

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Glaucia Grazielli Basso

**Síntese e Caracterização de Partículas Esféricas de Poli(Álcool
Vinílico) e Poli(Acetato Vinílico) para Utilização em Embolização**

São José do Rio Preto
2011

Glaucia Grazielli Basso

**Síntese e Caracterização de Partículas Esféricas de Poli(Álcool Vinílico) e
Poli(Acetato Vinílico) para Utilização em Embolização**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Marques de Lima Oliveira

**São José do Rio Preto
2011**

Basso, Glaucia Grazielli.

Síntese e caracterização de partículas esféricas de poli (álcool vinílico) e poli (acetato vinílico) para utilização em embolização / Glaucia Grazielli Basso. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.
103 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Geraldo Nery

Co-orientador: Ana Paula Marques de Lima Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Polimerização. 2. Embolização. 3. Polímeros de vinil. 4. Partículas. I. Nery, José Geraldo. II. Oliveira, Ana Paula Marques de Lima. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 66.095.26

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Glaucia Grazielli Basso

**Síntese e Caracterização de Partículas Esféricas de Poli(Álcool Vinílico) e
Poli(Acetato Vinílico) para Utilização em Embolização**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Rosa Sayoko Kawasaki Oyama
Braile Biomédica Ind. Com. Rep. Ltda. - São
José do Rio Preto

Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy
FAMERP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 29 de julho de 2011

*Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos e ao
meu noivo, que sempre estiveram do meu lado, me
apoiando e acreditando em mim. O amor e o carinho que
sinto por vocês são imensos!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por estar junto a mim em todos os momentos da minha vida.

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado, que colaboraram, direta ou indiretamente, para o sucesso deste trabalho.

Ao amor, carinho e incentivo de toda a minha família, especialmente aos meus pais, Aldemar e Fátima, por me darem forças nos momentos de dificuldade, pela educação, compreensão e por todo o apoio.

Aos meus irmãos, Glauber e Glauco, e ao meu sobrinho Felipe, que colaboraram e torceram por mim. Aos meus avôs, Antônio e Oswaldo, e minhas avós, Carcília e Antônia, pela educação e amor que recebi a vida toda.

Ao meu noivo Paulo Vitor, pelo amor sincero, compreensão e força que recebi sempre que precisei, pelo ombro amigo, paciência, carinho e atenção. Agradeço pela companhia, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Nery, orientador e incentivador do meu trabalho, pela confiança depositada em mim, pelo apoio, atenção e amizade. Agradeço pela grande oportunidade, colaboração e ensinamentos que contribuíram significativamente para a minha evolução profissional.

Aos meus colegas de laboratório, Vinícius, Alex, Danilo, Adriano, Juliana, Rodrigo, Aryane, Isabella, Roberto, Lívia, Marcelo, Gil, Elisa e Leandro, por todo o apoio, companheirismo e amizade. Tivemos muitos momentos de dedicação e concentração no trabalho, mas também importantes momentos de descontração!

Aos meus grandes amigos que são a família que Deus me permitiu escolher, que têm estado sempre ao meu lado, especialmente à Érika e ao Milton.

Ao pessoal da Braile Biomédica, a bióloga Rosa, a bióloga e co-orientadora Ana Paula, o físico-médico Guilherme e o médico Dr. Domingo Braile, pelo suporte técnico e financeiro,

pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Também à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) por promover o financiamento do projeto.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de São José do Rio Preto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do IBILCE/UNESP.

A todos os professores, técnicos e funcionários do Departamento de Física do IBILCE/UNESP.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A todos, muito obrigada!!!

*“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que eu vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King
(15/01/1929 - 04/04/1968)

RESUMO

Partículas poliméricas com tamanho e morfologia controlados e propriedades físico-químicas adequadas são amplamente utilizadas em aplicações médicas, como na embolização, uma técnica cirúrgica utilizada para tratar malformações arteriovenosas (MAVs), conter hemorragias, tratar localmente tumores hipervascularizados (THVs) e outras doenças vasculares. Este procedimento é realizado com materiais de diferentes formas e composições, sendo as partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) freqüentemente utilizadas por apresentarem um alto grau de desempenho. Elas estão disponíveis no mercado nas morfologias esférica e não-esférica, sendo que as esféricas apresentam uma maior eficácia no tratamento. O presente trabalho objetivou desenvolver e aprimorar partículas esféricas de PVA e poli(acetato vinílico) (PVAc) para serem utilizadas em embolização. Suas sínteses foram realizadas em duas etapas: a polimerização em suspensão do monômero acetato vinílico (VAc) em PVAc e a saponificação do polímero PVAc em PVA, com variações na velocidade de agitação e na concentração da solução de hidróxido de sódio (NaOH), na etapa da saponificação. As partículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e ressonância magnética nuclear de ^{13}C - *cross polarization / magic angle spinning* (^{13}C RMN CP/MAS). Foram analisadas a distribuição de tamanhos, a dimensão fractal, a determinação da biocarga, que determinou os parâmetros de esterilização por radiação gama, e a citotoxicidade, pelo teste de “Reatividade Biológica *in vitro*”. Os resultados indicaram que a morfologia esférica foi obtida durante a primeira etapa da síntese e que essa morfologia não foi afetada pelo segundo processo. A velocidade de agitação e a concentração de NaOH influenciaram nos tamanhos das partículas. As partículas comerciais possuem dimensão fractal maior que das partículas sintetizadas. Foi observado que a cristalinidade da amostra depende da concentração de base utilizada na segunda etapa e que as partículas mais cristalinas são constituídas apenas de PVA, diferentemente das outras, que são uma mistura de PVA e PVAc. Os testes *in vitro* indicaram que as partículas analisadas não são tóxicas à linhagem celular NTC clone 929. Analisando todos os resultados obtidos, concluiu-se que foram obtidas as partículas esféricas com características favoráveis para serem utilizadas em embolização.

Palavras-chave: embolização; partículas esféricas; polimerização em suspensão; PVA; PVAc.

ABSTRACT

Polymeric particles with controlled size and morphology and appropriated physicochemical properties are widely used in medical applications, such as embolization, a surgical technique used to treat arteriovenous malformations (AVMs), stop bleedings, treat locally hypervascular tumors (HVTs) and other vascular diseases. This procedure is performed with materials of different shapes and compositions, and the poly(vinyl alcohol) (PVA) particles are often used for presenting a high degree of performance. They are commercially available in spherical and non-spherical morphologies, and the spherical particles have a greater efficacy in the treatment. This study aimed to develop and improve spherical PVA and poly(vinyl acetate) (PVAc) particles for use in embolization. Their syntheses were performed in two stages: the suspension polymerization of vinyl acetate (VAc) monomer in PVAc and the saponification of PVAc polymer in PVA, with variations in the stirring speed and the concentration of sodium hydroxide (NaOH) solution, at the saponification step. The particles were characterized by scanning electronic microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and ^{13}C nuclear magnetic resonance - cross polarization / magic angle spinning (^{13}C NMR CP/MAS). We analyzed the size distribution, the fractal dimension, the determining of the bioburden, which determined the parameters of sterilization by gamma irradiation, and the cytotoxicity, by the “Biological Reactivity in vitro”. The results indicated that the spherical morphology was obtained during the first stage of the synthesis and that this morphology was not affected by the second process. The stirring speed and the NaOH concentration influenced the size of the particles. The commercial particles have a fractal dimension greater than the synthesized particles. It was observed that the crystallinity of the sample depends on the concentration of base used in the second stage and that the crystalline particles are made only of PVA, unlike others, which are a mixture of PVA and PVAc. The in vitro tests indicated that the particles aren't considered toxic to the cell line NTC clone 929. Analyzing all results obtained, we concluded that the spherical particles with favorable characteristics for use in embolization were obtained.

Keywords: *embolization; spherical particles; suspension polymerization; PVA; PVAc.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. (a) Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas. (b) Partículas de PVA esféricas	21
FIGURA 2. Diferentes configurações dos cateteres regulares de angiografia.	26
FIGURA 3. Esquema de embolização de mioma uterino	27
FIGURA 4. Esquema de irrigação sanguínea de um tumor antes e após o bloqueio causado pelo agente embólico.....	28
FIGURA 5. Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas (PVA Embolization Particles - Cook [®] Medical).....	31
FIGURA 6. Fórmula estrutural do poli(álcool vinílico) (PVA)	34
FIGURA 7. Bead Block [™] (Biocompatibles [™]) são microesferas comercializadas em cinco tamanhos diferenciados pelas cores das seringas que as contêm	39
FIGURA 8. Contour [®] PVA Embolization Particles (Boston [™] Scientific) são partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas	39
FIGURA 9. Embosphere [®] Microsphere (Biosphere [®] Medical) são microesferas gelatinosas	40
FIGURA 10. Embozene [®] Microspheres (Celo [®] Nova) são microesferas poliméricas comercializadas em dez tamanhos e cores diferentes.....	41
FIGURA 11. PVA Embolization Particles (Cook [®] Medical) são partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas comercializadas em uma grande variedade de tamanhos: de 90 até 2800 µm	41
FIGURA 12. Reator encamisado, de capacidade de 1 L, utilizado para realizar as sínteses das partículas esféricas.....	48
FIGURA 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 20x: (a) amostra comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm).....	56

FIGURA 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 50x: (a) amostra comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm).....	57
FIGURA 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 200x: (a) amostra comercial (Cook Medical) e (b) amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm).....	57
FIGURA 16. Dimensão fractal das amostras (a) comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm). Partículas de tamanhos entre 300 e 500 μm e imagens com aumento de 20x	58
FIGURA 17. Dimensão fractal das amostras (a) comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm). Partículas de tamanhos entre 300 e 500 μm e imagens com aumento de 50x	59
FIGURA 18. Dimensão fractal das amostras (a) comercial (Cook Medical) e (b) amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm). Partículas de tamanhos entre 300 e 500 μm e imagens com aumento de 200x	60
FIGURA 19. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm) com aumento de 50x. (a) Partículas menores que 106 μm e (b) partículas entre 300 e 500 μm	61
FIGURA 20. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm) com aumento de 100x. (a) Partículas menores que 106 μm e (b) partículas entre 300 e 500 μm	61
FIGURA 21. Distribuição de tamanhos da amostra 7 (2,5 mol/L e 600 rpm)	62
FIGURA 22. Distribuição de tamanhos da amostra 8 (2,5 mol/L e 700 rpm)	62
FIGURA 23. Distribuição de tamanhos da amostra 9 (2,5 mol/L e 800 rpm)	62
FIGURA 24. Distribuição de tamanhos da amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm)	63
FIGURA 25. Distribuição de tamanhos da amostra 11 (2,5 mol/L e 1000 rpm)	63
FIGURA 26. Comparação das distribuições de tamanhos das amostras (a) 9 (2,5 mol/L e 800 rpm) e (b) 12 (5 mol/L e 800 rpm)	64

FIGURA 27. Comparação das distribuições de tamanhos das amostras (a) 10 (2,5 mol/L e 900 rpm) e (b) 13 (10 mol/L e 900 rpm)	64
FIGURA 28. Distribuição de tamanhos da amostra 14 (25 mol/L e 600 rpm)	65
FIGURA 29. Difrátogramas de raios-X das partículas sintetizadas, amostra 1 (25 mol/L), amostra 2 (20 mol/L), amostra 3 (16 mol/L), amostra 4 (12 mol/L), amostra 5 (8 mol/L) e amostra 6 (4 mol/L).....	66
FIGURA 30. Difrátogramas de raios-X da amostra comercial (Boston Scientific) e da amostra de mais alta cristalinidade (amostra 1 - 25 mol/L)	67
FIGURA 31. Comparação do grau de cristalinidade (obtido por calorimetria diferencial de varredura - DSC) da amostra comercial (Cook Medical) e das amostras 1 (25 mol/L), 2 (20 mol/L), 3 (16 mol/L), 4 (12 mol/L), 5 (8 mol/L) e 6 (4 mol/L)	68
FIGURA 32. Espectro de ressonância magnética nuclear (^{13}C RMN CP/MAS) da amostra comercial (Boston Scientific), amostra 1 (25 mol/L) e amostra 6 (4 mol/L).....	70
FIGURA 33. Modelo teórico das pontes de hidrogênio no poli(álcool vinílico) (PVA)	71
FIGURA 34. Difrátogramas de raios-X da amostra 1 (25 mol/L) submetida à radiação gama	73
FIGURA 35. Difrátogramas de raios-X da amostra 10 (2,5 mol/L) submetida à radiação gama	74
FIGURA 36. Fórmula estrutural do Cloridrato de Doxorrubicina	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Condições de polimerização e saponificação das partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) / poli(acetato vinílico) (PVAc).....	49
TABELA 2. Análise da reatividade biológica <i>in vitro</i> das amostras. A toxicidade é classificada de acordo com o valor do índice de zona (IZ) observado nas amostras	54
TABELA 3. Condições de saponificação e grau de cristalinidade das partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) / poli(acetato vinílico) (PVAc).....	69
TABELA 4. Índice de zona (IZ) obtido após a leitura das placas de culturas celulares para a amostra de 2,5 mol/L (350-500 μm)	75
TABELA 5. Índice de zona (IZ) obtido após a leitura das placas de culturas celulares para a amostra de 25 mol/L (500-1000 μm)	75

LISTA DE ESQUEMAS E EQUAÇÕES

Esquemas:

- ESQUEMA 1.** Representação de um tautomerismo ceto-enólico, onde o equilíbrio desloca-se, geralmente, no sentido da estrutura onde o hidrogênio se encontra ligado ao átomo de carbono e não no daquela onde se encontra ligado ao átomo mais eletronegativo 35
- ESQUEMA 2.** Formação dos radicais livres benzoílas a partir do peróxido de benzoíla (BPO) 36
- ESQUEMA 3.** Iniciação da cadeia polimérica na formação do poli(acetato vinílico) (PVAc) 37
- ESQUEMA 4.** Propagação da cadeia polimérica na formação do poli(acetato vinílico) (PVAc)..... 37
- ESQUEMA 5.** Terminação da cadeia polimérica, por combinação, na formação do poli(acetato vinílico) (PVAc) 37
- ESQUEMA 6.** Hidrólise alcalina do poli(acetato vinílico) (PVAc) para obtenção do poli(álcool vinílico) (PVA), obtendo como subproduto o acetato de sódio (CH_3COONa) 38

Equações:

- EQUAÇÃO 1**..... 51
- EQUAÇÃO 2**..... 51
- EQUAÇÃO 3**..... 51
- EQUAÇÃO 4**..... 51
- EQUAÇÃO 5**..... 68
-

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviaturas:

AIBN - azobis(isobutironitrila)

BPO - peróxido de benzoíla

^{13}C RMN CP/MAS - ressonância magnética nuclear de ^{13}C - *cross polarization / magic angle spinning*

DRX - difração de raios-X

IZ - índice de zona

MAV - malformação arteriovenosa

MEV - microscopia eletrônica de varredura

PBS - *phosphate buffer saline*

PVA - poli(álcool vinílico)

PVAc - poli(acetato vinílico)

PVPi - poli(pivalato vinílico)

THV - tumor hipervascularizado

TMI - terapia minimamente invasiva

TSA - *tryptic soy agar*

UFC - unidades formadoras de colônias

UV - ultravioleta

VA - álcool vinílico

VAc - acetato vinílico

Siglas:

CBE - Companhia Brasileira de Esterilização

CEEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

IAL - Instituto Adolfo Lutz

IBILCE - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

FDA - *Food and Drug Administration*

SCTIE - Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos

SUS - Sistema Único de Saúde

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Epígrafe	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ESQUEMAS E EQUAÇÕES.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	18
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1. Terapia Minimamente Invasiva.....	25
3.2. Embolização Vascular.....	25
3.3. Agentes Embólicos.....	28
3.4. Partículas de PVA.....	30
3.5. Partículas Esféricas de PVA/PVAc.....	31
3.5.1. Processos de Polimerização em Suspensão.....	31
3.5.1.1. Agentes de Suspensão	32
3.5.1.2. Iniciadores	34
3.5.2. Síntese de Partículas Esféricas de PVA/PVAc.....	34
3.6. Dados Econômicos	38
3.7. Dados Sociais	42
4. OBJETIVOS	44
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
5.1. Materiais.....	47
5.2. Preparo das Amostras.....	47
5.3. Caracterização das Amostras.....	49

