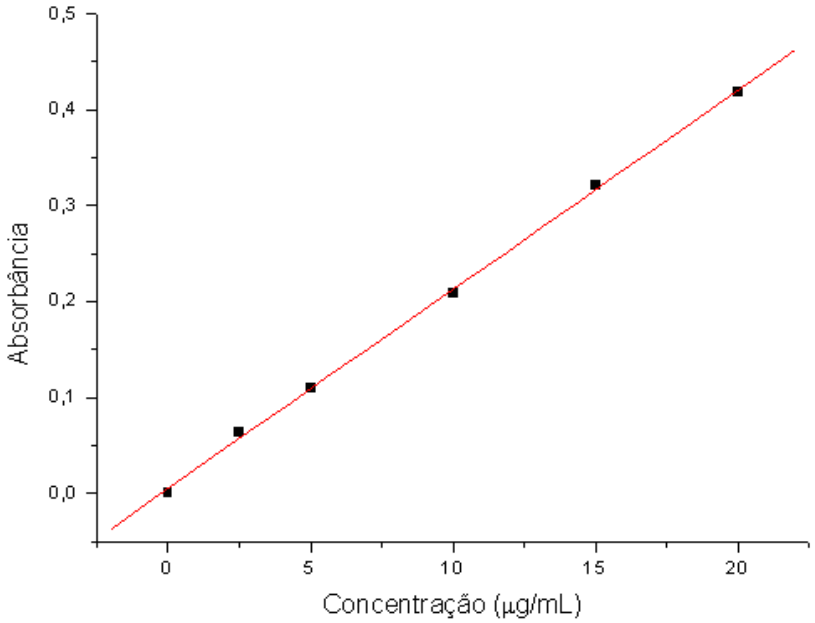


Figura 5: Curva de calibração da heparina obtida pelo método Colorimétrico Azure II.

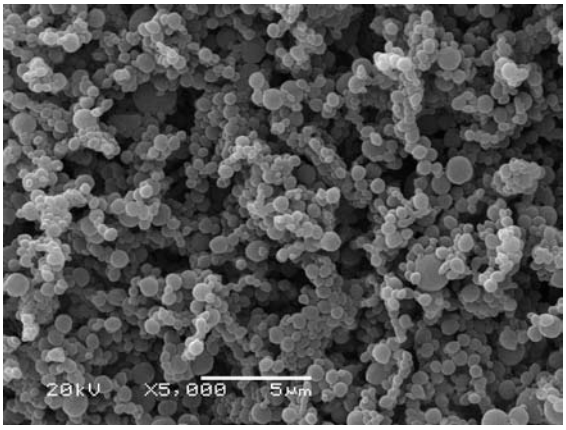
A partir da curva de calibração mostrada na Figura 5 foi calculada a eficiência de encapsulação da heparina nas preparações de nanopartículas. A tabela 4 mostra os resultados da quantificação de heparina nas diferentes preparações de nanopartículas. Nesta tabela pode-se observar que o método foi reprodutível para o encapsulamento de heparina, sendo a média de eficiência de encapsulação igual a 80 ± 2,3%.

Tabela 4: Eficiência de encapsulamento de heparina nas nanopartículas de PCL, em 5 amostras.

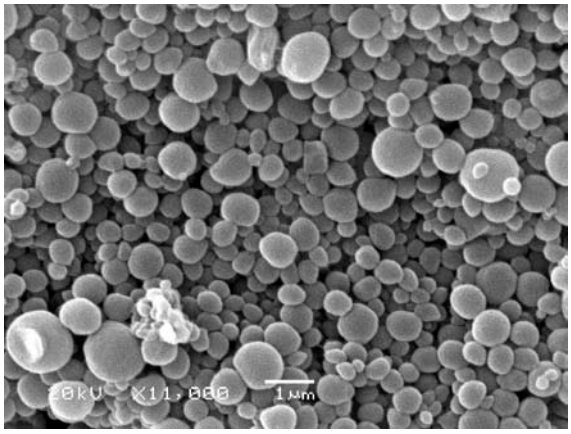
Amostra	Absorbância	Concentração da heparina não encapsulada	% da heparina não encapsulada	% da heparina encapsulada (Eficiência de Encapsulamento)
1	0,168067	78,5 µg/ml	15,7%	84,3%
2	0,107804	49,5 µg/ml	19,8%	80,2%
3	0,222493	104,7 µg/ml	21%	79%
4	0,225569	106,2 µg/ml	21%	79%
5	0,225955	106,4 µg/ml	21%	79%
Média	**0,189977**	**89,0 µg/ml**	**19,7%**	**80%**
Desvio-Padrão	**0,052084**	**25,0**	**2,3**	**2,3**

4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

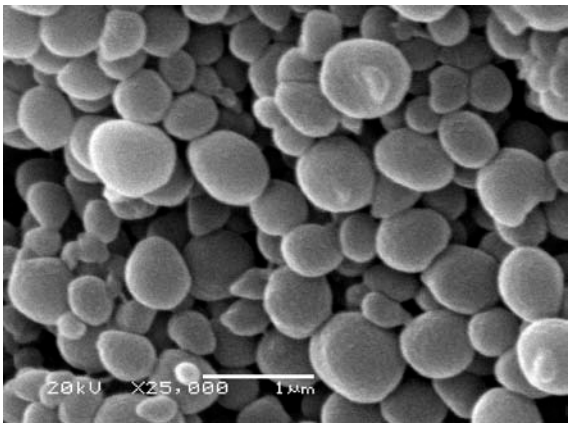
A morfologia das nanopartículas poliméricas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), logo após o preparo. Nesta análise foram observadas partículas esféricas e homogêneas como mostra a Figura 6.



(a)



(b)



(c)

Figura 6: Micrografias de nanopartículas de PCL com heparina (a) X 5000, (b) X 11000 e (c) X 25000.

4.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas de PCL estão mostrados na Tabela 5. O diâmetro médio das nanopartículas foi 269 ± 36 nm com índice de polidispersidade de 0,366 ± 0,022. Esse índice de polidispersidade é considerado como médio e deve-se ao método de dupla emulsão e evaporação de solvente, que pode formar partículas com diferentes diâmetros. A carga superficial das partículas (Potencial Zeta) foi de -1,37 ± 0,24 mV. Esta carga negativa deve-se a presença de heparina, do surfactante e do próprio polímero, que estão presentes na superfície das nanopartículas como descrito por Hoffart et al. (2002).

Tabela 5: Tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas com heparina, em 3 amostras.

Dispersão de Partículas	Índice de Polidispersidade	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)
1	0,364	242,3	-1,41
2	0,345	257,6	-1,12
3	0,389	308,4	-1,6
Média	**0,366**	**269**	**-1,37**
Desvio-Padrão	**0,022**	**36**	**0,24**

4.5. Tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas liofilizadas

Para que as nanopartículas fossem estocadas por longos períodos, estas foram liofilizadas utilizando-se o crioprotetor maltose. Em seguida as mesmas foram ressuspensas em água para verificar alterações no diâmetro das mesmas. Com isso observou-se que o diâmetro das partículas aumentou 26%, com uma redução de 25% no índice de polidispersidade (Tabela 6). Entretanto, quando as partículas foram liofilizadas sem o crioprotetor, estas coalesceram, não sendo possível a sua ressuspensão em água Em relação ao potencial zeta, este aumentou de -1,37 ± 0,24 mV para -10,24 ± 1,93 mV devido a presença do crioprotetor.