5.3.1. Determinação da Distribuição de Tamanhos.....	50
5.3.2. Medida da Dimensão Fractal.....	50
5.3.3. Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura	51
5.3.4. Medida de Difração de Raios-X	52
5.3.5. Medida de Calorimetria Diferencial de Varredura.....	52
5.3.6. Medida de Ressonância Magnética Nuclear.....	52
5.3.7. Análise da Biocarga.....	52
5.3.8. Esterilização por Radiação Gama.....	53
5.3.9. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	54
 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1. Morfologia, Dimensão Fractal e Distribuição de Tamanhos.....	56
6.2. Difração de Raios-X	65
6.3. Grau de Cristalinidade Calculado por Calorimetria Diferencial de Varredura	68
6.4. Ressonância Magnética Nuclear.....	69
6.5. Análise da Biocarga.....	72
6.6. Esterilização por Radiação Gama.....	73
6.7. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	74
 7. CONCLUSÕES.....	76
 8. PERSPECTIVAS.....	79
8.1. Avaliação da Suspensão das Partículas e Liberação Via Cateter	80
8.2. Realização de Experimentos <i>in vivo</i> com as Partículas de PVA/PVAc	80
8.3. Carregamento das Partículas de PVA/PVAc com Doxorrubicina	81
8.4. Determinação do Nível de Carregamento	83
8.5. Avaliação da Compressibilidade das Partículas Carregadas	83
8.6. Liberação do Fármaco <i>in vitro</i>	84
8.7. Realização de Experimentos <i>in vivo</i> com as Partículas Carregadas.....	84
 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
 10. ANEXOS	95
10.1. Artigo Publicado.....	96
10.2. Parecer da Comissão de Ética.....	103

1. INTRODUÇÃO

A decodificação do genoma humano foi uma das mais fascinantes conquistas do final do século XX, pois revela a base genética de inúmeras doenças, sejam elas geneticamente hereditárias ou não. Diante de toda a riqueza de informações gerada, abriu-se uma variedade de possibilidades para o aperfeiçoamento ou criação de novos fármacos e terapias que podem alterar o funcionamento da maquinaria celular a nível genético. Dessa maneira, tratamentos avançados e controles de doenças específicas, até então não tratáveis, tornaram-se realidade (REINEKE; GRINSTAFF, 2005).

Em paralelo à busca de novas terapias e fármacos, buscaram-se meios, ou vetores, mais eficientes no transporte desses fármacos até a região desejada. Os vetores classificam-se em virais e não virais. Os vetores virais, como o próprio nome sugere, são vírus desprovidos de sua carga genética que atuam como agentes vetoriais e os não-virais são materiais orgânicos ou inorgânicos em escalas micro ou nanométricas que possuem a capacidade de realizar transfecção celular¹ (LUO, 2005).

Recentemente, polímeros na forma de pequenas partículas começaram a ser estudados e explorados com o objetivo de realizar a transfecção celular. Estudando-se as suas estruturas e funções torna-se fácil a compreensão do mecanismo de *drug delivery* realizado por eles (LEWIS, 1990). Um dos maiores obstáculos que limita as novas terapias é a deficiência de métodos seguros e eficientes para a entrega de fármacos. Assim, é provável que sistemas baseados em polímeros tornem-se uma importante ferramenta para aplicações clínicas (PACK *et al.*, 2005).

A nanotecnologia aplicada a sistemas de liberação de fármacos surgiu no início da década de 80 como um método comercialmente atrativo para administração de fármacos e obtenção de sua ação prolongada. Sistemas poliméricos micro e nanoestruturados, desde então, estão sendo aplicados no controle da liberação de fármacos, modulando a velocidade com que estas atravessam as barreiras biológicas, penetram na circulação e atingem o alvo. Além disso, eles podem direcionar o fármaco no organismo evitando seu acúmulo em tecidos não específicos, tornando-a menos tóxica e elevando sua concentração no local onde deve exercer seu efeito (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A biodisponibilidade de um fármaco pode ser modificada pelo uso de vetores poliméricos. Eles proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejado (célula,

¹ Transfecção celular é a introdução de uma molécula de DNA estranha em uma célula eucariótica, normalmente seguida pela expressão de um ou mais genes presentes no DNA recém introduzido. Fonte: **PDAMED - Dicionário Digital de Termos Médicos**. Disponível em: <http://www.pdamed.com.br/diciomed/pdamed_0001_16082.php>. Acesso em: 03 fev. 2011.

tecido ou órgão) minimizando os efeitos colaterais que normalmente acompanham os medicamentos convencionais. A diminuição do efeito tóxico e o aumento da eficácia do fármaco contra diversas doenças têm sido principalmente obtidos através do uso desses vetores (GIBAUD *et al.*, 1996).

As terapias minimamente invasivas (TMIs) tratam doenças buscando provocar agressões mínimas aos tecidos envolvidos no procedimento operatório e restringindo os procedimentos apenas à área afetada. Elas podem não apenas exercer seu caráter específico, mas também serem associadas a processos de *drug delivery*. Isso acontece, na maioria dos casos, quando um agente quimioterápico está associado a algum vetor típico de TMI (LEWIS, 1990). A embolização vascular é um tipo de TMI bastante utilizado no tratamento de THVs e MAVs (LATCHAW; GOLD, 1979). Ela consiste na injeção de um material embólico, após realizar cateterismo seletivo dos vasos sanguíneos que irrigam a “área alvo”, de modo a obstruir mecanicamente a corrente sanguínea que nutre essa área. Desta forma, existe a interrupção do fornecimento de nutrientes, tendendo a necrosar e diminuir de tamanho, o que permite a recuperação ou não do tecido após um intervalo variável de tempo.

A escolha do material embólico apropriado é essencial para a segurança e efetividade da terapia. Ele pode variar de acordo com as condições da lesão ou doença a ser tratada; também deve ser considerado o objetivo da embolização (se permanente ou temporária) e as características dos materiais embólicos, que inclui o grau de penetração nos vasos sanguíneos, o estado físico e a forma (KWAK *et al.*, 2005). Diferentes materiais são propostos na literatura para a oclusão vascular, porém, destacam-se as partículas de PVA que são utilizadas com sucesso como agente embólico por apresentarem propriedades físico-químicas favoráveis, como elevada compressibilidade, boa elasticidade e também boa resistência química a ácidos, bases e surfactantes² (TADAVARTHY; MOLLER; AMPLATZ, 1975).

Partículas de PVA não-esféricas (Figura 1a) possuem a superfície muito irregular, o que propicia a aglutinação e a agregação, dificultando sua passagem pelo cateter angiográfico (DERDEYN *et al.*, 1995; KERBER; BANK; HORTON, 1978). O uso de partículas esféricas (Figura 1b) tem se mostrado mais efetivo em promover oclusão vascular devido a sua superfície mais regular em comparação à superfície das não-esféricas (DION *et al.*, 1986; WRIGHT *et al.*, 1982). Além disso, há a possibilidade de calibração do tamanho das

² Surfactantes, ou tensoativos, são compostos orgânicos constituídos por moléculas anfifílicas contendo partes polares (cabeça) e apolares (cauda), com propriedades de atividade superficial, resultado da adsorção destes compostos na superfície de líquidos ou na interface entre dois líquidos imiscíveis. Fonte: **Grupo Escolar**. Disponível em: <http://www.grupoescolar.com/materia/surfactantes_%7C_tensoativos.html>. Acesso em: 03 fev. 2011.

partículas esféricas, de modo a apresentarem maior correspondência entre o diâmetro dos vasos alvos, o que torna o procedimento de embolização mais seguro e acurado (BEAUJEU *et al.*, 1996).

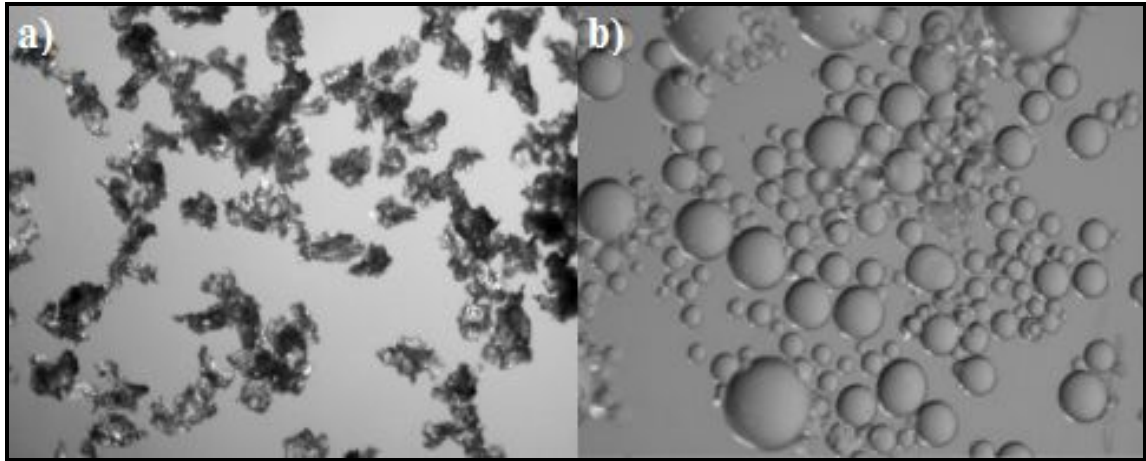


FIGURA 1. (a) Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas. (b) Partículas de PVA esféricas (MENDES *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Durante os últimos anos, foram realizados importantes avanços no desenvolvimento de sistemas poliméricos estruturados, em escalas micro e nanométricas, com potencial de aplicação tecnológica na nanotecnologia, na biotecnologia e, principalmente, na medicina. A utilização desses sistemas, principalmente os constituídos de polímeros biocompatíveis, tem atraído bastante a atenção das comunidades médica e acadêmica. Polímeros sintéticos são considerados importantes para utilização no campo de *drug-delivery*, onde os principais estudos estão voltados a transportes e entregas localizadas de fármacos em regiões específicas do corpo.

Dentre os principais objetivos de tipos alternativos de TMIs, como a embolização e a quimioembolização, está o tratamento de doenças causando menos efeitos colaterais e menores danos às regiões sadias. A embolização vascular consiste no bloqueio mecânico do fluxo sanguíneo em uma determinada região corporal, interrompendo o suprimento de nutrientes essenciais à manutenção das funções fisiológicas do tecido ou órgão, levando-o à morte.

Partículas de PVA são utilizadas como implantes permanentes e são aplicadas diretamente nas veias e artérias com o auxílio de cateteres em procedimentos de embolização. Embora o uso dessas partículas na embolização tenha crescido proporcionalmente à recorrência dessa terapia médica, elas não são produzidas no Brasil e precisam ser importadas. Isso tem tornado o procedimento inviável às camadas sociais menos favorecidas do país, pois o custo desse material é bastante elevado.

Um exemplo da aplicação da técnica de embolização com a utilização de partículas de PVA é o tratamento de mioma uterino, um tumor benigno que pode malignizar e acomete cerca de 40% de mulheres em idade fértil. Para evitar sua progressão, ou em alguns casos promover sua regressão, o suprimento de sangue para o tumor é bloqueado através da embolização, um tratamento relativamente simples, porém não oferecido rotineiramente em hospitais públicos. A falta de estrutura tecnológica e de equipes médicas especializadas faz com que mulheres de baixa renda não tenham acesso a essa tecnologia.

Desta maneira, fomos motivados a realizar este estudo, que possibilitará a produção nacional de partículas de PVA. Isso trará inúmeros benefícios ao Brasil em termos de valores mercadológicos e agregação de valores tecnológicos. O alto impacto na área social resultante da fabricação das partículas no país será de bastante relevância, principalmente na rede de saúde pública e privada, pois o produto terá um preço competitivo, podendo beneficiar todas as classes sociais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Terapia Minimamente Invasiva

TMIs são técnicas alternativas que evitam ou amenizam efeitos colaterais sistêmicos causados por tratamentos cirúrgicos convencionais. As suas principais vantagens são: a redução de seqüelas, a diminuição do tempo de permanência no hospital, a diminuição de infecções e de dor pós-operatórias. Todos esses benefícios reunidos resultam no retorno mais rápido do paciente às suas atividades normais (STADLER *et al.*, 2011).

Durante essas cirurgias são utilizados recursos tecnológicos avançados, como microscópios cirúrgicos, vídeo-endoscopias, intensificadores de imagens e materiais ultraespecíficos para as cirurgias percutâneas, além de equipes médicas bem treinadas (MACK, 2001; SPYT; DE SOUZA, 2001).

As TMIs têm sido usadas em diversas áreas da medicina, na aplicação de tratamentos de hérnias de disco, fraturas vertebrais, aneurismas, miomas uterinos, varicoceles, cânceres, varizes, osteoporoses, dentre outros (Embolution, 2011).

3.2. Embolização Vascular

A embolização vascular é uma técnica da radiologia intervencionista que consiste, basicamente, na oclusão mecânica intensional de vasos sanguíneos que irrigam uma determinada região corporal a fim de diminuir a vascularização dessa região, ou seja, obstruir mecanicamente a corrente sanguínea que circula nessa região (WHITE, 1984). É considerada uma TMI de grande sucesso e bastante usada nos dias atuais por profissionais da área médica, consistindo em uma importante estratégia no tratamento de THVs, aneurismas arteriais, MAVs, contenção de hemorragias, dentre outros (KISILEVZKY; MARTINS, 2003; LINFANTE; WAKHLOO, 2007; STROSBURG *et al.*, 2006), além de possuir a vantagem de pouco ou nenhum efeito colateral pós-tratamento.

Ela é praticada desde 1930, quando Brooks (1930) realizou a inserção de pedaços de músculo pela artéria carótida para embolizar uma fístula carótido-cavernosa³. Com o desenvolvimento de técnicas percutâneas, a embolização foi estendida ao controle de hemorragias em várias regiões do corpo (ENCARNACION *et al.*, 1992) e desvascularização

³ Fístula carótido-cavernosa é um tipo específico de fístula arteriovenosa e representa comunicações anormais entre a artéria carótida interna e o seio cavernoso, surgindo de modo incomum, porém não raro. Fonte: BORBA, R. *et al.* Fístula carótido-cavernosa com epistaxe letal: Relato de caso. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 59, n. 2A, p. 276-279, 2001.

de tumores antes de cirurgias com o objetivo de reduzir a perda sanguínea durante a operação. As indicações para embolização incluem o controle de hemorragia, redistribuição do suprimento sanguíneo para auxiliar na terapia de infusão intravascular de fármacos, facilitação pré-operatória devido à redução da vascularização e da perda sanguínea, inibição do crescimento tumoral, controle de dor e controle da produção hormonal tumoral (HARNED *et al.*, 1998; RAMAKANTAN *et al.*, 1996).

Anteriormente ao início do procedimento de embolização, é necessária a realização de uma angiografia⁴, para localizar e determinar os vasos sanguíneos a serem embolizados; ela é realizada após a introdução intravascular de um agente de contraste iodado, ou agente de contraste radiopaco. O procedimento é então realizado pela introdução de um cateter angiográfico no sistema vascular, que é conduzido até a região onde é necessário realizar a obstrução da corrente sanguínea, pela injeção de diferentes materiais chamados de agentes embólicos. Através do bloqueio seletivo do suprimento sanguíneo da região, os tecidos serão destruídos ou desvitalizados, resultando em um benefício terapêutico (SMITH, 2000).