Foram testadas as concentrações de maltose de 10% e 20% em preparados de nanopartículas lavadas e sem lavagem previamente. A concentração que proporcionou melhor resultado foi a de 10%, em amostras sem lavagem.

Tabela 6: Diâmetro médio e índice de polidispersidade de nanopartículas liofilizadas com 10% e 20% de Maltose, com e sem lavagem.

Partículas Analisadas no Zetasizer	Diâmetro (nm)	Índice de Polidispersidade
Partículas sem liofilizar	269	0,336
10% Maltose sem lavar	339	0,275
10% Maltose com 2 lavagens	____	____
20% Maltose sem lavar	433	0,386
20% Maltose com 2 lavagens	____	____

Tabela 7: Diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de nanopartículas com heparina sem lavagem e liofilizadas com 10% de maltose, em 3 amostras.

Amostras secas	Índice de polidispersidade	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)
1	0,291	371,3	-12,3
2	0,288	301,0	-8,46
3	0,248	347,3	-9,96
Média	**0,275**	**339,8**	**-10,24**
Desvio-Padrão	**0,024**	**35**	**1,93**

4.6. Determinação da porcentagem de tensoativo residual (Sahoo e cols., 2002).

O estabilizante poli (vinil-álcool) utilizado neste estudo apesar de ser um excelente estabilizador de nanopartículas, pode apresentar toxicidade dependendo da sua concentração (Youan e col. 2003). Em função disto, as partículas foram lavadas e o PVA residual foi quantificado após as lavagens (Wang e col. 2005). A construção da curva analítica para determinar a porcentagem de tensoativo residual foi feita de acordo com o item 3.2.4 (Figura 7). A curva realizada em triplicata e o coeficiente de correlação em todos os casos foi de 0,991. A equação da reta foi Y = 0,00196 + 0,0116X.

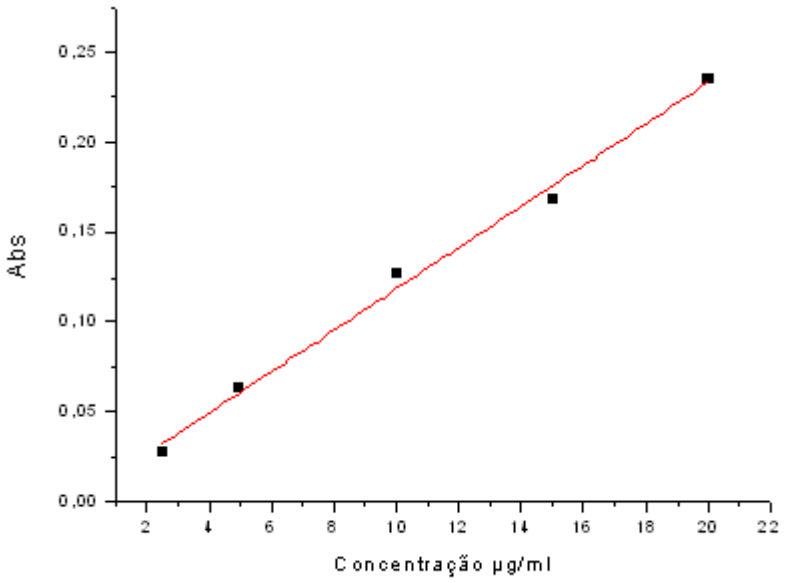


Figura 7: Curva de Calibração de PVA.

A Tabela 8 mostra os resultados da quantificação do PVA nas preparações de nanopartículas. Nesta tabela pode-se observar que as preparações apresentaram PVA residual, e não houve grande diferença das nanopartículas lavadas e sem lavagem demonstrando que não há necessidade da realização do processo de lavagem.

Tabela 8: Quantidade de tensoativo residual nas nanopartículas lavadas e não lavadas.

Amostras	Absorbância	Concentração (µg)	Porcentagem
Partículas sem lavar	1,02040	87,79 µg PVA em 2000 µg partículas	4,4%
Partículas lavadas 1X	0,72356	62,20 µg PVA em 2000 µg partículas	3,11%

4.7. Liberação da heparina *in vitro*

A figura 8 mostra o perfil de liberação da heparina encapsulada *in vitro* em nanopartículas de PCL em tampão fosfato (pH 7,4) a 36°C. Nesta figura

observa-se uma liberação lenta da heparina sendo que 4 ± 1,8% foi liberada em 24 horas. Quando a enzima esterase foi adicionada no meio de liberação, ocorreu um pico de liberação em 1 hora de 10 ± 1,9%, mantendo-se essa liberação sustentada por 24 horas.

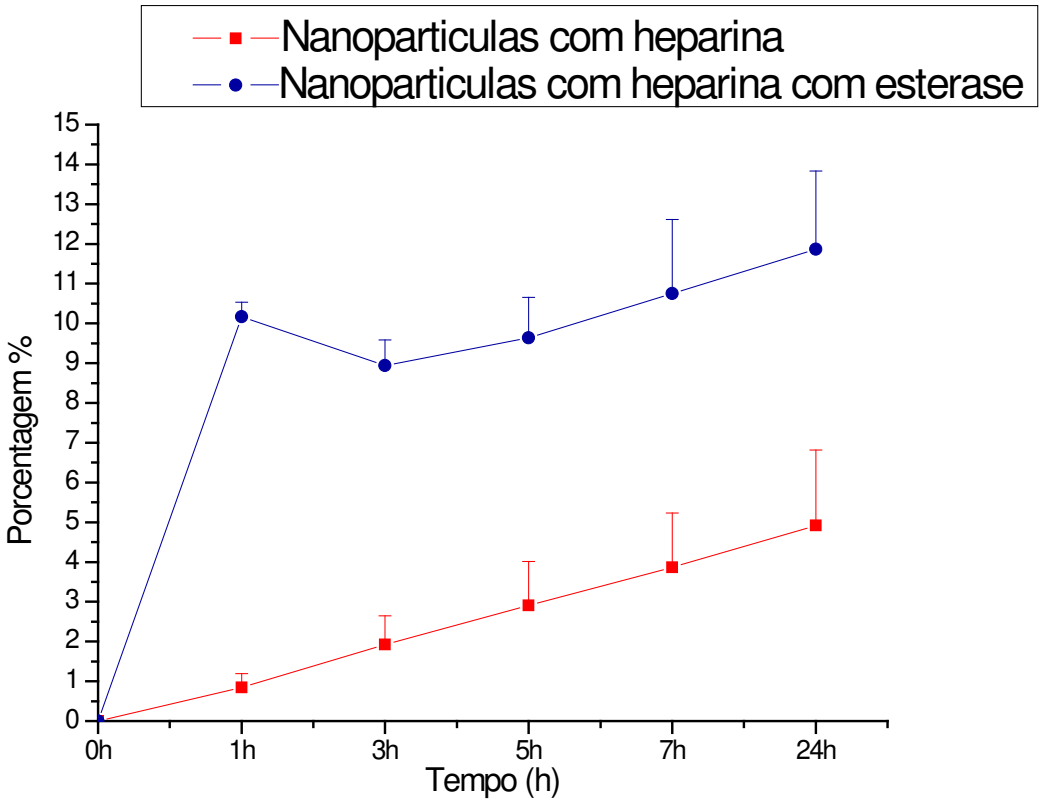


Figura 8: Liberação de heparina encapsulada em nanopartículas de PCL em tampão fosfato pH (7,4) com e sem enzima esterase.