Para uma correta técnica de embolização, além da escolha do agente embólico, é necessário decidir qual o tipo de cateter que irá conduzir e liberar este agente. Existem basicamente dois tipos de cateteres: os regulares (Figura 2) para realizar angiografias e os microcateteres. A diferença entre eles é o seu diâmetro, os regulares apresentam diâmetro superior a 1 mm enquanto que os microcateteres apresentam diâmetro igual ou inferior a 1 mm. Os cateteres regulares de angiografia podem ser construídos de diferentes tipos de material plástico e podem apresentar várias formas, tamanhos e configurações para adequar à anatomia vascular de cada região (Embolution, 2011).



FIGURA 2. Diferentes configurações dos cateteres regulares de angiografia (Embolution, 2011).

⁴ Angiografia é a visualização radiográfica dos vasos sanguíneos em seguida à introdução de material de contraste. Fonte: **PDAMED Dicionário Digital de Termos Médicos**. Disponível em: <http://www.pdamed.com.br/diciomed/pdamed_0001_01526.php>. Acesso em: 03 fev. 2011.

A Figura 3 ilustra, esquematicamente, um procedimento de embolização uterina, onde as partículas são introduzidas por um fino cateter através da artéria femoral e então depositadas na artéria uterina. Os agentes embólicos, com tamanhos de acordo com o diâmetro da artéria, são injetados na artéria uterina, fluem para o mioma hipervascularizado, bloqueando pequenas artérias e, conseqüentemente, causando necrose isquêmica⁵ (SMITH, 2000).

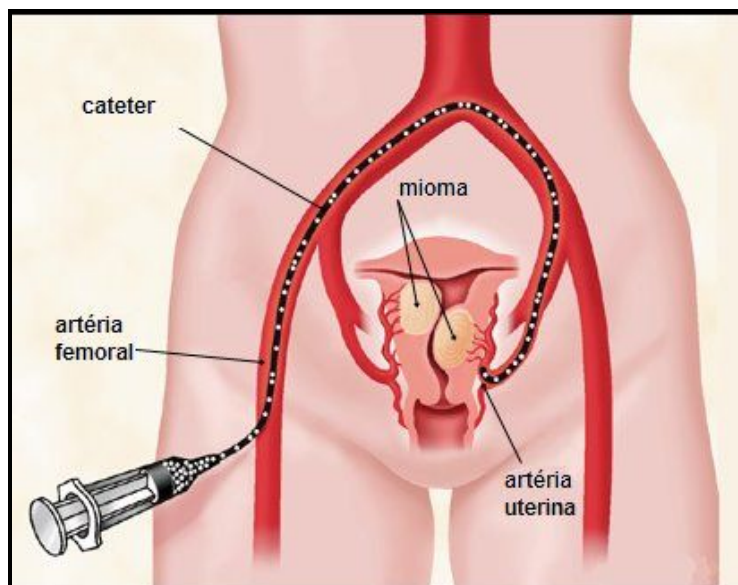


FIGURA 3. Esquema de embolização de mioma uterino (Portal do Mioma, 2008).

A taxa de sucesso apresentada pelo processo de embolização fez surgir um grande interesse médico e acadêmico por este procedimento e pelos materiais utilizados para tal procedimento, estimulando o conhecimento do mecanismo de ação dos agentes embólicos disponíveis e o desenvolvimento de novos agentes para aperfeiçoar o tratamento terapêutico.

Apesar de ser um procedimento simples, existem sintomas pós-embolização como febre, dor, náuseas, vômitos e mal-estar. Estes sintomas são causados pela isquemia e possível enfarte dos órgãos embolizados, com liberação de substâncias e metabólitos para a corrente sanguínea. A dor é geralmente consequência da isquemia sofrida por tecidos normais adjacentes ao alvo da embolização e é combatida com usos adequados de analgésicos. A infecção de tecidos isquêmicos ou necróticos é outro tipo de complicação e para combatê-la é comum utilizar antibióticos (Embolution, 2011).

A complicação mais drástica, do ponto de vista técnico, é a oclusão de um território vascular diferente do desejado. Outras complicações podem ocorrer devido a uma

⁵ Necrose isquêmica é a morte de um tecido, ou de parte dele, por falta de suprimento sanguíneo. Fonte: **The Free Dictionary - Medical Dictionary**. Disponível em: <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/ischemic+necrosis>>. Acesso em: 03 fev. 2011.

embolização incompleta ou a uma avaliação inadequada do suprimento vascular ou das vias colaterais antes da embolização. Por isso, uma avaliação angiográfica prévia das lesões vasculares é de fundamental importância antes do início da embolização (Embolution, 2011; HEMINGWAY; ALLISON, 1988).

3.3. Agentes Embólicos

Os agentes embólicos agem provocando, além da obstrução mecânica, a ativação da segregação das plaquetas e do mecanismo de coagulação próprio do paciente. Dessa forma, a oclusão é auxiliada pela coagulação sanguínea (Figura 4). Nesse caso, é considerado também que alterações da coagulação podem comprometer a eficácia da embolização. A utilização de fluidos ou partículas muito pequenas pode provocar complicações que sempre devem ser evitadas (Embolution, 2011). Durante a aplicação desses agentes embólicos é necessário que haja uma atenção especial para a compatibilidade entre o tamanho das partículas a serem injetadas e o diâmetro dos cateteres e dos vasos sanguíneos a serem tratados, uma vez que a incompatibilidade entre tais dimensões pode ocasionar problemas durante o procedimento clínico, como a oclusão do cateter antes do local onde é necessária a embolização (HEMINGWAY; ALLISON, 1988).

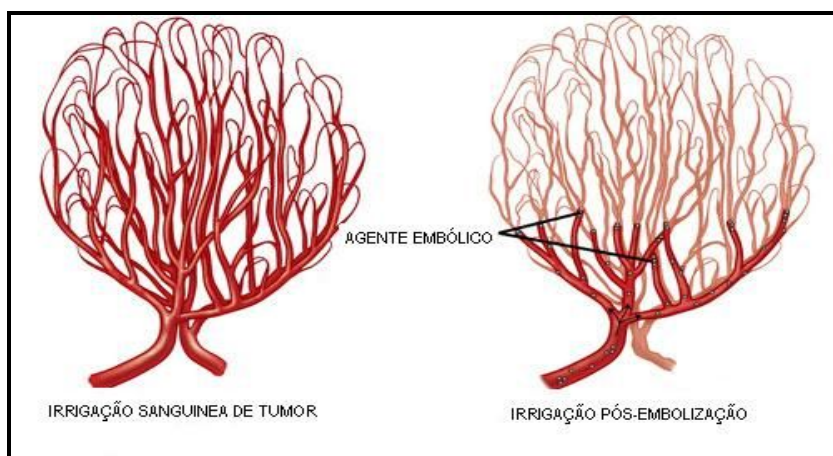


FIGURA 4. Esquema de irrigação sanguínea de um tumor antes e após o bloqueio causado pelo agente embólico.

Todos os agentes embólicos possuem características diferentes e, dependendo da finalidade da aplicação, são classificados quanto (COLDWELL; STOKES; YAKES, 1994; Embolution, 2011; GREENFIELD, 1980):

- a. Ao aspecto físico: podem ser agentes particulados (como o Gelfoam^{®6}, as partículas de PVA e as microesferas de polímeros sintéticos), espiras metálicas, fluidos ou balões descartáveis;
- b. À duração da oclusão: a oclusão pode ser temporária (por exemplo, a realizada com um cateter com balão de oclusão, com microesferas de amido e com Gelfoam[®]), semi-permanente (realizada com PVA) ou permanente (realizada com espiras metálicas);
- c. Ao tipo de condutores: com utilização de microcateteres e/ou cateteres com orifício único e distal, com a vantagem de se alcançar áreas cada vez mais distantes da anatomia vascular;
- d. E à facilidade de manuseio: alguns agentes são de utilização muito simples, como os balões de oclusão e o Gelfoam[®], e outros precisam de manuseio bastante cuidadoso, como alguns tipos de espiras.

Dos agentes embólicos existentes, a maioria tem aplicações específicas e é usada de acordo com o seu valor funcional. Quando, por exemplo, há a necessidade de se fazer um cateterismo super seletivo, é indicado o uso de agentes embólicos sabidamente seguros. Para casos que não necessitam de muitos cuidados, e sim da urgência da oclusão, o agente de mais fácil manuseio é o mais adequado. Um exemplo que exige extremo cuidado é a embolização da rede neurovascular, já que esta é bastante complexa. A embolização de caráter emergencial pode ser utilizada para casos de hemorragia exposta (GREENFIELD, 1980). Quando há necessidade de ocluir grandes vasos, utiliza-se materiais como espiras metálicas ou balões, e para pequenos vasos é realizada a oclusão com micropartículas ou agentes líquidos (PATEL; SOULEN, 2006).

As espiras metálicas são usadas principalmente em traumas, aneurismas e também no tratamento de varicocele e têm como característica a oclusão total do vaso sanguíneo (Austin Radiological Association, 2004; Embolution, 2011; LINFANTE; WAKHLOO, 2007).

O Gelfoam[®] é bastante utilizado e causa oclusão vascular por mecanismo de obstrução, indução de trombose e reação inflamatória na parede vascular. A gelatina é absorvida e permite a recanalização da artéria em dias ou semanas (BARTH; STRANDEBERG; WHITE, 1977). Por não causar oclusão permanente, ela é utilizada em

⁶ Gelfoam[®] é uma esponja gelatinosa não tóxica comumente utilizada para coibir hemorragia em cirurgia. Este material funciona ativando a agregação plaquetária e induzindo a inflamação da parede vascular. Fonte: **Embolution - Soluções Médicas por Emboloterapia - Tipos de Agentes Embólicos**. Disponível em: <http://www.embolution.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=56&Itemid=35#tipos>. Acesso em: 10 fev. 2011.

tratamento de lesões benignas como miomas uterinos, tumores de fígado, THVs em geral, sangramentos e em desvascularização temporária pré-cirúrgica para diminuir perda sanguínea.

As partículas de PVA são bastante utilizadas na embolização de tumores de fígado, rim, miomas uterinos e lesões brônquicas. Elas são classificadas como um agente embólico de oclusão total, ou seja, de impedimento total do fluxo sanguíneo no vaso (GREENFIELD, 1980; HEMINGWAY; ALLISON, 1988).

A utilização de partículas esféricas está apresentando melhores resultados no tratamento embólico do que a de partículas não-esféricas. Por isso, aumentou-se o interesse de médicos e pesquisadores no desenvolvimento e teste dessas partículas. Os índices de complicações no tratamento com partículas esféricas são menores em relação aos índices relativos ao uso de não-esféricas (KHANKAN *et al.*, 2004). Bendszus *et al.* (2000) mostram que partículas poliméricas esféricas são mais eficazes na embolização pré-operatória, resultando significativamente na menor perda de sangue no momento da cirurgia, em comparação a partículas de PVA não-esféricas, possivelmente pela maior penetração das partículas esféricas.

3.4. Partículas de PVA

Dentre as diversas substâncias, as partículas de PVA são os agentes embólicos mais utilizados, com um largo espectro de aplicações. Isso porque este material possui diversas propriedades físico-químicas interessantes, como biocompatibilidade e elasticidade, além da relativa permanência no local desejado (HERRERA *et al.*, 1982; TADAVARTHY; MOLLER; AMPLATZ, 1975).

Entretanto, as partículas de PVA existentes comercialmente apresentam alguns aspectos indesejáveis, como morfologia irregular (não uniformes) (Figura 5), o que facilita a sua aglutinação e agregação, dificultando sua passagem pelo cateter angiográfico ou limitando o grau de sua progressão dentro da lesão vascular, além do custo bastante elevado (DERDEYN *et al.*, 1995; JACK *et al.*, 1985; PELAGE *et al.*, 2002; RASULI *et al.*, 2008; REPA *et al.*, 1989; SHI *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 2002).



FIGURA 5. Partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas (PVA Embolization Particles - Cook® Medical) (Cook Medical, 2010).

Já partículas esféricas podem possuir características que minimizam essas complicações cirúrgicas por serem de mais fácil manuseio devido à sua uniformidade morfológica. O PVA esférico é uma combinação do conhecido PVA com o contorno esférico para melhor entrega por meio de cateteres, o que permite uma completa oclusão dos vasos alvos da embolização (PATEL; SOULEN, 2006).

As partículas de PVA começaram a ser utilizadas na década de 70, quando Porstman *et al.* (1974) utilizaram-nas para fechar defeitos cardíacos e Tadavarthy, Moller e Amplatz (1975) usaram em animais e em pacientes para descrever sua biocompatibilidade. Latchaw e Gold (1979) utilizam PVA para tratamento de lesões neoplásicas da cabeça, pescoço e medula espinhal, relatando inúmeras vantagens em relação a outros materiais embólicos.

Uma característica de maior relevância é o fato de ser possível agregar outros componentes às partículas desse polímero, como fármacos específicos ao tratamento de determinados tumores. O PVA tem potencial, portanto, de se transformar em um vetor de *drug delivery*, carregando um medicamento para regiões favoráveis ao tratamento, além de fazer a oclusão de vasos sanguíneos que irrigam e levam nutrientes à essa uma região tumoral (GREENFIELD, 1980; HEMINGWAY; ALLISON, 1988).

3.5. Partículas Esféricas de PVA/PVAc

3.5.1. Processos de Polimerização em Suspensão

Pela combinação de monômeros através de vários tipos de mecanismos de reação é possível obter diferentes polímeros sintéticos. A estrutura macromolecular de um polímero

depende não só da natureza química do monômero, do tipo de mecanismo de polimerização e do estado físico do sistema, mas também do tipo de processo e também do reator (KIPARISSIDES, 1996). Processos heterogêneos de polimerização, como os processos de polimerização em emulsão, em dispersão, por precipitação e em suspensão, são empregados para a produção de polímeros na forma de partículas (DOWDING; VICENT, 2000). Cada um apresenta características peculiares, permitindo produzir polímeros com as mais variadas propriedades, visando a diferentes tipos de aplicação.

Processos de polimerização em suspensão são apropriados para obtenção de produtos para aplicações biotecnológicas e médicas, como por exemplo, partículas com morfologia controlada para uso em embolização vascular (PEIXOTO *et al.*, 2006), suportes para enzimas ou cimentos ósseos para tratamento de osteoporose e para cirurgias dentárias (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

Em um sistema de polimerização em suspensão, monômeros insolúveis na água, contendo um iniciador solúvel na fase orgânica, são utilizados. Eles são dispersos numa fase aquosa contínua por uma combinação de forte agitação e uso de pequenas quantidades de agentes de suspensão, que agem como estabilizantes. Uma agitação mecânica satisfatória é suficiente para manter o monômero na forma de gotículas, que são lentamente convertidas de um estado líquido de alta mobilidade para uma mistura altamente viscosa e, finalmente, para uma partícula de polímero dura. Os agentes de suspensão impedem a coalescência e a quebra das gotas orgânicas suspensas na fase aquosa, estabilizando a gota de polímero. Há a possibilidade de aglomeração das gotas, quando a polimerização avança para o ponto onde a gota torna-se pegajosa, portanto, um dos desafios da técnica de polimerização em suspensão é prevenir a aglomeração da fase orgânica (YUAN; KALFAS; RAY, 1991).

A polimerização em suspensão corresponde, grosseiramente, a uma polimerização em massa dentro de cada gotícula de monômero suspensa no meio aquoso. São obtidas partículas esféricas de tamanhos e formas relativamente homogêneos. Além disso, o tamanho médio da partícula e a distribuição de tamanhos podem ser controlados de forma simples, manipulando-se a velocidade de agitação e a quantidade de agente de suspensão.