4.8. Determinação da atividade anti-Xa *in vivo*

As nanopartículas com heparina liofilizadas e não liofilizadas foram administradas por gavagem na dose de administração de 1000 UI/Kg, e não foi observada atividade anti-Xa em nenhuma das amostras coletadas nos diversos tempos (1 a 14 horas). As nanopartículas com heparina liofilizadas também foram aplicadas por via subcutânea, e nenhuma atividade anti-Xa foi observada, nos diversos tempos de coleta de sangue.

Diante disso, apenas continuamos os estudos, analisando a ação *in vivo* das nanopartículas com heparina não liofilizadas, por via subcutânea.

A comparação entre a atividade anti-Xa plasmática após a aplicação subcutânea de nanopartículas com heparina não liofilizadas e heparina livre, em diferentes doses está demonstrado nas figuras 9 e 10.

A figura 9 demonstra a comparação entre as 2 formulações de heparina, na dose de 1000 UI/kg. Observou-se que após 1 hora da injeção de heparina livre houve um pico de atividade anti-Xa plasmático estatisticamente significativo ($P<0,001$), que desapareceu após 9 horas. Após 9 horas, a atividade plasmática anti-Xa com o uso de nanopartículas com heparina foi estatisticamente superior ao obtido com heparina livre ($P<0,001$) em todos os tempos analisados. As nanopartículas com heparina mostraram uma atividade anti-Xa até 12 horas após a injeção subcutânea, entretanto com valores abaixo dos verificados com a heparina livre.

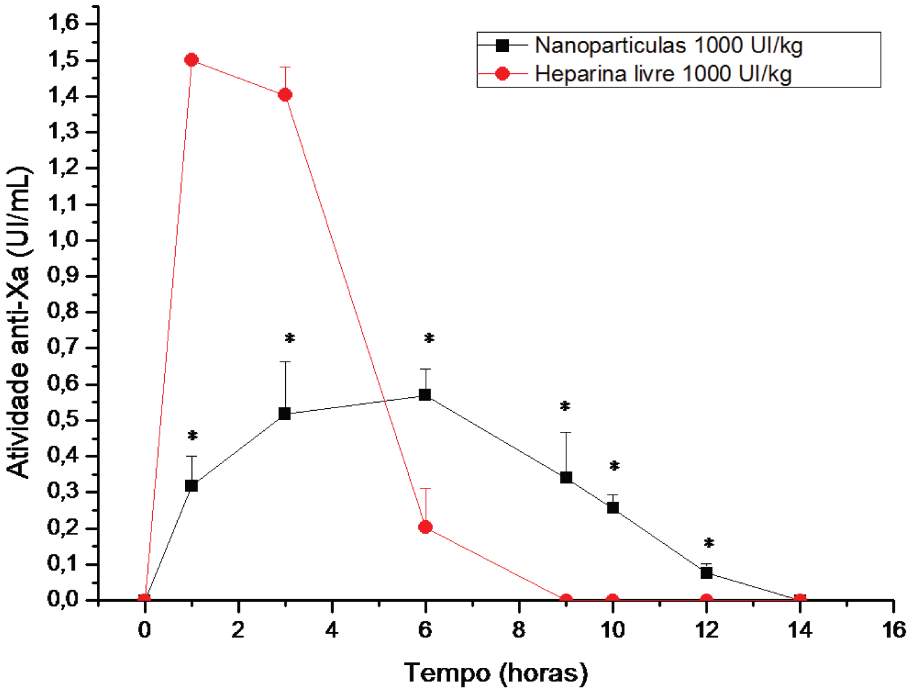


Figura 9: Atividade Anti-Xa após administração subcutânea de nanopartículas de PCL com HBPM 1000 UI/kg (■), e HBPM 1000 UI/kg (●). Média obtida através do número de 6 ratos. Em todos os tempos observou-se uma diferença estatisticamente significativa, com P<0,001 (*).

A figura 10 demonstra a comparação entre a aplicação subcutânea de heparina livre na dose de 200 UI/kg, e de nanopartículas com heparina nas doses de 800 UI/kg e 1000 UI/kg. Observou-se que após 1 hora da injeção de heparina livre houve um pico de atividade anti-Xa plasmático, estatisticamente significativa em relação às nanopartículas de heparina nas 2 doses avaliadas (P<0,005). Após 3 horas houve uma diminuição estatisticamente significativa da atividade anti-Xa com a heparina livre, em comparação a heparina encapsulada em ambas as doses (P=0,002). Com 6 horas observou-se o desaparecimento da atividade anti-Xa, com o uso da heparina livre, estatisticamente significativo em relação ao observado com a heparina encapsulada (P=0,001). A comparação entre as atividades anti-Xa obtidas com as nanopartículas com heparina mostraram um

pico de atividade anti-Xa após 3 horas da injeção subcutânea, mas com diferença estatisticamente significativa apenas após 6 horas (P=0,03). A atividade anti-Xa com as heparinas encapsuladas nas doses de administração de 800 e 1000 UI/kg mantiveram-se por até 10 e 14 horas, respectivamente. No tempo de 10 horas houve o desaparecimento da atividade anti-Xa com a heparina encapsulada na dose de administração de 800 UI/Kg.

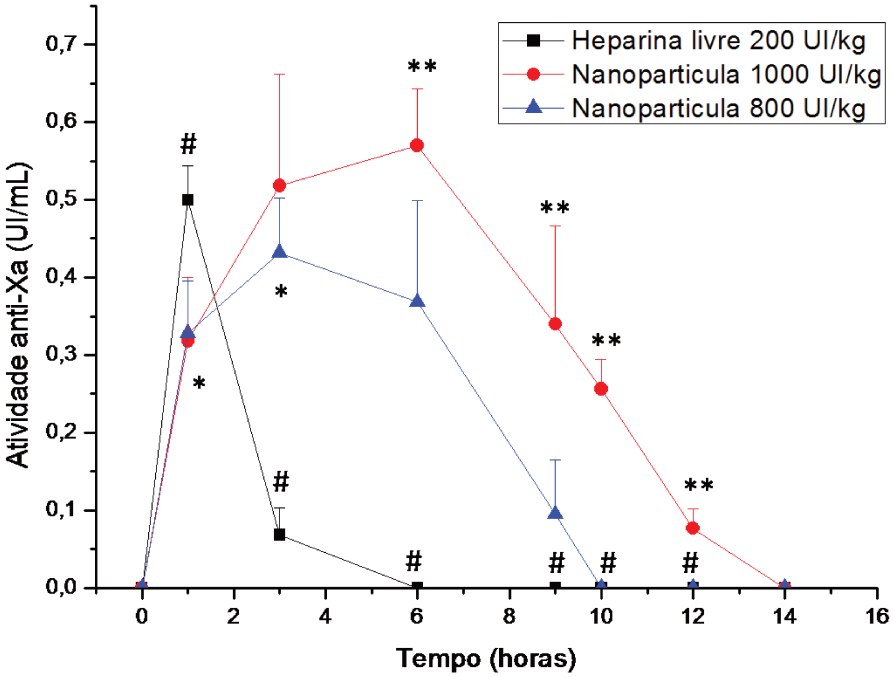


Figura 10: Atividade anti-Xa até 14 horas após a administração subcutânea de HBPM 200 UI/kg(■), nanopartículas de PCL com HBPM 1000 UI/kg (●), e nanopartículas de PCL com HBPM 800 UI/kg(▲). (Média obtida através do número de 6 ratos. (#) P<0,005 Comparação heparina livre e heparina encapsulada, (*) P>0,05 Comparação heparina encapsulada 800 UI/kg e 1000 UI/kg, (**) P<0,05 Comparação heparina encapsulada 800 UI/kg e 1000 UI/kg.