3.5.1.1. Agentes de Suspensão

A polimerização em suspensão geralmente requer a adição de pequenas quantidades de um agente de suspensão para impedir a coalescência e a quebra das gotas durante a polimerização. Ele pode afetar no tamanho e na forma das partículas, bem como na sua

cristalinidade e na transparência final. A maioria dos agentes de suspensão utilizados é pouco ou totalmente solúvel em água e um agente típico é constituído por polímeros polares, embora agentes inorgânicos insolúveis possam também ser usados. Ao contrário de agentes de suspensão poliméricos, muitos tipos de agentes inorgânicos podem ser removidos após a reação e, além disso, partículas inorgânicas são geralmente mais baratas que partículas poliméricas (DOWDING; VICENT, 2000). Surfactantes às vezes são também adicionados em baixas concentrações, com a finalidade de ajudar no processo de dispersão.

O agente de suspensão polimérico, quando dissolvido na fase aquosa, pode atuar de duas formas: primeiramente, ele diminui a tensão interfacial entre as gotas de monômero e a água, promovendo a dispersão das gotas; em segundo, suas moléculas são adsorvidas sobre a superfície das gotas de monômero, produzindo uma fina camada que evita a coalescência das gotas quando ocorre a colisão entre elas (YUAN; KALFAS; RAY, 1991). A tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis depende da temperatura, da concentração e da natureza química (por exemplo, grupamento hidroxila) dos agentes de suspensão presentes na superfície da gota (CHATZI; KIPARISSIDES, 1994).

Um dos fenômenos mais importantes que governam a estabilidade da suspensão é a adsorção do agente de suspensão sobre a superfície da fase dispersa. Quando a velocidade de agitação é aumentada, o diâmetro médio das gotas diminui sob a ação da tensão de cisalhamento. Então, para uma mesma quantidade de monômero, a área interfacial é aumentada, havendo conseqüentemente a necessidade de uma quantidade maior de agente de suspensão para cobrir toda a superfície das gotas (LAZRAK; BOLAY; RICARD, 1998).

O PVA (Figura 6) é um dos agentes de suspensão mais utilizados em polimerizações em suspensão; entretanto, muitos outros podem também ser empregados. Ele é comercialmente caracterizado por duas propriedades: a viscosidade da solução aquosa, que está diretamente ligada a sua massa molar, e o grau de hidrólise, que se refere à porcentagem de radicais que foram substituídos por hidroxilas durante a reação de hidrólise. A variação dessas duas propriedades permite obter uma ampla variedade de PVA com propriedades específicas. Sabe-se que o aumento da massa molar e do grau de hidrólise gera um produto com melhores propriedades mecânicas, porém menos solúvel em água (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

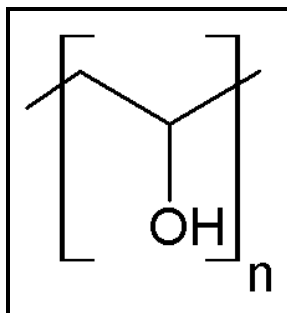


FIGURA 6. Fórmula estrutural do poli(álcool vinílico) (PVA).

3.5.1.2. Iniciadores

Os iniciadores utilizados em polymerizações em suspensão são solúveis na fase orgânica, já que a polimerização ocorre nas gotas do monômero. Durante a escolha do iniciador é importante considerar a solubilidade no monômero. Usualmente em polymerizações em suspensão são utilizados como iniciadores os peróxidos orgânicos e azocompostos, pois estes quase sempre são solúveis na fase monomérica orgânica. Os mais comuns são o peróxido de benzoíla (BPO) e o azobis(isobutironitrila) (AIBN).

A iniciação consiste na etapa responsável pela formação de radicais livres numa reação de polimerização em cadeia. Os iniciadores usualmente sofrem homólise, gerando os radicais livres por decomposição térmica ou fotoquímica (luz ultravioleta). A etapa de iniciação é composta por duas reações elementares:

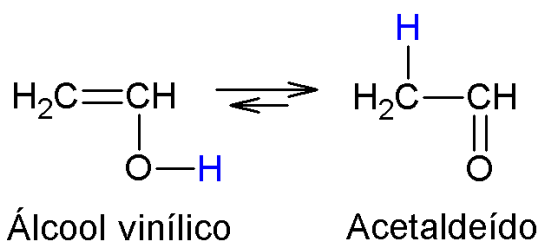
1. A geração de dois radicais ($2 R$) primários do iniciador (I) via decomposição térmica ($I \rightarrow 2 R$);
2. E a combinação do radical primário com uma molécula de monômero (M), resultando na formação da cadeia polimérica (P) composta de uma unidade monomérica ($R + M \rightarrow P$).

3.5.2. Síntese de Partículas Esféricas de PVA/PVAc

Partículas de PVA não podem ser preparadas pela polimerização direta do álcool vinílico (VA) devido ao seu tautomerismo⁷. Um composto, cuja estrutura possui um grupo OH ligado a um dos átomos de carbono da ligação C=C, denomina-se enol. Quando se tenta

⁷ Compostos, cujas estruturas diferem uma da outra pela disposição dos átomos, mas que se encontram em equilíbrio rápida e facilmente atingível, dizem-se tautômeros. O tipo mais freqüente de tautomerismo é apresentado por estruturas que se diferem no ponto onde se liga um átomo de hidrogênio. Fonte: MORRISON, R.; BOYD, R. *Química Orgânica*. 13. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.504-505, 1996.

preparar um composto com estrutura enólica, obtém-se, quase sempre, um composto com um grupo carbonila (C=O), ou seja, um ceto-composto (MORRISON; BOYD, 1996). Existe um equilíbrio entre as duas estruturas, mas, geralmente, muito deslocado em favor da ceto-estrutura. As tentativas de preparar VA resultam rapidamente na formação de uma mistura, em equilíbrio, constituída quase inteiramente por acetaldeído (Esquema 1).



ESQUEMA 1. Representação de um tautomerismo ceto-enólico, onde o equilíbrio desloca-se, geralmente, no sentido da estrutura onde o hidrogênio se encontra ligado ao átomo de carbono e não no daquela onde se encontra ligado ao átomo mais eletronegativo (MORRISON; BOYD, 1996).

Elas são, geralmente, obtidas a partir de poli(vinil ésteres), tais como PVAc e poli(pivalato vinílico) (PVPi). O meio mais convencional de produzi-las envolve duas etapas: a polimerização do VAc em PVAc e uma posterior etapa de hidrólise alcalina do PVAc, usando uma base forte, para a troca o grupo acetato existente no polímero com o grupo hidroxila, resultando em PVA (COPPE/UFRJ; First Line Ind. Com. S/A, 2006; LYOO; LEE, 2002).

Na primeira etapa, que se trata de uma polimerização em suspensão para a formação de partículas esféricas, realiza-se a poliadiação dos monômeros. Como em uma típica reação de polimerização em suspensão, o processo de síntese requer reagentes que têm funções específicas: o monômero, o solvente do monômero (solvente orgânico), o iniciador e o agente de suspensão. Todos são adicionados em solução aquosa sob velocidade de agitação e temperatura controladas.

Para sintetizar partículas destinadas a tratamentos de embolização, por serem partículas implantáveis, uma série de cuidados devem ser tomados na escolha dos reagentes que, preferencialmente, devem ser não tóxicos e que melhorem a biocompatibilidade (COPPE/UFRJ; First Line Ind. Com. S/A, 2006).

Um exemplo é o uso do VAc ($\text{CH}_3\text{COOCHCH}_2$) puro como monômero. Uma das propriedades desse composto é que ele é biocompatível e isso não ocorre com outros compostos vinílicos. A partir dele, forma-se o PVAc ($[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}]_n$).

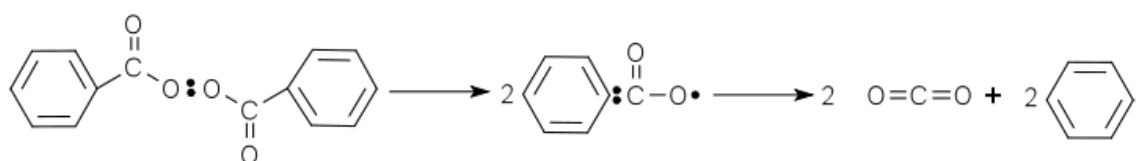
Como iniciador, usa-se o BPO ($C_{14}H_{10}O_4$) também porque é biocompatível, sendo até utilizado no tratamento antiacne, e bom bactericida de microorganismos anaeróbicos. No entanto, outros iniciadores com a capacidade de gerar radicais livres podem ser usados, como outros peróxidos, desde que sejam solúveis em VAc.

O agente de suspensão pode ser um sal de composto orgânico alifático, um polímero polar ou derivado da hidróxicelulose (COOK *et al.*, 1996; COPPE/UFRJ; First Line Ind. Com. S/A, 2006). O PVA ($[CH_2CHOH]_n$) é usado também por ser biocompatível e, sabendo-se que as partículas finais terão a composição química do mesmo, seu uso como agente de suspensão é seguro.

O solvente usado para o monômero precisa ser ao mesmo tempo insolúvel em água. Vários compostos orgânicos podem ser usados nesse caso, porém o terc-butanol ($C_4H_{10}O$) não é solúvel em água e é miscível no Vac, no PVAc e no BPO, sendo perfeitamente indicado para esse uso.

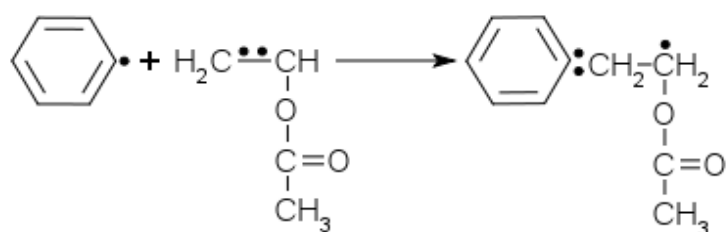
O principal requisito para a fase de saponificação é que a base forte usada precisa ser solúvel em água. Dessa forma o NaOH é compatível e usado como o agente de troca. Além disso, o sódio é um composto presente na maior parte dos seres vivos.

Os processos químicos envolvidos na etapa da polimerização possuem subdivisões típicas de uma reação de poliadição, tais como a iniciação, a propagação e a terminação da cadeia polimérica. O Esquema 2 mostra a formação de radicais livres a partir do BPO, que ocorre quando a ligação entre os oxigênios é rompida devido ao ganho de energia cinética das moléculas.



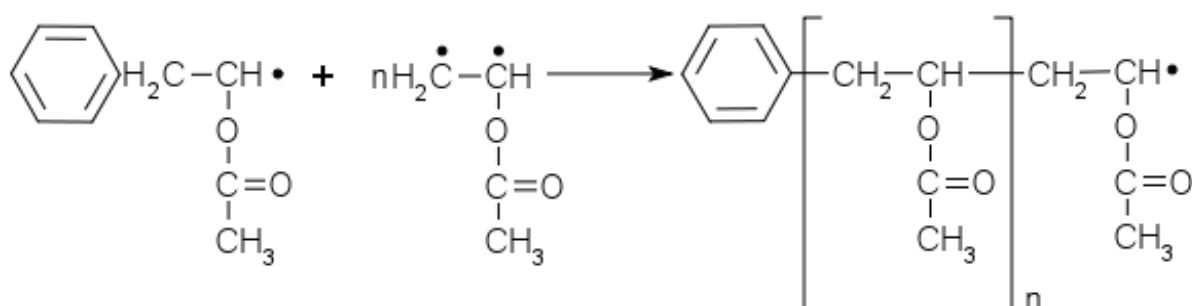
ESQUEMA 2. Formação dos radicais livres benzoílas a partir do peróxido de benzoíla (BPO).

Em seguida, cada radical livre “ataca” um monômero VAc desencadeando a iniciação da cadeia polimérica, conforme mostrado no Esquema 3.



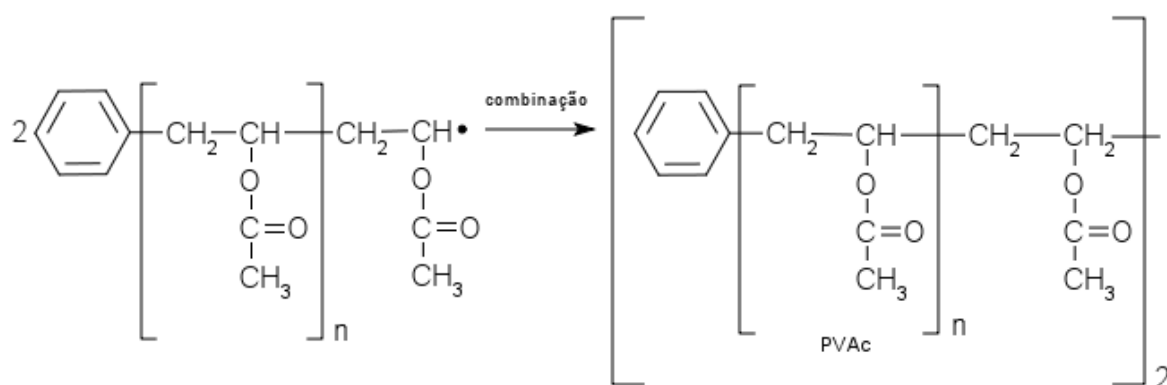
ESQUEMA 3. Iniciação da cadeia polimérica na formação do poli(acetato vinílico) (PVAc).

Após os radicais livres se ligarem aos monômeros, a polimerização entra no estágio da propagação da cadeia (Esquema 4), com a ligação sequencial das unidades monoméricas.



ESQUEMA 4. Propagação da cadeia polimérica na formação do poli(acetato vinílico) (PVAc).

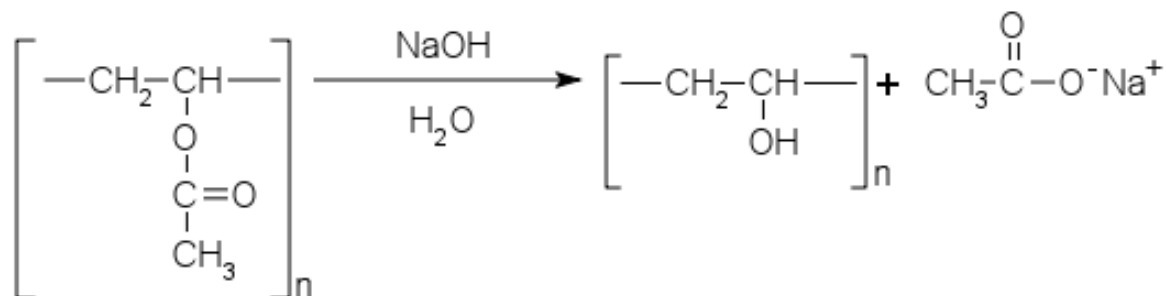
Em seguida, por combinação, a cadeia polimérica é finalizada (Esquema 5) (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).



ESQUEMA 5. Terminação da cadeia polimérica, por combinação, na formação do poli(acetato vinílico) (PVAc).

A segunda etapa do processo é a saponificação do produto obtido na etapa da polimerização, através da adição de solução de NaOH sob velocidade de agitação e temperatura controladas. O objetivo desta etapa está na troca do grupo acetato (CH_3COO) existente no PVAc com o grupo hidroxila (OH) existente na solução alcalina para a formação

do PVA, um processo reacional típico de adição de éster e base para a formação de um álcool (Esquema 6).



ESQUEMA 6. Hidrólise alcalina do poli(acetato vinílico) (PVAc) para obtenção do poli(álcool vinílico) (PVA), obtendo como subproduto o acetato de sódio (CH_3COONa).

A maioria das partículas de PVA disponível comercialmente possui a morfologia não-esférica, no entanto, utilizando-se a metodologia de síntese descrita acima é possível obter um maior controle da morfologia do produto. Assim, as partículas esféricas obtidas por este processo eliminam as desvantagens do PVA não-esférico comercializado, diminuindo consideravelmente as complicações durante o procedimento de embolização.

3.6. Dados Econômicos

As microesferas de PVA/PVAc estão sendo desenvolvidas em um convênio com o programa de pós-graduação em Biofísica Molecular do IBILCE/UNESP e a Braille Biomédica Ind. Com. Rep. Ltda. (empresa localizada na cidade de São José do Rio Preto - SP). Elas possuirão um valor mercadológico que ocasionará competitividade com todas as demais disponíveis no mercado exterior.

Dentre as micropartículas disponíveis comercialmente, que são utilizadas por todo o mundo em tratamentos de embolização, destacam-se:

- a. Bead Block™ Compressible Microspheres for Embolization (Biocompatibles™ Oncology Products Division - Farnham, Surrey, UK): consta de uma série de microesferas compressíveis de N-Fil™ hidrogel que são biocompatíveis, hidrofílicas, não reabsorvíveis e calibradas com precisão. Elas contêm PVA e são produzidas por um processo chamado polimerização em emulsão inversa. Encontram-se disponíveis nas classes de tamanhos: 100-300, 300-500, 500-700, 700-900 e 900-1200 μm (Figura

7) (Biocompatibles, 2011). Bead Block™ é um dispositivo embólico destinado a causar embolização de vasos sanguíneos de uma variedade de THVs (por exemplo, mioma uterino) e MAVs;



FIGURA 7. Bead Block™ (Biocompatibles™) são microesferas comercializadas em cinco tamanhos diferenciados pelas cores das seringas que as contêm (Biocompatibles, 2011).

- b. Contour® PVA Embolization Particles (Boston Scientific™ - Natick, Massachusetts, USA): são partículas de PVA, não-esféricas (Figura 8), projetadas para promover o bloqueio de vasos rápida e eficazmente. Uma variedade de tamanhos de partículas (45-150, 150-250, 250-355, 355-500, 500-710, 710-1000 e 1000-1180 μm) atende a uma variedade de aplicações clínicas, tais como desvascularização e redução de volume de THVs e desvascularização de MAVs (Boston Scientific, 2011);



FIGURA 8. Contour® PVA Embolization Particles (Boston™ Scientific) são partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas (Boston Scientific, 2011).

- c. EmboSphere® Microsphere (Biosphere® Medical - South Jordan, Utah, USA): são microesferas biocompatíveis, hidrofílicas, não reabsorvíveis e produzidas a partir de

um polímero acrílico e impregnadas com gelatina suína. Estão disponíveis nos seguintes tamanhos de esferas calibradas: 40-120, 100-300, 300-500, 500-700, 700-900 e 900-1200 μm (Figura 9) (Biosphere Medical, 2004). Essas microesferas foram liberadas pela *Food and Drug Administrator* (FDA) em abril de 2000 para comercialização nos Estados Unidos. São utilizadas em THVs e MAVs. Devido a sua forma esférica e sua superfície uniforme, macia e escorregadia, elas são fáceis de administrar por meio de cateteres, resultando em uma distribuição uniforme dentro da rede vascular destinada;



FIGURA 9. Embosphere[®] Microsphere (Biosphere[®] Medical) são microesferas gelatinosas (Biosphere Medical, 2004).

- d. Embozene[®] Microspheres (Celo[®] Nova Bioscience - Peachtree City, Georgia, USA): Color-Advanced Microspheres são microesferas que consistem de um núcleo de hidrogel com uma casca de Polyzene[®]-F (um polímero flexível) proporcionando importantes benefícios, como calibração precisa, suspensão estável, integridade estrutural e elevada biocompatibilidade. São esferas coloridas disponíveis nos tamanhos: 40 ± 10 , 75 ± 15 , 100 ± 25 , 250 ± 50 , 400 ± 50 , 530 ± 50 , 700 ± 50 , 900 ± 75 , 1100 ± 75 e 1300 ± 75 μm (Figura 10). (Celo Nova Biosciences, 2010). São indicadas para tratamentos de embolização de THVs, MAVs, carcinoma hepatocelular, mioma uterino, hemorragias e redução de sangramentos pré-operatória (STAMPFL *et al.*, 2008a; STAMPFL *et al.*, 2008b; STAMPFL, S. *et al.*, 2009; STAMPFL, U. *et al.*, 2009);

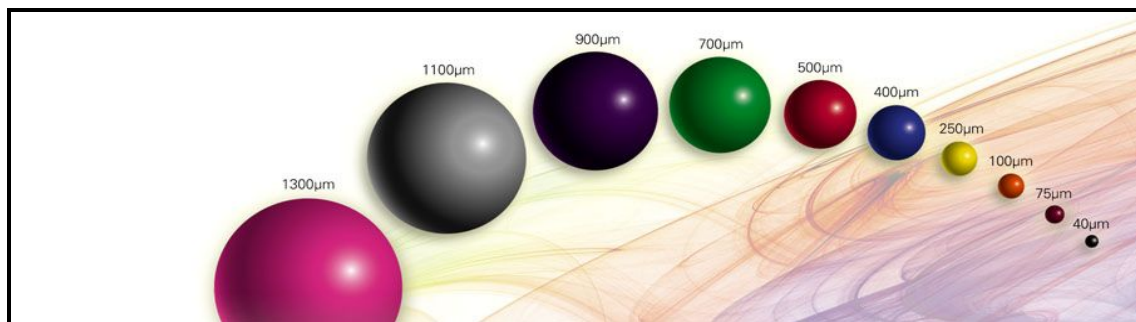


FIGURA 10. Embozene® Microspheres (Celo® Nova) são microesferas poliméricas comercializadas em dez tamanhos e cores diferentes (Celo Nova Bioscience, 2010).

- e. PVA Embolization Particles (Cook® Medical - Bloomington, Indiana, USA): são partículas de PVA não-esféricas disponíveis nos tamanhos: 90-180, 180-300, 300-500, 500-710, 710-1000, 1000-1400, 1400-2000 e 2000-2800 μm (Figura 11). São destinadas a tratamentos de embolização de lesões vasculares, THVs e MAVs, incluindo o uso na embolização intracraniana (Cook Medical, 2010). Possuem uma variedade de tamanho que permite a aplicação tanto em vasos pequenos como em grandes vasos.



FIGURA 11. PVA Embolization Particles (Cook® Medical) são partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) não-esféricas comercializadas em uma grande variedade de tamanhos: de 90 até 2800 μm (Cook Medical, 2010).

O mercado para embolização é expressivo e estima-se que a venda de dispositivos embólicos esteja crescendo a uma taxa de aproximadamente 14% ao ano. Levando-se em conta apenas o mercado da América Latina, onde o Brasil é responsável por cerca de 40% do mercado, o consumo de produtos para embolização em 2008 ultrapassou os U\$ 35 milhões. O uso de microesferas em tecnologia médica possui um crescimento anual estimado em 24,5%. Este setor estava avaliado em U\$ 481 milhões em 2010 e deve chegar a 1,4 bilhões de dólares em 2015 (BCC Research, 2010). As partículas relacionadas acima são vendidas nacionalmente entre R\$ 500,00 e R\$ 1000,00 por grama. A Braile Biomédica pretende lançar

as microesferas de PVA/PVAc como um produto embólico a um preço competitivo, forçando o mercado a diminuir o alto valor cobrado por partículas para embolização.

Com a redução do custo das partículas, um número maior de pacientes poderá ser beneficiado pelo tratamento. Além de ampliar o número de tratamentos utilizados, com o domínio da tecnologia de fabricação das partículas esféricas de PVA/PVAc para embolização, o Brasil poderá competir com as multinacionais passando de importador a exportador, gerando divisas ao país na medida em que o produto for exportado.

3.7. Dados Sociais

Os miomas uterinos acometem cerca de 40% das mulheres em idade fértil, das quais cerca de 20% apresentam dores e sangramentos anormais durante a menstruação. O procedimento mais utilizado para tratar miomas é a histerectomia, ou seja, a retirada do útero, tonando essas mulheres inférteis (MCCARTHY-KEITH; DESIREEE; ARMSTRONG, 2011). A maioria delas depende exclusivamente do Sistema Único de Saúde (SUS) para o seu atendimento e todo ano aproximadamente 200 mil mulheres são submetidas à cirurgia de retirada do útero, na maior parte dos casos por possuírem miomas (KISILEVZKY; ELKIS, 2011).

Kisilevzky e Elkis (2011) reportam um estudo clínico que comprova a viabilidade e segurança da embolização de miomas uterinos em hospitais públicos. Os resultados demonstram que:

- 90% das pacientes apresentaram melhora no quadro clínico;
- 95% ficaram satisfeitas com os resultados;
- 97,5% recomendariam o procedimento e
- Um aumento na qualidade de vida de 40 pontos antes do tratamento para 80 pontos depois (numa escala de 100) (KISILEVZKY; ELKIS, 2011).

O projeto, denominado Angiomóvel (Unidade de Radiologia Intervencionista Móvel), objetivou percorrer hospitais públicos de São Paulo com um caminhão baú, levando equipamentos e materiais de alta tecnologia às mulheres de baixa renda para a realização de embolizações uterinas. Os dados deste estudo embasaram um requerimento enviado à Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE) do Ministério da Saúde

para a inclusão da embolização uterina entre os procedimentos médicos cobertos pelo SUS (KISILEVZKY; ELKIS, 2011).

A embolização de miomas uterinos é um tratamento relativamente simples, com taxa de sucesso de cerca de 90%. As pacientes submetidas a este tratamento necessitam permanecer menos tempo no hospital, por ser um procedimento minimamente invasivo, e obtêm um rápido retorno às atividades normais, além da brusca redução do índice de infertilidade. Porém, a embolização uterina ainda não é rotineiramente oferecida em hospitais públicos no Brasil devido ao alto custo, à falta de estrutura tecnológica, de equipamentos, de materiais e de equipes médicas especializadas, privando a maioria das mulheres de baixa renda desse benefício (KISILEVZKY, ELKIS, 2011; KISILEVZKY, MARTINS, 2003).

4. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Sintetizar partículas esféricas de PVA/PVAc, com possíveis adequações nas metodologias de síntese encontradas na literatura, em tamanhos que variam de 30 até 1200 μm .
 - Caracterizar físico-quimicamente as principais amostras de partículas, por meio de MEV, DRX, DSC e ^{13}C RMN CP/MAS.
 - Determinar a distribuição de tamanhos e a dimensão fractal de algumas amostras de partículas.
 - Quantificar os microorganismos presentes nas partículas antes de sua esterilização, através da análise *Bioburden*.
 - Esterilizar as partículas por radiação gama e verificar se ocorreu ou não uma modificação estrutural das partículas durante a radiação.
 - Analisar a toxicidade das partículas através de análises de citotoxicidade *in vitro*.
-

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Materiais

Todos os reagentes químicos foram usados sem prévia purificação. O BPO (dosagem mínima de 65% e água máxima de 25%) e o PVA (grau de hidrólise entre 86,5 e 89,5%) foram adquiridos da Vetec Química Fina (Duque de Caxias, Brasil). A solução de NaOH (50% em água) e o sulfato de sódio (Na_2SO_4) (pureza superior a 99,0%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O VAc (pureza superior a 99,5%) e o terc-butanol (pureza superior a 99%) foram adquiridos da MERCK (Darmstadt, Alemanha). Água com qualidade Mili-Q (obtida de um sistema de purificação com resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$, Maxima USF ELGA, High Wycombe, Reino Unido) foi utilizada como meio reacional.

5.2. Preparo das Amostras

As partículas esféricas de PVA/PVAc foram sintetizadas por um procedimento diferenciado desenvolvido com modificações de procedimentos reportados na literatura (COPPE/UFRJ; First Line Ind. Com. S/A, 2006; LEE *et al.*, 2005; LEE; LYOO, 2008; LYOO; LEE, 2002; PEIXOTO *et al.*, 2006).

A síntese completa das partículas, portanto, foi realizada com a utilização dos seguintes reagentes:

- PVA, como agente de suspensão (composto usado para prevenir a aglutinação das gotas de monômero);
- BPO, como iniciador (composto que emite radicais livres quando submetido à ação térmica e/ou a outro mecanismo de estímulo para a liberação desses radicais);
- VAc, como monômero (pré-composto do polímero desejado);
- terc-butanol, como solvente do monômero (composto orgânico não solúvel em água);
- NaOH, como agente de troca (base que permite a troca do grupamento hidroxila com o grupo acetato para a obtenção do produto final);
- Na_2SO_4 , como agente de dispersão.

Nas reações de polimerização, 0,07 g de agente de suspensão, PVA, foi dissolvido em 100 mL de água, sob agitação controlada (Agitador Magnético, MA-089 - Marconi, Piracicaba, Brasil) em um reator encamisado (Figura 12), de capacidade de 1 L, conectado à um condensador, sob passagem de nitrogênio. Para a pesagem dos reagentes foi utilizada a

balança analítica Analytical Plus - OHAUS® (Parsippany, Estados Unidos). Após a dissolução parcial do agente de suspensão, uma solução contendo 25 mL de VAc, 25 mL de terc-butanol e 1 g de BPO foi adicionada à solução aquosa a uma temperatura constante de 60 °C. O sistema foi mantido sob condições isotérmicas, sob agitação controlada, por quatro horas.



FIGURA 12. Reator encamisado, de capacidade de 1 L, utilizado para realizar as sínteses das partículas esféricas.

Após esse período, as reações foram interrompidas e as soluções resfriadas à temperatura na faixa de 35 °C. Em seguida, as partículas foram lavadas com água destilada e filtradas várias vezes antes de iniciar a etapa de saponificação. Na reação de saponificação, adicionou-se pequenas quantidades de Na_2SO_4 e lentamente 100 mL de solução de NaOH com diferentes concentrações molares (Tabela 1). Esta última etapa permaneceu, sob agitação, por duas horas.

Por fim, as partículas de PVA/PVAc resultantes foram lavadas inúmeras vezes com água destilada e congeladas para serem secas no liofilizador (Liotop - Liobras, São Carlos,

Brasil). Elas foram secas à vácuo em uma temperatura de -50 °C por 24 horas. Depois de secas, foram peneiradas e separadas por tamanho.

Foram realizadas 14 sínteses com variações de parâmetros, como agitação e concentração de NaOH (Tabela 1), que influenciaram no produto final.

TABELA 1. Condições de polimerização e saponificação das partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) / poli(acetato vinílico) (PVAc).

Amostra	Concentração de NaOH (mol/L)	Velocidade de Agitação (rpm)
1	25	700
2	20	700
3	16	700
4	12	700
5	8	700
6	4	700
7	2,5	600
8	2,5	700
9	2,5	800
10	2,5	900
11	2,5	1000
12	5	800
13	10	900
14	25	600

5.3. Caracterização das Amostras

As partículas obtidas foram comparadas com as partículas de PVA existentes no mercado, da Boston Scientific (Contour PVA Embolization Particles) e da Cook Medical (PVA Foam Embolization Particles). Foram realizadas as análises de distribuição de tamanhos e de dimensão fractal das partículas de PVA/PVAc sintetizadas, assim como das partículas

comerciais. Elas foram também caracterizadas por MEV, DRX, DSC e ^{13}C RMN CP/MAS. Foi realizada uma análise complementar de determinação da biocarga para determinar os parâmetros de esterilização por radiação gama. Depois de esterilizadas, as partículas foram analisadas por DRX novamente para verificação da possível modificação estrutural. E, o último teste realizado foi o teste de Reatividade Biológica *in vitro*, para avaliação do potencial de citotoxicidade.

5.3.1. Determinação da Distribuição de Tamanhos

Utilizando peneiras (Bertel, Caieiras, Brasil) com poros de 106, 300, 500, 710, 850 e 1180 μm , as partículas foram separadas por tamanhos (< 106 , 106-300, 300-500, 500-710, 710-850, 850-1180 e > 1180 μm). Após separação, elas foram pesadas para determinação da quantidade de partículas, em massa, em cada intervalo de tamanho. Assim, foram determinadas as distribuições de tamanhos com a utilização do programa OriginPro, versão 7.0.