4.9. Modelo de trombose venosa em ratos pelo método de estase

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

Foi utilizado no experimento um microscópio óptico, fundamental para esta técnica, porque é necessário isolar a veia cava inferior, sem que a mesma seja perfurada.

As figuras 11 a 15 mostram todas as etapas para indução da trombose, e retirada do trombo, após 3 horas da ligadura da veia cava inferior.

A figura 11 mostra o abdômen aberto e o isolamento com pré-nós de ~ 1,8 cm da veia cava inferior, abaixo da confluência da veia renal esquerda.

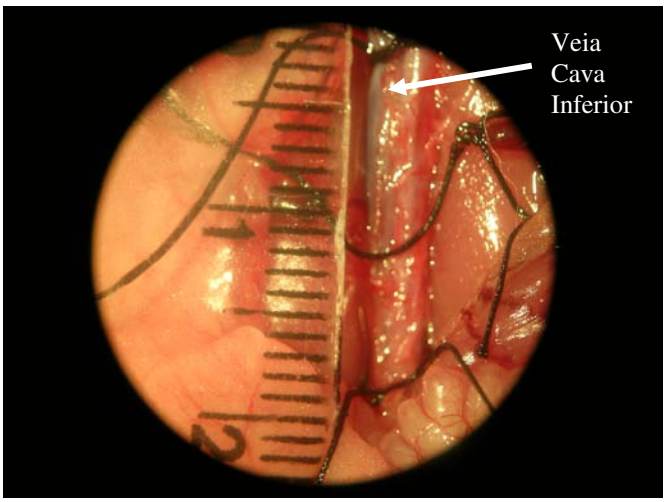


Figura 11: Isolamento de ~1,8cm da veia cava inferior com pré-nó.

A figura 12 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 13 demonstra a ligadura da veia cava inferior com fio de seda 4-0.

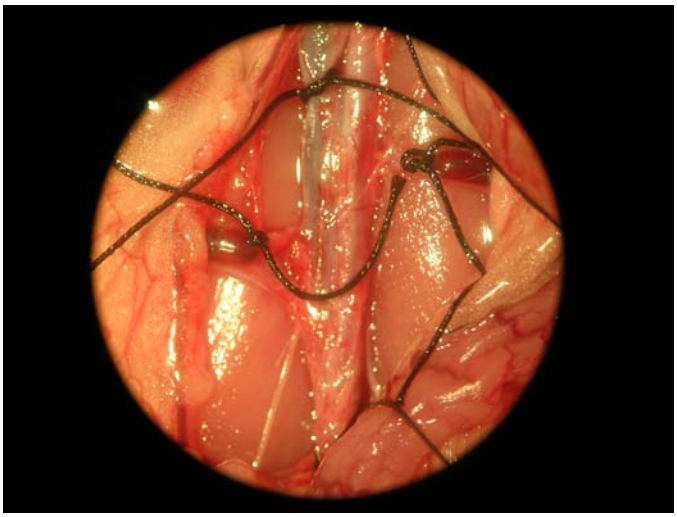


Figura 12: Ligadura das veias colaterais.

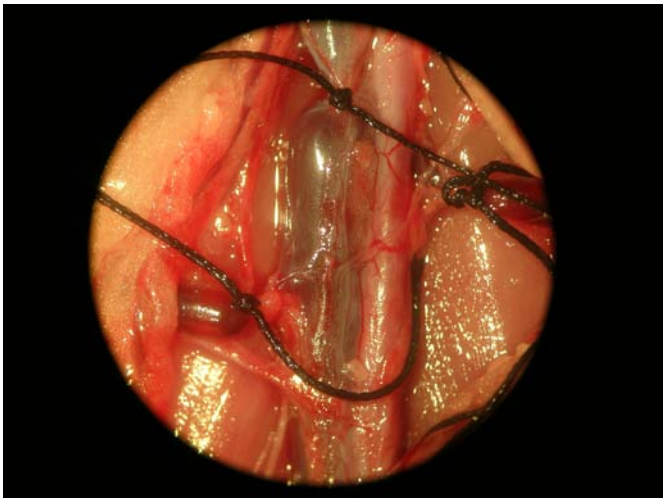


Figura 13: Ligadura na veia cava inferior com fio de seda 4-0.

A figura 14 mostra o abdômen reaberto após 3 horas, com aperto dos pré-nós, 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.

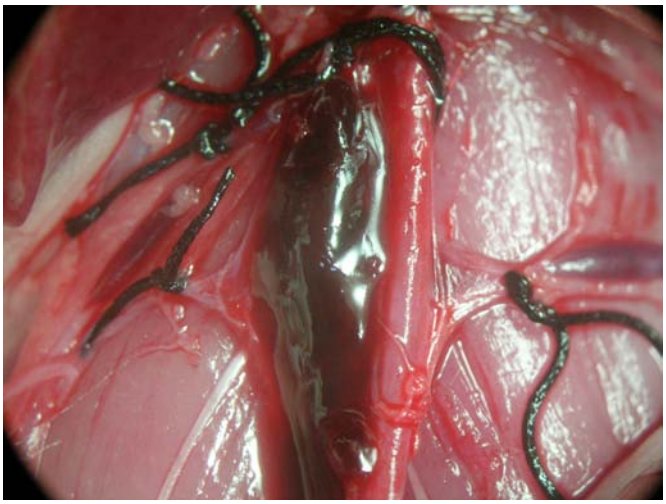


Figura 14: Após 3 horas, o animal foi reaberto, os pré-nós foram apertados e a parede da veia cava inferior foi cortada longitudinalmente para retirada do trombo.

A figura 15 mostra a retirada do trombo formado, para pesagem e secagem posterior.

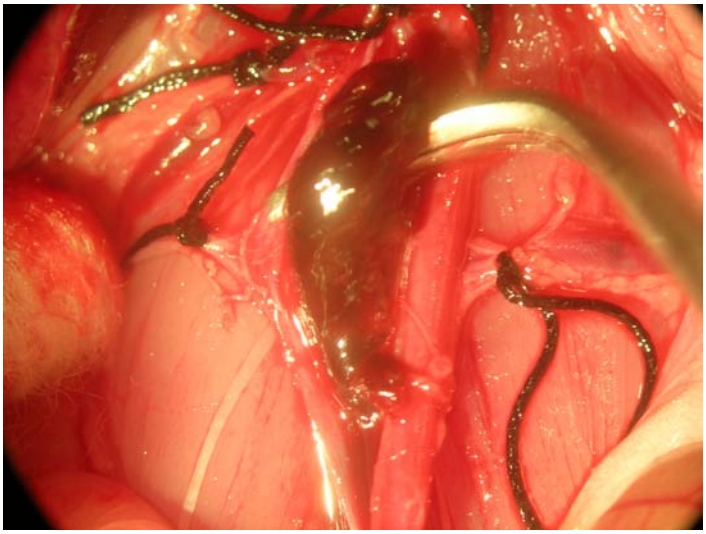


Figura 15: Retirada do trombo.

A tabela 9 mostra a média, desvio padrão e o peso individual em gramas dos trombos obtidos pelo método de estase. A média dos pesos dos trombos foi de 0,0308g. Não se observou correlação entre o peso dos ratos e o peso do trombo formado.

Tabela 9: Peso do trombo venoso em 4 ratos.