5.3.2. Medida da Dimensão Fractal

As medidas da dimensão fractal foram realizadas utilizando o programa ImageJ, versão 1.45k. As curvas, para determinação da dimensão das partículas, foram geradas pelo método de BoxCounting. O BoxCounting é um dos métodos mais conhecidos e utilizados para estimar a dimensão fractal⁸ de uma forma ou imagem e isso se deve a sua simplicidade de implementação. Esse método consiste em cobrir a imagem, ou objeto, a ser analisada com quadrados de lados r e contar o número de quadrados, $N(r)$, necessários para cobrir toda a forma. Neste método, não é importante o número de pontos envolvidos por cada um dos quadrados, pois cada quadrado que envolve um ou mais pontos é contado apenas uma vez (FALCONER, 1997; TRICOT, 1995).

⁸ A dimensão fractal é a dimensão que caracteriza uma estrutura fractal, ou seja, uma estrutura não-homogênea, não-simétrica. Os padrões irregulares como, por exemplo, a forma de uma nuvem, de uma montanha, etc., necessitam da existência de uma forma diferente de geometria, que atenda à descrição desses padrões fragmentados existentes na natureza. Para isso, o matemático francês Benoit Mandelbrot criou o termo fractal, originário do latim fractus, cujo significado é quebrado, fragmentado, para descrever alguns tipos de fenômenos espaciais e temporais. Fonte: JONES, H. *Fractals Before Mandelbrot - A Selective History*. In: Crilly, A. J.; Earnshaw, R. A.; Jones H. (Ed.). *Fractal and Chaos*. New York: Springer-Verlag New York Inc., p. 7-33, 1991.

Quando este procedimento é aplicado em uma linha reta, esperamos um comportamento $N(r)$ proporcional a $1/r$, pois, com a diminuição do comprimento r , são necessários mais quadrados para que o processo seja terminado. Para objetos bidimensionais, a relação passa a ser $N(r)$ proporcional a $1/r^2$. Para formas mais complexas, ela toma a forma de uma relação do tipo $N(r) = \frac{k}{r^d}$, uma lei de potência, com k sendo uma constante de proporcionalidade e d a dimensão (FALCONER, 1997; TRICOT, 1995).

Desenvolvendo esta relação com a ajuda de logaritmos, chega-se à seguinte equação:

$$\log[N(r)] = \log\left(\frac{k}{r^d}\right) = \log k - d \cdot \log r \quad (1)$$

Para calcular o valor de d :

$$d = \frac{\log k}{\log r} - \frac{\log [N(r)]}{\log r} \quad (2)$$

Esta aproximação deve tornar-se melhor com a diminuição de r , ou seja,

$$d = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log k}{\log r} - \frac{\log [N(r)]}{\log r} \quad (3)$$

Quando $r \rightarrow 0$, $\frac{\log k}{\log r} \rightarrow 0$. Assim,

$$d = - \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log [N(r)]}{\log r} = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log [N(r)]}{\log \left(\frac{1}{r}\right)} \quad (4)$$

onde d é a dimensão fractal calculada pelo método de BoxCounting. Verifica-se que a Equação 1 é a equação de uma reta com coeficiente angular d . No entanto, d é determinada através da construção de um gráfico de $\log[N(r)]$ vs. $\log r$.

5.3.3. Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de MEV foram registradas utilizando um instrumento Phillips XL30 FEG, operando com um feixe de elétrons regulável para tensões de 5 a 25 kV. Antes da realização das análises, foi depositada sobre as partículas uma fina camada de ouro.

5.3.4. Medida de Difração de Raios-X

Os resultados de DRX foram coletados em um difratômetro Rigaku Rotaflex RU200B (Tokyo, Japão), usando uma placa plana de geometria Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), 50 kV e 100 mA, equipado com um monocromador de grafite. Os difratogramas foram registrados em um intervalo de $2\theta = 5\text{-}80^\circ$, com um *step scan* de $0,02^\circ$ e uma taxa de 10 s/step .

5.3.5. Medida de Calorimetria Diferencial de Varredura

Pequenas quantidades de partículas secas (2,2 mg) foram caracterizadas por DSC (Netzsch 404C controlado por TASC 424/3A, Selb, Alemanha), entre 25 e 300°C , utilizando uma panelinha de platina. O equipamento foi calibrado contra um padrão de índio ($T_m = 158,5^\circ\text{C}$). Foi utilizada uma taxa de aquecimento constante de 10°C/min e um fluxo de $0,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ de nitrogênio.

5.3.6. Medida de Ressonância Magnética Nuclear

As medidas de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Varian Inova (Palo Alto, California, USA), operando em 400 MHz para o ^1H e em 100,5 MHz para o ^{13}C . Foi utilizada uma sonda modelo Jackobsen com um rotor de 5 mm. Os espectros foram obtidos utilizando o método CP/MAS com variação da amplitude linear do pulso de ^1H (COOK *et al.*, 1996; DRIA; SACHLEBEN; HATCHER, 2002; PEERSEN *et al.*, 1993). A intensidade do campo de dissociação do ^1H aplicado durante a aquisição do sinal foi de 60 kHz. O tempo de contato foi de 1 ms e a frequência de rotação de 10 kHz, ciclos de atraso em 3 s foram usados.

5.3.7. Análise da Biocarga

A análise da biocarga foi realizada para quantificar os microorganismos presentes nas partículas antes de sua esterilização e determinar os parâmetros para esterilização. No caso da esterilização por radiação gama, a variável é a quantidade de radiação (em kGy) necessária para inativar um determinado número de microorganismos (biocarga) e, conseqüentemente, esterilizar o produto (MO BIO, 2010).

Foram analisadas as partículas de alta (25 mol/L) e de baixa (2,5 mol/L) cristalinidade e a análise foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Braile Biomédica (ANSI/AAMI/ISO 11.137-1, 1995). Foram utilizados 1,107 g de partículas de PVA/PVAc de 2,5 mol/L e 1,025 g de partículas de PVA/PVAc de 25 mol/L.

Para a extração dos microorganismos, as amostras de partículas foram pesadas e transferidas para um erlenmeyer estéril de capacidade de 250 mL. Foram adicionados 150 mL de solução fisiológica estéril e as amostras foram mantidas sob agitação, a 200 rpm, durante uma hora a temperatura ambiente. Após a agitação, 50 mL da solução foram transferidos para outro erlenmeyer estéril e incubados em banho-maria a 80 °C durante 30 minutos para análise de esporos. Os 100 mL restantes foram mantidos a temperatura ambiente para análise de bactérias heterotróficas e fungos. Após o término da incubação, as amostras foram filtradas por membrana Millipore estéril de 0,45 µm (HAWG 047S6) utilizando um minifold de três bocas (PO-07-169). O procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica, previamente limpa. Em cada boca, foi acoplado um funil estéril. Na primeira boca, foram filtrados 50 mL da amostra incubada a 80 °C e nas bocas 2 e 3 foram filtrados 50 mL da amostra mantida a temperatura ambiente. Ao término da filtração cada membrana foi incubada nos respectivos meios de cultura (preparados de acordo com o PO-07-151):

- a. Pesquisa de esporos: incubada em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA - Difco), a uma temperatura de $32,5 \pm 2,5$ °C e tempo de incubação de sete dias.
- b. Pesquisa de fungos: incubada em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (Difco), com temperatura de incubação de $22,5 \pm 2,5$ °C e tempo de sete dias.
- c. Pesquisa de bactérias heterotróficas: incubada em meio de cultura TSA (Difco), a temperatura de $32,5 \pm 2,5$ °C por sete dias.

5.3.8. Esterilização por Radiação Gama

Antes de iniciar os estudos das variáveis biomédicas e citológicas do processo de síntese das partículas esféricas de PVA/PVAc, elas foram esterilizadas com radiação gama. Com objetivo de avaliar a compatibilidade das partículas sintetizadas, as amostras de partículas de 2,5 e 25 mol/L foram expostas aos raios gama, emitidos pelo radioisótopo ^{60}Co . As amostras foram submetidas às seguintes doses: 0, 20, 30, 40 e 50 kGy. Elas foram identificadas com as respectivas doses e receberam selos radiosensíveis, indicativos de processo (amarelo - não tratado; laranja e vermelho - tratado). As embalagens foram abertas

nas dependências da Companhia Brasileira de Esterilização (CBE) para obtenção das amostras e verificação de possíveis alterações visuais. O dosímetro utilizado foi do tipo Red Perspex e o espectrofotômetro utilizado foi o Harwell Dosimeters (Oxfordshire, UK), com comprimento de onda de 640 nm (CBE Embrarad, 2011).

5.3.9. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade *in vitro*

As amostras de partículas de 2,5 e 25 mol/L foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) para a realização da avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*. Foi utilizado o Método de Difusão em Agar com a linhagem celular NCTC Clone 929. Células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL-1) foram semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas para formação da monocamada celular. O meio de cultura líquido foi substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio 2x concentrado e Agar com vermelho neutro. As amostras foram colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas novamente incubadas por 24 horas. Observou-se macro e microscopicamente o índice de zona (IZ) que é a área não corada pelo corante vital. As amostras foram testadas em quadruplicatas em placas separadas (ASTM F895-84, 1984; ISO 10.993-5, 2009; US PHARMACOPEIA 32, 2009).

TABELA 2. Análise da reatividade biológica *in vitro* das amostras. A toxicidade é classificada de acordo com o valor do índice de zona (IZ) observado nas amostras.

IZ	Descrição	Classificação
0	Nenhuma zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5-1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Controle positivo: fragmento de 0,5 cm x 0,5 cm de látex tóxico.

Controle negativo: disco de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Morfologia, Dimensão Fractal e Distribuição de Tamanhos

Pode-se observar, pelas imagens de MEV, que as partículas sintetizadas possuem morfologia esférica (Figuras 13b, 14b e 15b), ao contrário da morfologia observada para as partículas comerciais (Cook Medical) (Figuras 13a, 14a e 15a). A esfericidade é obtida na primeira etapa da síntese, na etapa da polimerização, portanto, as condições de saponificação não influenciam na morfologia das partículas.

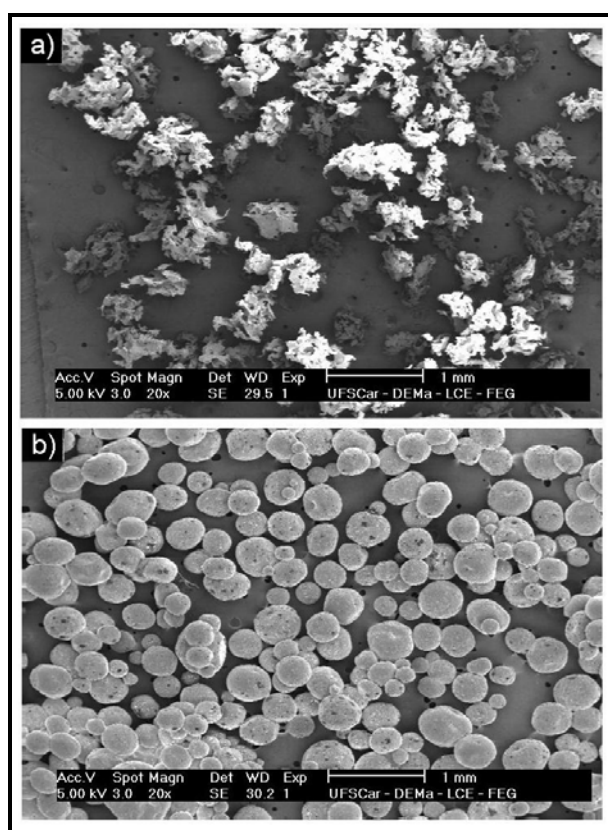


FIGURA 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 20x: (a) amostra comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm).

A esfericidade obtida é importante, pois minimizará o aspecto desvantajoso do uso de partículas de PVA não-esféricas, como a aglutinação nos cateteres, o uso de uma quantidade maior de partículas para promover a oclusão e o uso de pressões elevadas que podem espalhar as partículas no sistema circulatório (PELAGE *et al.*, 2002; RASULI *et al.*, 2008).

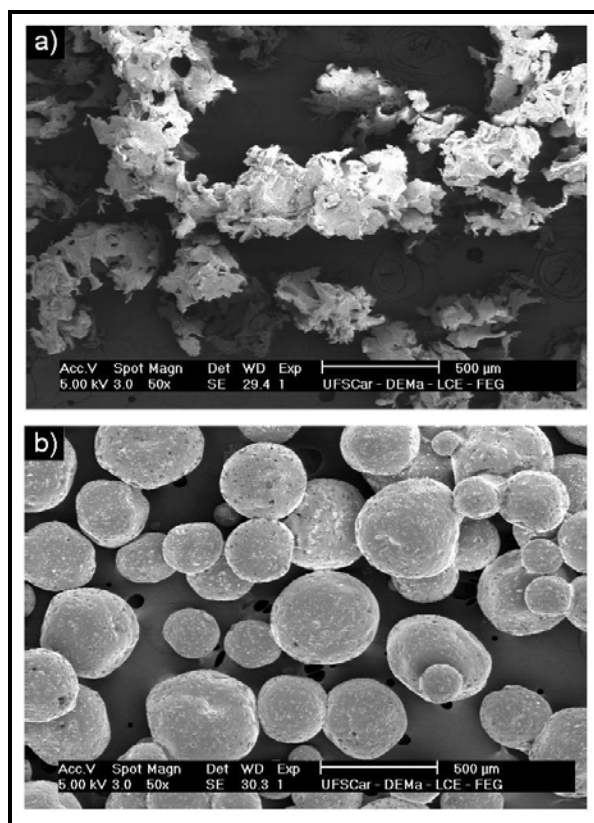


FIGURA 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 50x: (a) amostra comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm).

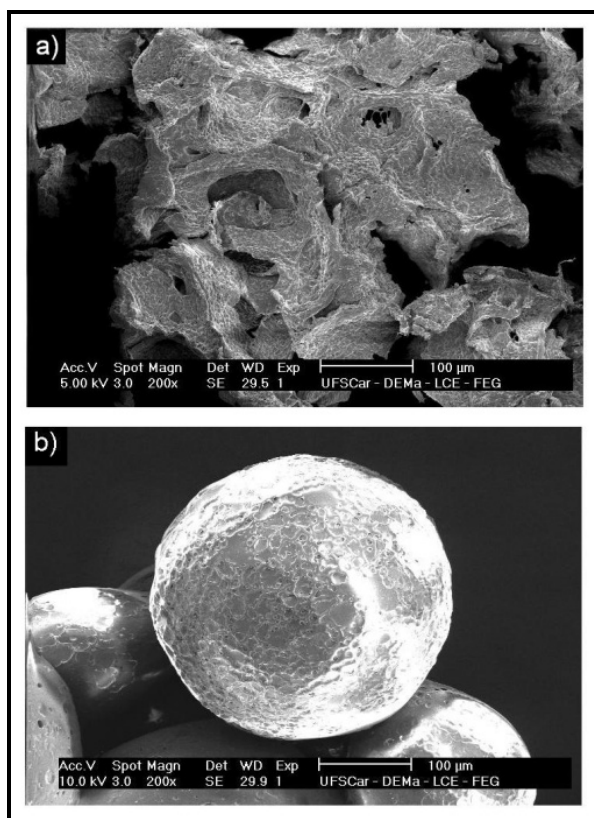


FIGURA 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 200x: (a) amostra comercial (Cook Medical) e (b) amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm).

Com relação à coloração, as amostras 1 e 14, saponificadas com solução de NaOH de 25 mol/L, apresentaram-se avermelhadas e contendo partículas mais “soltas”. Essa coloração vermelha é atribuída à intensa concentração de base utilizada, conforme relatado em COPPE/UFRJ e First Line Ind. Com. S/A (2006). As amostras 2, 3, 4, 5 e 13 apresentaram-se amareladas e as amostras 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 eram compostas por partículas brancas e mais “pegajosas”.