	Peso do rato (g)	Idade (semanas)	Peso trombo (g)
1	260	10	0,0342 g
2	275	12	0,0244 g
3	330	10	0,0234 g
4	303	10	0,0412 g
Média	**292**	**10**	**0,0308 g**
Desvio-Padrão	**40**	**1**	**0,008474**

4.10. Avaliação *in vivo* da atividade antitrombótica da heparina livre e encapsulada em nanopartículas de PCL no modelo animal de TVP

Os ratos Wistar, provenientes do CEMIB UNICAMP, pesando entre 250 e 350 g, foram divididos em 3 grupos, contendo 6 animais por grupo, de acordo com o fármaco aplicado.

- **Grupo 1:** Salina;
- **Grupo 2:** Heparina HBPM: 200 UI/kg;
- **Grupo 3:** Nanopartículas com heparina HBPM: 1000 UI/kg;

O fármaco foi administrado via subcutânea, e após 1 hora iniciada a indução da TVP, conforme descrito anteriormente.

Não houve diferença no peso dos ratos utilizados em cada um dos grupos, com médias de 259,38 g, 273,33 g e 258,33 g respectivamente.

A mediana e média dos pesos dos trombos logo após a retirada e após secagem, nos 3 grupos analisados estão apresentados no anexo 1.

A atividade antitrombótica, avaliada pelo peso do trombo logo após a retirada, foi significativamente maior nos animais tratados com heparina (P=0.00403) ou com nanopartículas com heparina (P=0.00095), em relação ao grupo controle. Além disso, a ação antitrombótica foi significativamente maior quando os animais receberam as nanopartículas com heparina, em comparação aos que foram tratados com heparina livre (P=0.00183). Na realidade, o uso das nanopartículas com heparina praticamente preveniu a formação do trombo venoso (Tabela 10).

Tabela 10: Média do peso dos trombos logo após a retirada.

	Animais (n)	**Média Peso trombo (g)**	**P Controle *versus* heparina livre / nanopartículas**	**P Heparina livre *versus* nanopartículas**
Controle	8	0,01720	-	-
Heparina 200 UI/kg	6	0,00287	0,00403	0,00183
Nanopartículas heparina 1000 UI/kg	6	0,00003	0,00095	

A atividade antitrombótica, avaliada pelo peso do trombo seco, também foi significativamente maior nos animais tratados com heparina (P=0,00703) ou com nanopartículas com heparina (P=0,00096), em relação ao grupo controle. Além disso, a ação antitrombótica foi significativamente maior quando os animais receberam as nanopartículas com heparina, em comparação aos que foram tratados com heparina livre (P=0,00183) confirmando os resultados obtidos através do peso do trombo logo após a retirada (Tabela 11).

Tabela 11: Média do peso dos trombos secos.

	Animais (n)	**Média Peso trombo (g)**	**P Controle *versus* heparina livre / nanopartículas**	**P Heparina livre *versus* nanopartículas**
Controle	8	0,00485	-	-
Heparina 200 UI/kg	6	0,00118	0,00703	0,00183
Nanopartículas heparina 1000 UI/kg	6	0,00001	0,00096	

A figuras 16 e 17 ilustram graficamente os resultados apresentados nas tabelas 10 e 11.

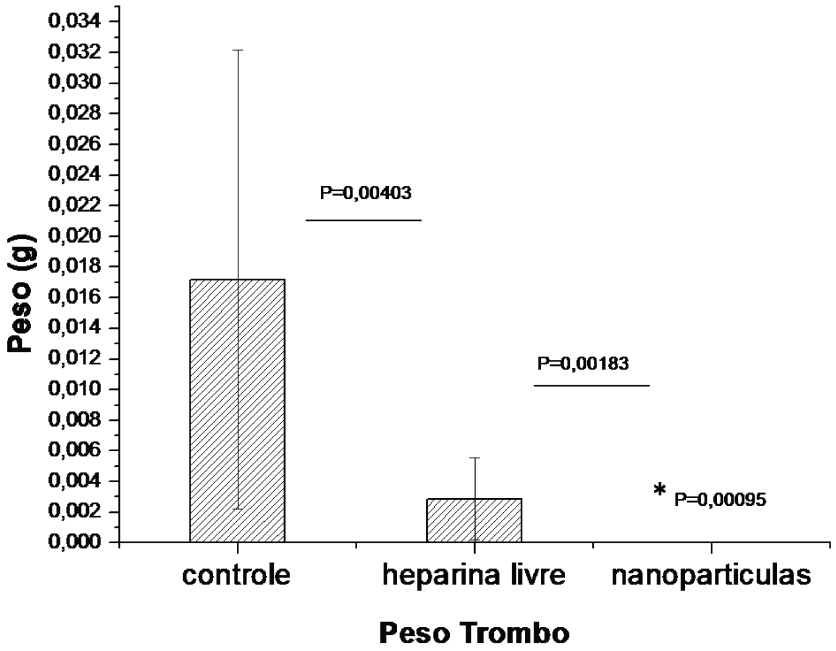


Figura 16: Média e desvio-padrão do peso do trombo. * Controle *versus* nanopartículas.

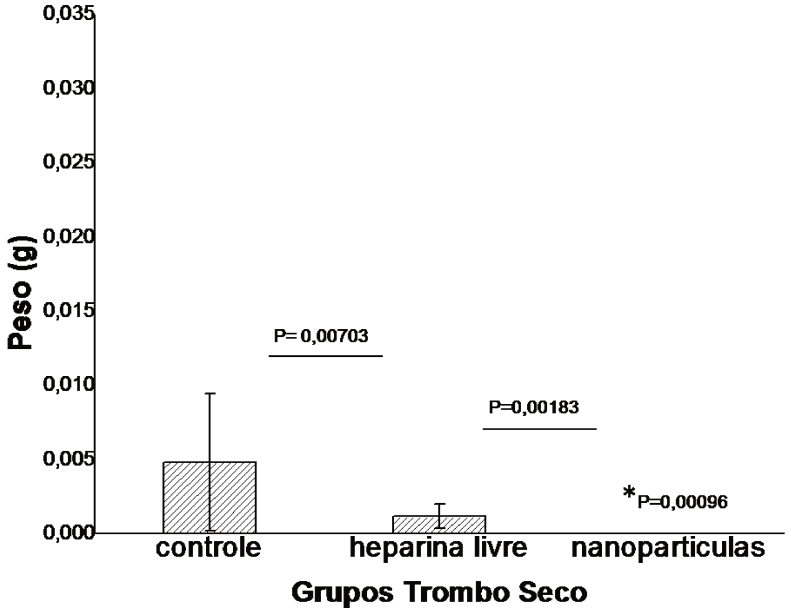


Figura 17: Média e desvio-padrão do peso do trombo seco. P<0,05. * Controle *versus* nanopartículas.

5 – DISCUSSÃO

5.1. Produção de nanopartículas com heparina

A heparina é o anticoagulante de escolha para prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso. Contudo, a heparina não fracionada apresenta limitações biológicas e farmacocinéticas, que levaram ao desenvolvimento da heparina fracionada, também denominada de heparina de baixo peso molecular. Estas são derivadas da heparina não fracionada por despolimerização química ou enzimática. Entre as grandes vantagens da heparina fracionada é 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).

Contudo, ambas as formas de heparina apenas são eficazes quando administradas por via parenteral, não representando a forma mais adequada de tratamento, tanto em relação ao conforto do paciente como para sua adesão ao uso do medicamento. Particularmente, em algumas situações clínicas é necessária a internação do paciente, ou o tratamento por períodos prolongados.