As análises da dimensão fractal das imagens das amostras 1, 10 e comercial (Cook Medical) (Figuras 16, 17 e 18) indicaram que a amostra comercial possui maior dimensão fractal em relação às demais amostras.

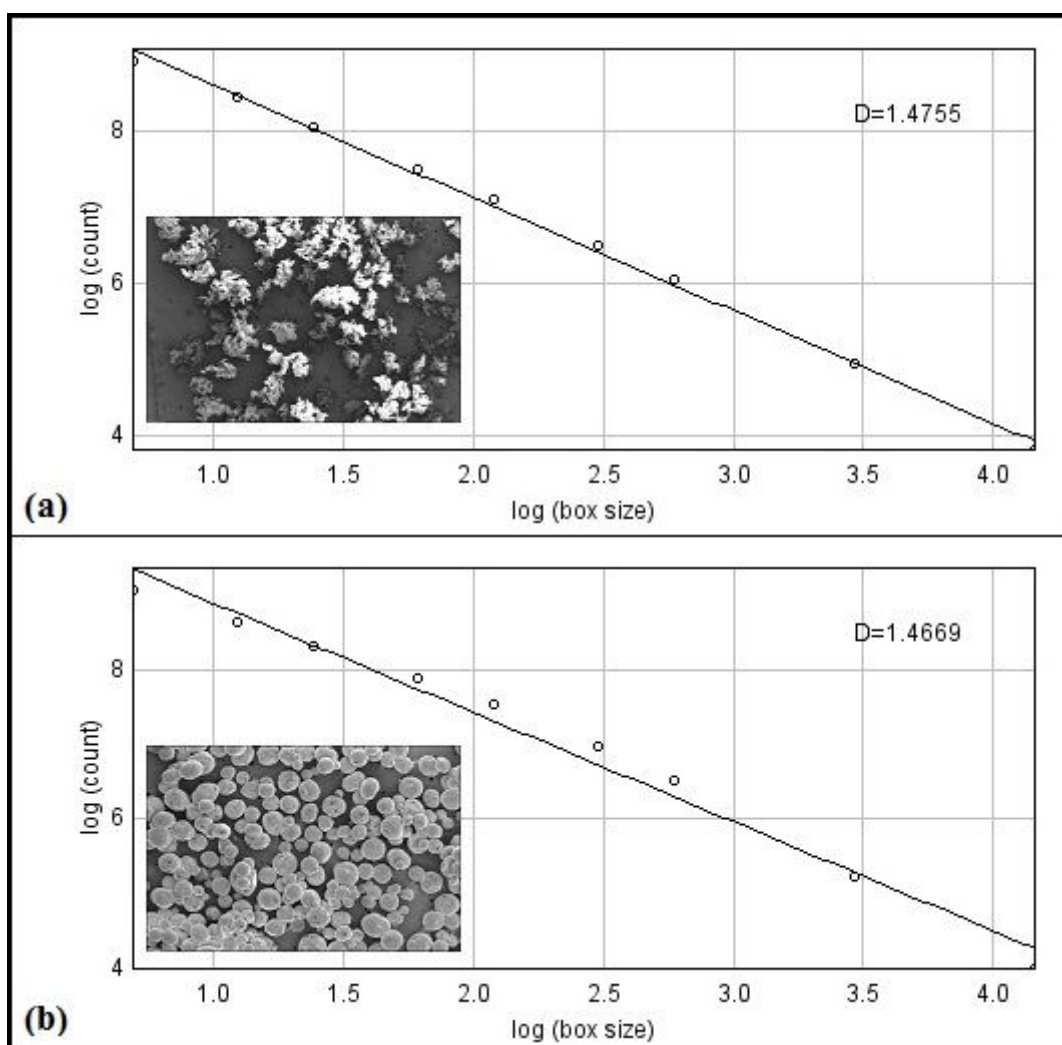


FIGURA 16. Dimensão fractal das amostras (a) comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm). Partículas de tamanhos entre 300 e 500 μm e imagens com aumento de 20x.

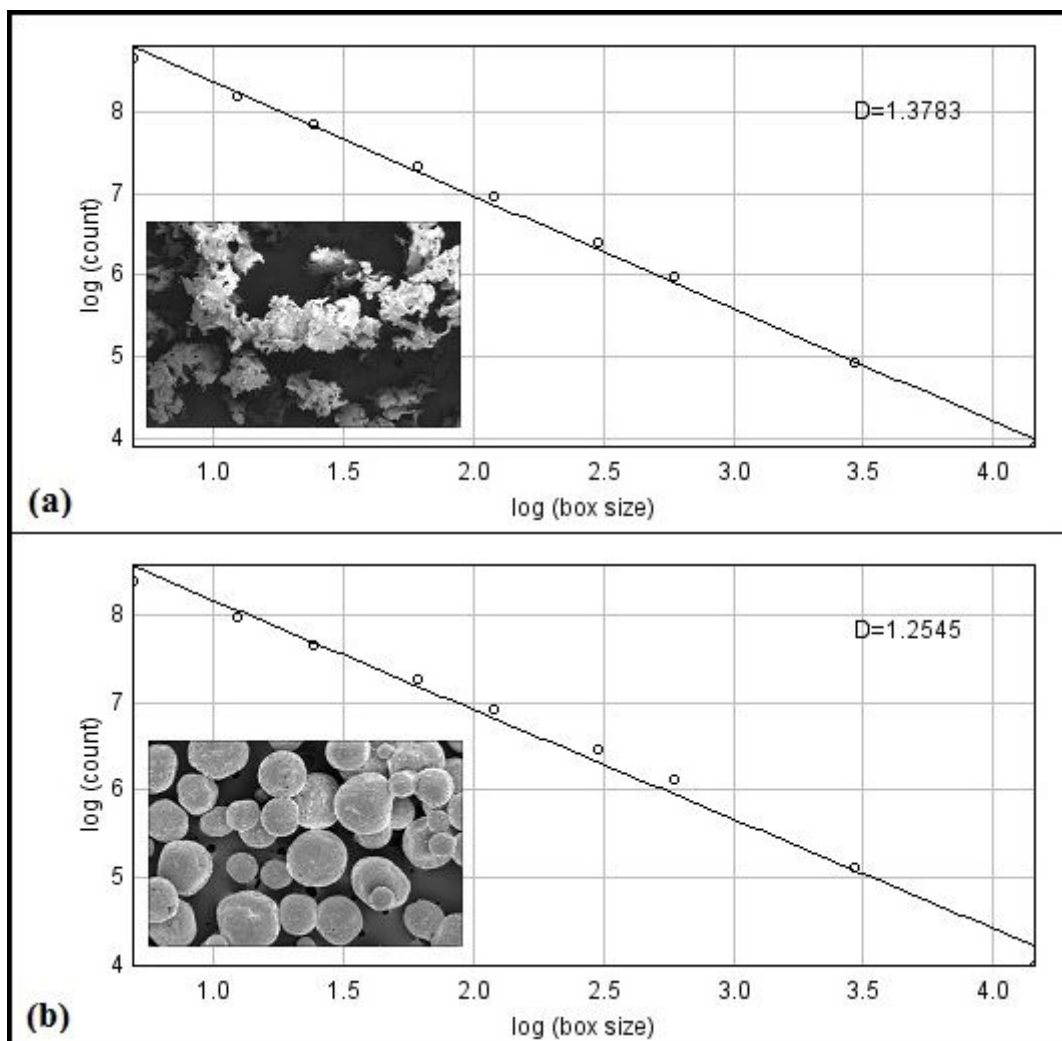


FIGURA 17. Dimensão fractal das amostras (a) comercial (Cook Medical) e (b) amostra 1 (25 mol/L e 700 rpm). Partículas de tamanhos entre 300 e 500 μm e imagens com aumento de 50x.

Comparando a dimensão da fractal das imagens da amostra 1 e da amostra comercial (Figuras 16 e 17), foram obtidas dimensões 1,4755 para a amostra comercial e 1,4669 para a amostra 1 (com aumento de 20x) e 1,3783 para a amostra comercial e 1,2545 para a amostra 1 (com aumento de 50x).

O mesmo acontece para a comparação da dimensão fractal da amostra 10 e da amostra comercial: para um aumento de 200x (Figura 18), o valor da dimensão foi 1,5647 para a amostra comercial e 1,4472 para a amostra 10. Esses resultados confirmam que a amostra comercial é mais fractal provavelmente por possuir maior irregularidade superficial.

A dimensão fractal é dada por um número fracionário pois ela apresenta o nível de ocupação no espaço pela forma e não o espaço em si onde a forma está inserida. Sendo assim, quanto maior é a irregularidade de uma forma, maior é a sua dimensão fractal. Para o foco da nossa comparação, que é comparar a rugosidade na superfície das partículas, ser mais fractal é

desvantajoso, porém nem sempre possuir maior dimensão fractal não é vantagem, depende do caso e da aplicação.

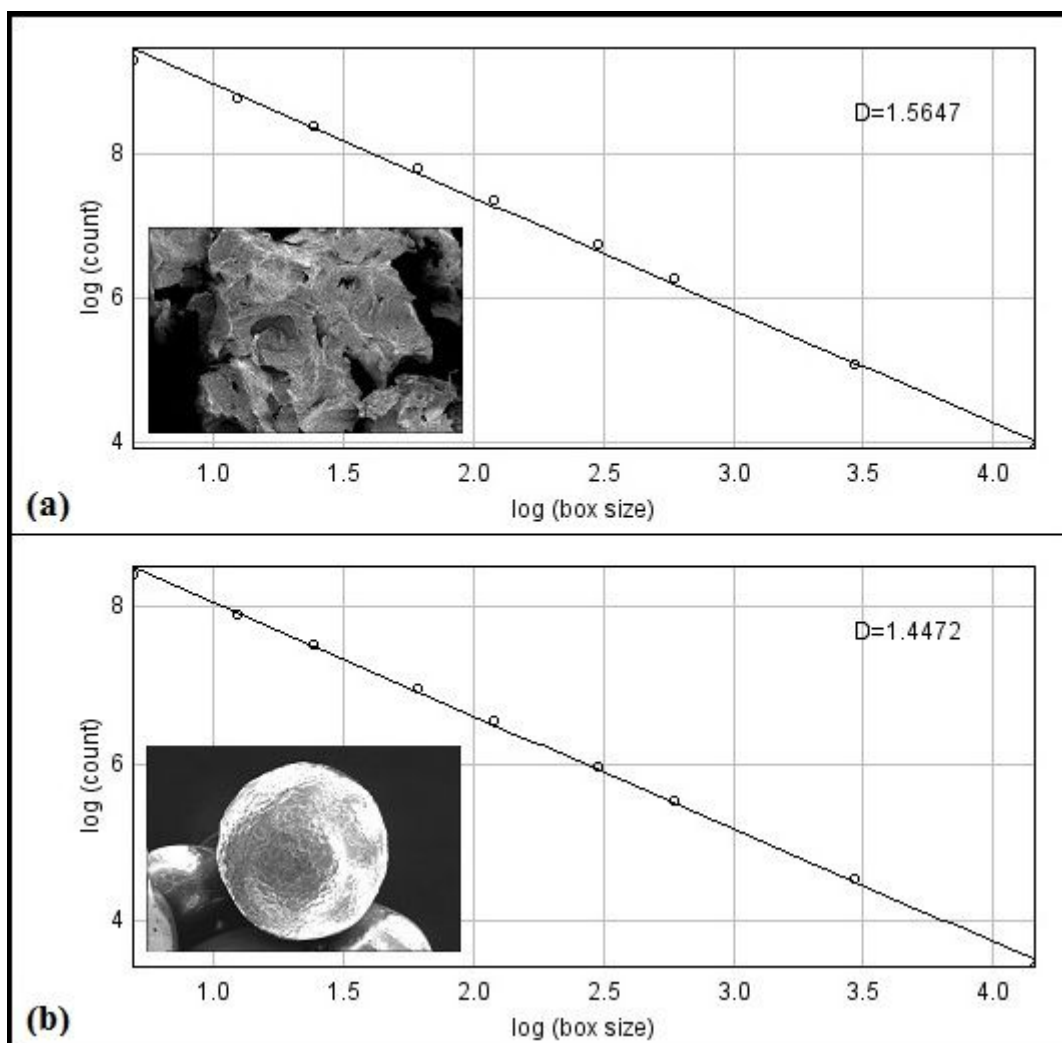


FIGURA 18. Dimensão fractal das amostras (a) comercial (Cook Medical) e (b) amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm). Partículas de tamanhos entre 300 e 500 μm e imagens com aumento de 200x.

Para confirmar a morfologia esférica e a calibração por separação de tamanhos, a amostra 10, após ter sido peneirada, foi analisada por MEV em seus diferentes tamanhos. Partículas menores que 106 μm e com tamanhos entre 300 e 500 μm foram selecionadas (Figuras 19 e 20).

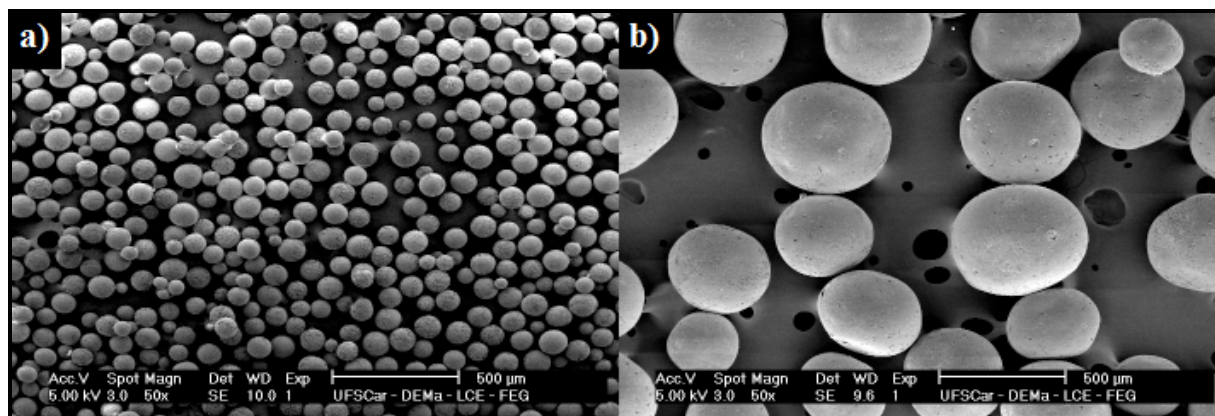


FIGURA 19. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm) com aumento de 50x. (a) Partículas menores que 106 µm e (b) partículas entre 300 e 500 µm.

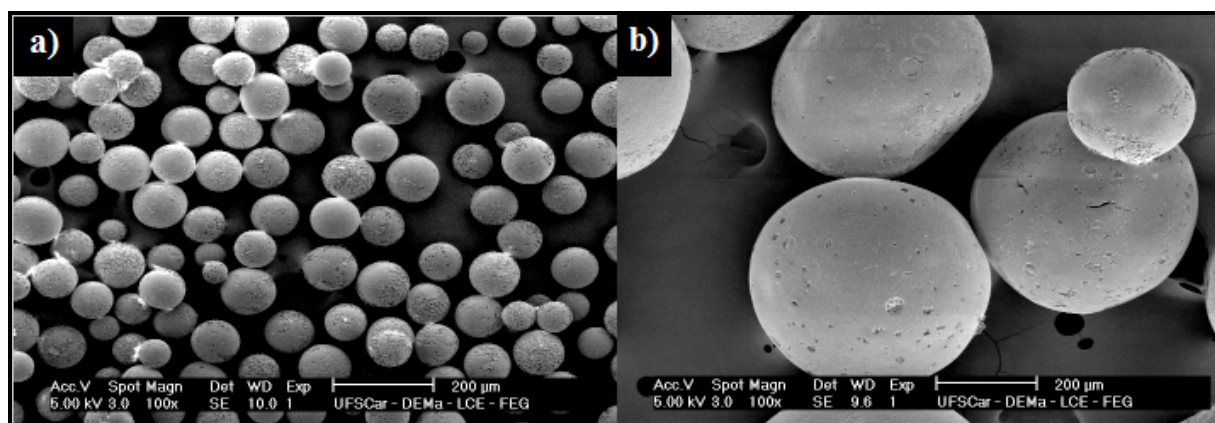


FIGURA 20. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm) com aumento de 100x. (a) Partículas menores que 106 µm e (b) partículas entre 300 e 500 µm.