No passado, inúmeras tentativas foram empregadas na produção de fórmulas com heparina que pudessem ser utilizadas por via oral, como sais de lisina, bases orgânicas hidrofóbicas, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), emulsões oleosas e lipossomos, mas todas sem sucesso, devido à baixa biodisponibilidade, ao risco relacionado aos agentes tóxicos adjuvantes e à instabilidade da formulação (Morton et al., 1981) (Dal Pozzo et al., 1989) (Tidball et al., 1962) (Guarini et al., 1985) (Ueno et al., 1982).

Outras fórmulas de administração oral de heparina foram testadas, como o uso de microesferas protéicas, que mostraram um aumento do TTPa em modelo animal de rato (Leone-Bay et al., 1998).

Muitas tentativas para melhorar a absorção oral da heparina estão sendo feitas através do uso de adjuvantes, complexos com diamida e surfactantes, e o melhor agente utilizado até o momento parece ser uma substância denominada N-(8-(2- hidroxibenzoil)amino)caprilato (SNAC). Uma série de estudos demonstra que heparina-SNAC administrada por via oral aumenta o TTPa e os níveis de anti-fator Xa. Recentemente estudos demonstraram que a adição do SNAC facilita a absorção de heparina através do trato gastrointestinal

em doses adequadas para prevenção e tratamento de desordens tromboembólicas (Arbit et al., 2006).

Recentemente, nanopartículas poliméricas de PCL/PLGA e polímeros não biodegradáveis com carga positiva, contendo heparina não fracionada foram administrados por via oral em coelhos, na dose de 600 UI/Kg, levando a uma atividade anti-Xa plasmática de 0,16 UI/mL, com uma biodisponibilidade de 23% (Jiao et al, 2002).

A ação anticoagulante da heparina administrada por via oral depende de sua liberação das nanopartículas após a absorção, protegida da ação proteolítica das enzimas do trato gastrointestinal. Partículas com diâmetro inferior a 10 μm podem ser absorvidas através da parede intestinal, e 3 mecanismos podem estar envolvidos no processo de absorção: via paracelular; transporte intracelular pelas células epiteliais da mucosa gástrica e via linfática.

As nanopartículas apresentam carga negativa, assim como a heparina intacta, não favorecendo sua absorção, pois a mucosa gastrointestinal tem carga negativa. Assim, este é outro obstáculo a ser transposto para o sucesso da terapêutica.

Neste estudo, nosso primeiro objetivo foi a produção de nanopartículas e o encapsulamento da heparina. Optamos pelo emprego da heparina de baixo peso molecular, pelas vantagens em relação a heparina não fracionada, como tempo de ação e menores efeitos colaterais.

Uma dificuldade importante no encapsulamento da heparina é 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 encapsulação (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 heparina encapsulada. Apesar disso e do reduzido tamanho da heparina de baixo peso molecular, nossos resultados mostraram uma eficiência de encapsulamento de 80%, favorecendo o emprego do polímero PCL apesar da sua hidrofobicidade.

Se por um lado, obtivemos uma eficiência de encapsulamento de 80%, as nanopartículas mostraram carga negativa, e isto deve ser decorrente da presença de heparina, surfactante e polímero presentes na superfície das mesmas (Hoffart et al.,2002). Esta carga negativa aumenta a estabilidade das partículas minimizando o processo de aglomeração, mas é um fator limitante para a absorção via oral.

O método de dupla emulsão e evaporação de solvente empregado neste estudo permitiu a obtenção de nanopartículas esféricas, homogêneas, de pequeno diâmetro (269 nm), não aglomeradas. Estas são propriedades importantes quanto à qualidade das nanopartículas produzidas. O tamanho das nanopartículas tem relevância quanto à farmacocinética, visto que quanto menor o diâmetro da partícula melhor é a absorção pela parede da mucosa intestinal.

Com o intuito de aumentar a estabilidade das partículas, estas foram liofilizadas. A liofilização pode ser um método adequado para a estocagem das nanopartículas, mas esse processo pode comprometer o produto final por alterar suas propriedades morfológicas e funcionais. Nossos resultados mostraram que a liofilização praticamente destruiu o material produzido, com a completa coalescência das partículas. Além disso, a liofilização levou a um aumento da carga negativa, o que pode comprometer ainda mais a absorção das nanopartículas pela via oral.

Infelizmente, além das alterações morfológicas, a análise *in vivo* mostrou que a liofilização comprometeu a atividade das nanopartículas. Esse é um dado relevante, que necessitará de outros estudos, pois a estocagem de nanopartículas com heparina com atividade biológica é importante para que seja viabilizado o seu emprego, na indústria farmacêutica.

Nossos resultados, empregando a maltose como crioprotetor no processo de liofilização das nanopartículas com heparina, permitiram a obtenção de um produto adequado morfologicamente, mas sem atividade biológica. Isto demonstra que teremos que realizar outros estudos, empregando outros materiais ou outras técnicas, que contemplem a obtenção de nanopartículas com heparina liofilizadas biologicamente ativas.

O PVA foi o estabilizador empregado, e nossos resultados mostraram mais um obstáculo a ser resolvido, uma vez que o mesmo permaneceu ligado às nanopartículas. O valor de LD50 (dose letal) do PVA via oral em ratos, é relativamente alto: 14,7 g/kg (Youan e col. 2003). Procedemos com inúmeras lavagens das nanopartículas com o intuito de retirar o PVA das mesmas. A concentração de PVA em 2000 µg de nanopartículas lavadas e não lavadas foi de 62,20 µg e 87,79 µg, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que a lavagem não é um fator muito relevante, pois independente do número de lavagens, uma monocamada de PVA permaneceu nas nanopartículas devido à ligação irreversível do mesmo com a camada de polímero na interface (Lee e cols., 1999). Como a quantidade de PVA presente na formulação está muito abaixo da LD50, este não seria um fator que inviabilizaria a sua aplicação. Contudo, caso em estudos posteriores optemos pela exclusão do PVA das nanopartículas, teremos que ter um método adequado para sua retirada ou mesmo usarmos outro estabilizador. Vale a pena ressaltar que o PVA é biodegradável, e que em não se atingindo a LD50, o mesmo seria eliminado do organismo, sem maiores riscos.

5.2. Avaliação da liberação *in vitro* da heparina encapsulada

No estudo *in vitro*, de quantificação de heparina pelo método de Azure II, observou-se uma liberação sustentada por 24 horas, tanto com as nanopartículas com heparina sem enzima, como com o emprego da enzima esterase.

Os nossos resultados demonstraram claramente que o uso da esterase levou a um aumento importante da liberação de heparina após 1 hora, e que apesar do aumento ter uma menor velocidade ao longo de 24 horas, foi superior ao verificado na ausência da enzima. Este aumento da velocidade de liberação se deve à degradação das partículas pela enzima, acelerando o seu processo de biodegradação similar ao que ocorre com estas partículas no organismo humano. Talvez *in vivo*, esta liberação seja ainda maior que a obtida com a esterase *in*

vitro, devido à presença de diferentes enzimas no corpo humano, sendo um ponto a ser considerado na prática.

A lentidão na liberação de heparina entre a primeira e a 24 horas deve ser decorrente das características hidrofóbicas do polímero PCL e de sua alta cristalinidade.

5.3. Avaliação da atividade anticoagulante *in vivo* das nanopartículas com heparina

Inicialmente a proposta do nosso estudo era a produção de nanopartículas com heparina para administração por via oral. Contudo, por não termos nenhuma experiência na produção de nanopartículas com heparina, e o Laboratório de Pesquisa do Instituto de Química da Unicamp já ter produzido outras nanopartículas com PCL (Marcato et al., 2010, Melo et al., 2009, Durán et al., 2007), optamos pela sua utilização, mesmo tendo conhecimento que o mesmo apresenta carga negativa, um fator limitante para a absorção oral.

A via oral na prática clínica é muito interessante, e seria necessária a adição de um polímero de natureza policatiônica para aumentar a superfície de adesão das nanopartículas na parede do trato gastrointestinal, e conseqüentemente obter uma absorção adequada do fármaco. Este é um passo que será desenvolvido em um próximo estudo pelo nosso grupo de pesquisadores.

Para avaliação da atividade anticoagulante *in vivo* das nanopartículas com heparina produzidas neste estudo optamos pela administração por via subcutânea. A ação anticoagulante *in vivo* foi avaliada pela determinação da atividade anti-Xa.

Inicialmente testamos a administração de nanopartículas com heparina liofilizadas, mas não obtivemos sucesso, demonstrando que a liofilização destruiu a atividade anti-Xa. Esses resultados confirmaram que paralelo às alterações morfológicas houve alteração dos testes *in vivo.*

O resultado obtido com a aplicação das nanopartículas com heparina não liofilizadas por via subcutânea demonstrou que na mesma dose, há uma ação

maior e mais rápida da heparina livre em relação à encapsulada, pois o pico de atividade anti-Xa foi mais elevado em uma hora (P<0,001) com o primeiro fármaco. Contudo, houve uma ação mais prolongada com o uso da heparina encapsulada, um dado importante a ser analisado em estudos futuros, visto que os medicamentos que necessitam de menor número de doses são muito interessantes na prática clínica.

Os resultados obtidos com a heparina livre na dose de 200 UI/kg mostraram uma atividade anti-Xa significativamente menor quando comparada à dose de 1000 UI/Kg de heparina encapsulada. Esses resultados eram esperados, visto que se utilizou uma dose de heparina 5 vezes maior com as nanopartículas. Após 6 horas houve o desaparecimento da atividade anti-Xa com o uso da heparina livre, enquanto que a mesma permaneceu por 12 horas com o emprego da heparina encapsulada. Estes dados sugerem que as nanopartículas podem permitir que a heparina seja liberada de uma forma mais gradual. Além disso, mesmo em doses mais elevadas, não se observou valores acima da faixa terapêutica.

Quando se comparou a atividade anti-Xa obtida pela injeção subcutânea de nanopartículas com heparina em doses diversas, 800 UI/Kg e 1000 UI/Kg, ficou demonstrado que o efeito e o tempo de ação dependem da dose aplicada. A heparina encapsulada em maior dose teve um efeito significativamente mais prolongado e maior atividade anti-Xa quando comparado à de menor dose.

5.4. Avaliação da atividade antitrombótica *in vivo* das nanopartículas com heparina no modelo de TVP

A indução da TVP pela ligadura da veia cava inferior e suas colaterais é um método amplamente empregado em estudos experimentais, particularmente para avaliação de fármacos com atividade antitrombótica e anticoagulante (Carelli et al., 2005)

A indução de TVP observada após o emprego das nanopartículas com heparina mostrou um efeito antitrombótico *in vivo* muito importante e, muito superior ao obtido com a heparina livre. Esse efeito antitrombótico não teve um

paralelo ao observado pela medida da atividade anti-Xa plasmática, que avalia a atividade anticoagulante. Esse é um ponto muito interessante na prática, pois fármacos com maior atividade antitrombótica, e menor efeito anticoagulante, podem atingir o objetivo de evitar a trombose, sem efeitos hemorrágicos, uma complicação séria do tratamento com os anticoagulantes disponíveis atualmente. A análise do tempo de sangramento teria sido interessante para comprovar essa hipótese no modelo de TVP *in vivo*, e será avaliado em estudos posteriores.

Apesar do efeito mais prolongado da atividade anti-Xa com heparina encapsulada, sua magnitude foi menor, em comparação ao uso da heparina livre, na mesma dosagem. Isto não comprometeu a atividade antitrombótica da heparina encapsulada. Assim, podemos propor algumas hipóteses para esse achado. Talvez, uma ação mais prolongada, mesmo que menos potente, tenha maior importância na prevenção da trombose. Outra suposição é a de que outros mecanismos, não avaliados pela atividade anti-Xa atuem na prevenção da trombose, talvez pela ação sobre o endotélio.

Nesse sentido, a avaliação da ação antitrombótica dessas nanopartículas com heparina em modelos com indução da trombose por outros métodos, como o uso do cloreto férrico, poderá contribuir para um melhor entendimento dos processos envolvidos. Também, a análise do trombo, e de proteínas expressas no mesmo possa contribuir para essa elucidação.

De qualquer forma, esse foi um resultado inesperado e animador, pois caso se confirme, as nanopartículas com heparina talvez possam se tornar uma alternativa promissora no tratamento da TVP e, particularmente na profilaxia da mesma.

6 - CONCLUSÕES

O método de dupla emulsão a/o/a mostrou-se um método eficiente para o encapsulamento de heparina, proporcionando a obtenção de nanopartículas esféricas e com alta eficiência de encapsulamento (~80 %).

A liofilização das nanopartículas com heparina, mesmo com a utilização de maltose como crioprotetor, não se mostrou um método adequado para estocagem das mesmas, pois induziu a perda da atividade biológica.

No estudo de liberação *in vitro* foi observado que a adição de esterase aumentou a velocidade de liberação da heparina provavelmente pela aceleração da biodegradação das partículas.

Pelo estudo *in vivo,* a heparina encapsulada mostrou uma liberação sustentada em quantidades adequadas, e por um período superior ao obtido com a heparina livre. Caso esses resultados se confirmem através da continuidade deste estudo, a utilização de nanopartículas de heparina na prática clínica poderá ser uma realidade com grandes vantagens para o paciente.

As nanopartículas com heparina apresentaram uma excelente ação antitrombótica, com menor atividade anticoagulante, o que poderá ser mais um fator para continuidade da investigação do emprego de polímeros como veículos na administração de heparina.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Adv Drug Deliv Rev 1997; 28(1): 5-24.

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

Baran ET, Ozer N, Hasirci V. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an *in vitro* study. J Microencapsul 2002; 19: 363-76.

Benoit. Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology, In: Benita S. ed. Microencapsulation: Methods and Industrial Applications. Marcel Dekker Inc., New York, 1996, p. 35-72.

Blann AD, Khoo CW. The prevention and treatment of venous thromboembolism with LMWHs and new anticoagulants. Vascular Health and Risk Management 2009; 5: 693-704.

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

Carelli G, Maffei FHA, Mattar L, Ferrari IC, Thomazini-Santos IA, Carvalho LR. Combinations of Low Doses of Unfractionated Heparin and of Low-Molecular-Weight Heparin Prevent Experimental Venous Thrombosis. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 2005; 34: 263-268.

Carvalho I, Thomazine IA, Maffei FHA, Curi PR, Mattar L. Trombose venosa experimental por ligadura de veia cava no rato: comparação entre diferentes técnicas. 7. Reunião annual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, Caxambu. Anais 1992, p 69.

Cater JC. The natural history and epidemiology of venous thrombosis. Prog Cardiovas Dis 1994; 36: 423-38.

Chandra R, Rustgi R. Biodegradable Polymers**.** Prog Polym Sci 1998; 23:1273-335.