Observamos, também, que quanto maior a concentração de base utilizada na saponificação, mais porosas são as partículas. Também, as partículas sintetizadas possuem porosidade elevada em comparação com as partículas comerciais, o que é resultado direto da metodologia de síntese empregada. Isso pode ser importante porque pode criar uma nova classe de partículas de PVA para uso em embolização. As partículas de PVA têm característica de oclusão total do vaso sanguíneo, neste caso a alta porosidade pode fazer com que o material seja classificado como agente embólico de oclusão parcial.

A velocidade de agitação, cuidadosamente controlada, possibilita a obtenção de partículas com as dimensões desejadas. As amostras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 foram selecionadas para comparar os efeitos da velocidade de agitação e da concentração molar de base na distribuição de tamanho das partículas obtidas. Os gráficos resultantes estão mostrados nas Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28.

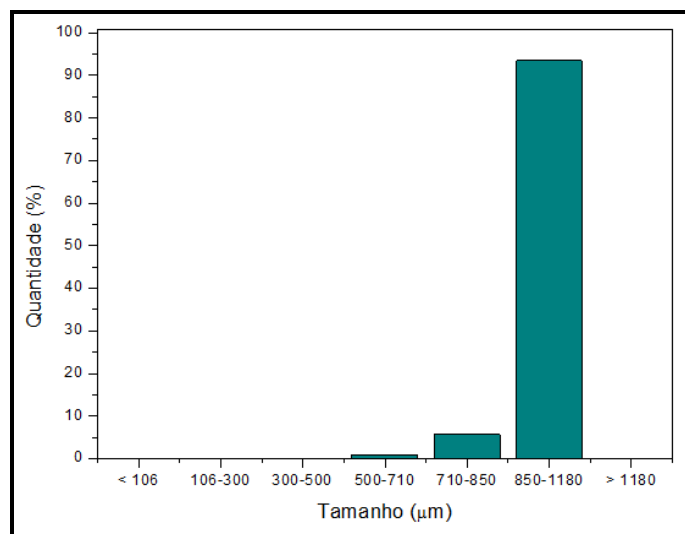


FIGURA 21. Distribuição de tamanhos da amostra 7 (2,5 mol/L e 600 rpm).

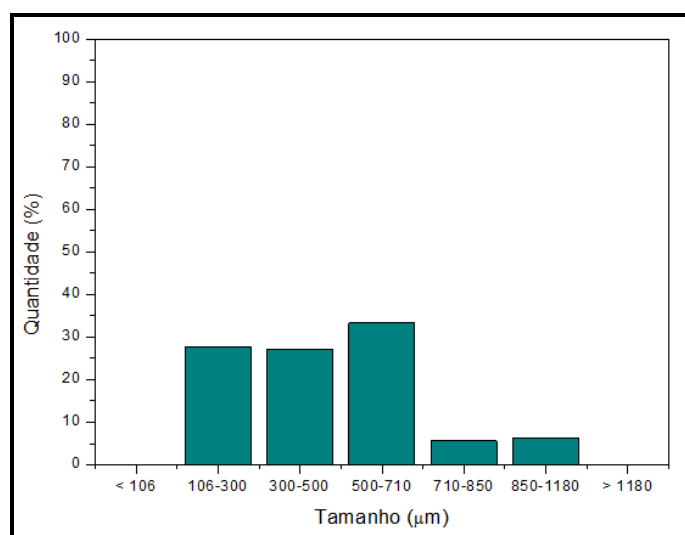


FIGURA 22. Distribuição de tamanhos da amostra 8 (2,5 mol/L e 700 rpm).

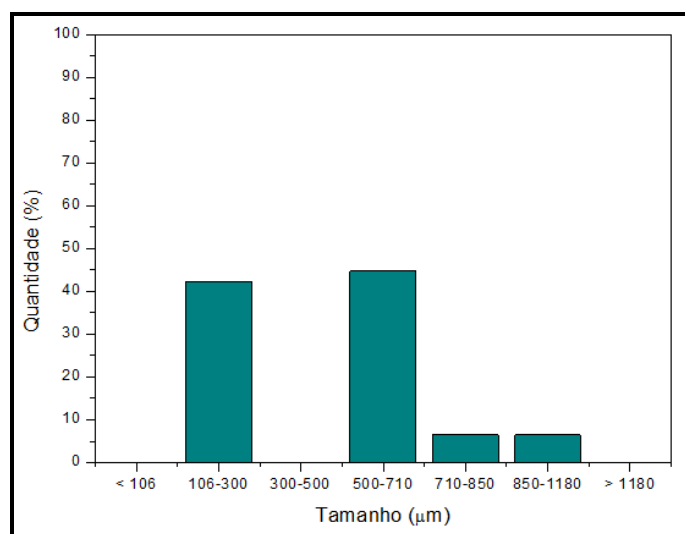


FIGURA 23. Distribuição de tamanhos da amostra 9 (2,5 mol/L e 800 rpm).

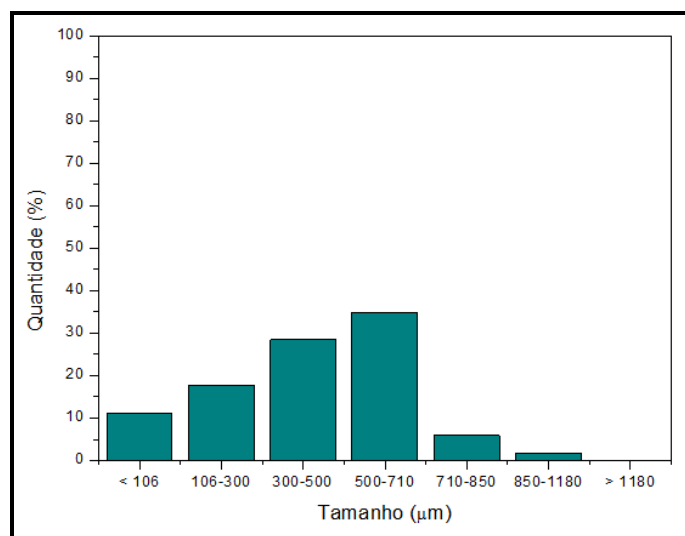


FIGURA 24. Distribuição de tamanhos da amostra 10 (2,5 mol/L e 900 rpm).

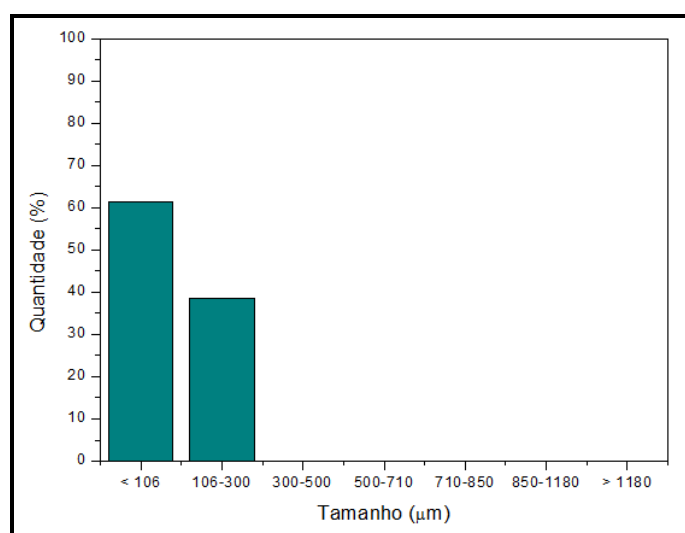


FIGURA 25. Distribuição de tamanhos da amostra 11 (2,5 mol/L e 1000 rpm).

Observa-se, pelas Figuras 21, 22, 23, 24 e 25, que para uma mesma concentração (2,5 mol/L) as partículas são maiores quando a agitação é menor (600 rpm) e menores quando a agitação é maior (1000 rpm). Observa-se também que para uma agitação de 900 rpm há uma maior distribuição de tamanho das partículas. Nesse caso, essa característica não é muito favorável, pois as agitações intermediárias não são eficientes para se obter um tamanho intermediário específico de partículas.

A Figura 26 indica a comparação nas distribuições de tamanhos das amostras 9 e 12, sintetizadas a 800 rpm. O resultado indica que a amostra 12, de 5 mol/L, possui partículas com tamanhos mais bem distribuídos em comparação à amostra 9, de 2,5 mol/L.

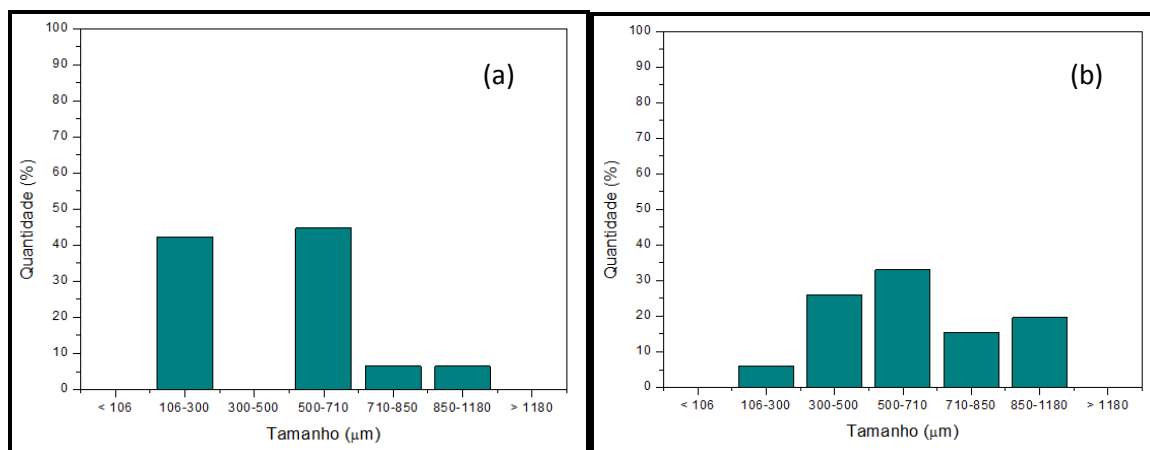


FIGURA 26. Comparação das distribuições de tamanhos das amostras (a) 9 (2,5 mol/L e 800 rpm) e (b) 12 (5 mol/L e 800 rpm).

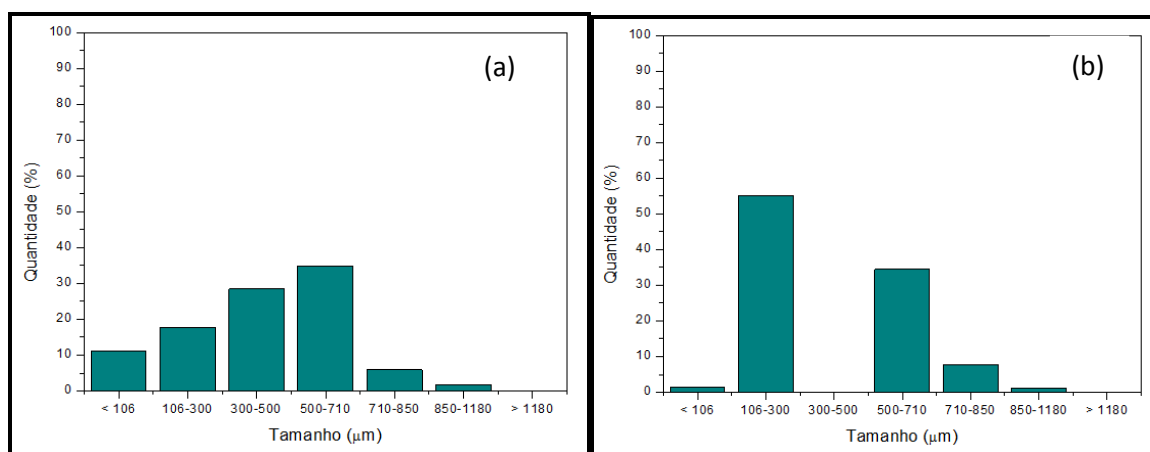


FIGURA 27. Comparação das distribuições de tamanhos das amostras (a) 10 (2,5 mol/L e 900 rpm) e (b) 13 (10 mol/L e 900 rpm).

Comparando as distribuições das partículas sintetizadas a 900 rpm, amostra 10 (2,5 mol/L) e amostra 13 (10 mol/L), há uma maior quantidade de partículas menores para a amostra com maior concentração de base (Figura 27). Esse resultado indica que, além de amostras com maiores concentrações de base possuírem partículas mais porosas, elas também possuem partículas menores, em comparação a amostras sintetizadas a uma mesma velocidade de agitação.

A Figura 28 mostra que quando uma amostra é sintetizada a baixa velocidade de agitação (600 rpm), há um aumento na quantidade de partículas grandes (maiores que 1180 μm).

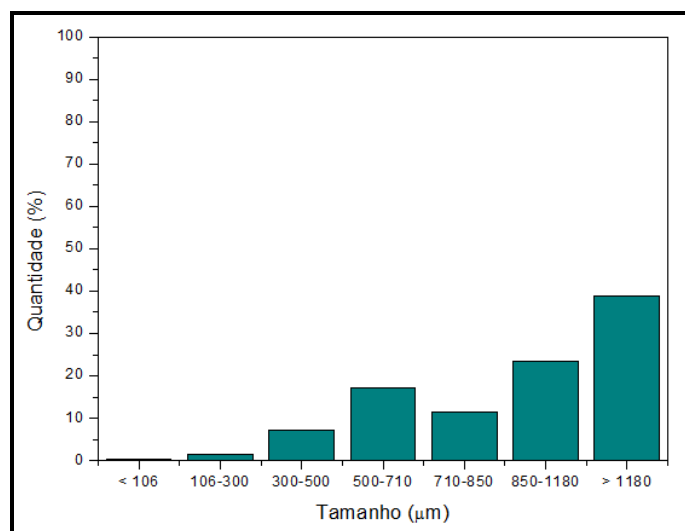


FIGURA 28. Distribuição de tamanhos da amostra 14 (25 mol/L e 600 rpm).

Podemos dizer, após a análise dos resultados obtidos, que a sistemática da reação influencia diretamente na dimensão das partículas resultantes. As partículas esféricas são resultados das gotículas formadas durante a agitação do monômero na solução aquosa (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007). Comprovou-se, então, que o grau de agitação da solução é uma das variáveis diretas para definir o tamanho e a distribuição de tamanhos das partículas.

6.2. Difração de Raios-X

Os difratogramas mostrados na Figura 29 fornecem fortes evidências de que as estruturas cristalinas das partículas sintetizadas mudam com o aumento da concentração de NaOH usado durante o processo de saponificação. É evidente que as reações de saponificação realizadas com 4 e 8 mol/L resultam em partículas poliméricas cujos difratogramas são caracterizados por picos de difração de Bragg muito amplos na região de $2\theta = 7-30^\circ$. A ausência de picos de difração de Bragg bem definidos e intensos para essas partículas revelam sua natureza amorfa. Por outro lado, quando a concentração de NaOH é aumentada de 12 para 25 mol/L, os difratogramas das partículas resultantes mostram-se completamente diferentes.