Dal Pozzo A, Acquasaliente M, Geron MR. New heparin complexes active by intestinal absorption. I. Multiple íon pairs with basic organic compounds. Thromb Res 1989, 56: 119-24.

Durán N, De Azevedo MMM (2002). Rede de pesquisa em nanobiotecnologia. Disponível em <www.comciencia.br>, Acesso em: 26 de agosto de 2007.

Durán N, Marcato PD, Buffo C, De Azevedo MMM, Esposito E. Poly(e-caprolactone)/propolis extract:microencapsulation and antibacterial activity evaluation. Die Pharmazie (Berlin) 2007; 62: 287-90.

Flecknell PA. Laboratory Animal Anaesthesia. 2. ed. San Diego: Academic Press Inc.; 1996. p. 247.

Gaspari PDM. Preparação e caracterização de micro e nanopartículas poliméricas contendo estreptomicina. Campinas 2006 (Tese-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).

Guarini S, Ferrari W. Olive oil-provoked bile dependent absorption of heparin from the gastro-intestinal tract in rats. Pharm Res Commun 1985; 17: 685-94.

Handeland GF, Abildgaard U, Holm HA, Arnesen KE. Dose adjusted heparin treatment of deep venous thrombosis. Eur J Clin Pharmacol 1990; 39: 107-12.

Hasirci V, Lewandrowski K, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and *in vivo* application. J Biotechnol 2001; 86: 135-50.

Hirsh J. Low Molecular Weight Heparins. 4. ed. Ontario: BC Decker Inc.; 2007.

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 2005; 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.

Jiao Y, Ubrich N, Avier MM, Vigneron C, Hoffman M, Lecompte T, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. Circulation 2002; 105(2): 230-35.

Lam LH, Silbert JE, Rosenberg RD. The separation of active and inactive forms of heparin. Biochem Biophys Res Commun 1976; 69: 570-7.

Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V et al. Inherited thrombophilia: Part 1. Thromb Haemost 1996; 76: 651-62.

Lee SC, Oh JT, Jang MH, Chung SI. Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L – lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. J Control Release 1999; 59: 123-132.

Leone-Bay A, Paton D, Variano B, Leipold H, Riviera T, Miura-Fraboni J, Baughman RA, Santiago NJ. Acylated non-α-amino acids as novel agents for the oral delivery of heparin sodium, USP. Control Rel 1998; 50: 41-9.

Li SM, Vert M. Biodegradation of aliphatic polyesters. In: SCOTT. G. GILEAD. D. (eds.). Degradable Polymers. Chapman and Hall. Cambridge 1995. p. 43-87.

Maia JL, Santana MHA, M.I. Development of biodegradable microcapsules for administration of medicines, Brazilian Journal of Chemical Engineerin, (in press) 2003.

Marcato PD, Adami LF, Durán N. Comparative study of peptide encapsulation in polymeric and in solid lipid nanoparticles. J. Biomed. Nanotechol., submetido.

Marcato PD. Preparação e caracterização de micro e nanopartículas poliméricas contendo estreptomicina. Campinas 2006 (Tese-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).

Melo OS, De Azevedo MMM, Frungillo L, Anazetti MC, Marcato PD, Durán, N. Nanocytotoxicity: Violacein and Violacein-Loaded Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles Acting on Human Leukemic Cells. J. Biomed. Nanotechnol 2009; 5: 192-201.

Meng FA, Ma GH, Qiu W, Su ZG. 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.

Middeldorp S, Meinardi JR, Koopman MM, Van Pampus EC, Hamulyak K, Van Du Meer J et al. A prospective study of asymptomatic carriers of the factor V Leiden mutation to determine the incidence of venous thromboembolism. Ann Intern Med 2001; 135: 322-7.

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.

Monreal M, Silveira P, Monreal L, Monasterio J, Angles AM, Lafoz E, et al. Comparative Study on the Antithrombotic Efficacy of Four Low-Molecular-Weight Heparins in Three Different Models of Experimental Venous Thrombosis. Haemostasis 1991; 21: 91-7.

Morton AK, Edwards HE, Allen JC, Phillips GO. An evaluation of the oral administration of commercial and fractionated heparin samples in rats. Int J Pharm 1981; 9: 321-5.

Moser KM. Venous thromboembolism. Am Rer Respir Dis 1990; 141: 235-49.

Olbrich C, Kayser O, Muller RH. Enzymatic degradation of Dynasan 114 SLN-effect of surfactants and particle size. J Nanoparticle Research 2002; 4: 121- 9.

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

Picos DR, Carril MG, Mana DF, Fuente LN. Microspheres biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. Rev Cubana Farm 2000; 34: 70-7.

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

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

Rizkalla N, Rangue C, Lacasse FX, 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 FR. Venous thrombosis: prevalence and interaction of risk factors. Haemostasis 1999; S1: 1-9.

Rosendaal FR. Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behavior. Hematology. Am Soc Hematol Educ Program 2005: 1-12.

Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-coglycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. J Control Release 2002*;* 82: 105-114.

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

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-quimica de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quimica Nova 2003; 26(5): 1-17.

Silverstein MC, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton III LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A 25-year population-based study. Arch Intern Med 1998; 158(6): 585-93.

Soppimath KS, Aminabhavi TH, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Control Release 2001; 70: 1-20.

Teien AN, Lie M. Evaluation of an Amidolytic Heparin Assay Method: Increased Sensitivity by Adding Purified Antithrombin III. Thromb Res 1077; 10: 399-410.

Tidball CS, Lipman RI. Enhancement of jejunal absorption of heparinoid sodium ethylenediamine-tetraacetate in the dog. Proc Soc Exp Biol Med 1962; 111: 713-5.

Ueno M, Nakasaki T, Horikoshi I, Sakuragawa N. Oral administration of liposomally-entrapped heparin to beagle dogs. Chem Pharm Bull 1982; 30: 2245-7.

Wang MY, Yu YT, Chang TMS. Preparation, structure characterization and properties of new poly(vinyl alcohol) microcapsules. Chem J Chin Univ-Chin 2005; 26: 865-869.

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

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

Zoller B, Garcia de Frutos P, Hillarp A, Dahlback B. Thrombophilia as a multigenic disease. Haematologica 1999; 84: 59-70.

8 -ANEXOS

ANEXO 1

Peso do trombo venoso logo após a retirada

	Grupo Controle	Grupo Heparina	Grupo nanopartículas
Mediana	0,01392	0,00194	0,00000
Mínimo	0,00490	0,00103	0,00000
Máximo	0,05020	0,00817	0,00019
Média	0,01720	0,00287	0,00003
Desvio-Padrão	0,01500	0,00268	0,00008
Numero total	8	6	6

Peso do trombo venoso seco

	Grupo Controle	Grupo Heparina	Grupo nanopartículas
Mediana	0,00372	0,00091	0,00000
Mínimo	0,00110	0,00060	0,00000
Máximo	0,01515	0,00280	0,00005
Média	0,00485	0,00118	0,00001
Desvio-Padrão	0,00462	0,00081	0,00002
Numero total	8	6	6

ANEXO 2

UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **1350-1**, sobre **"Preparação e caracterização de nanopartículas de heparina e seu emprego em modelo animal de trombose venosa"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bozzacchi / Carla Pazzini**, 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 na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **26 de setembro de 2007**.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **1350-1**, entitled **"Preparation and characterization of heparin-loaded nanoparticles and its employment in animal model of venous thrombosis"**, 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 **September 26, 2007**.

Campinas, 26 de setembro de 2007.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm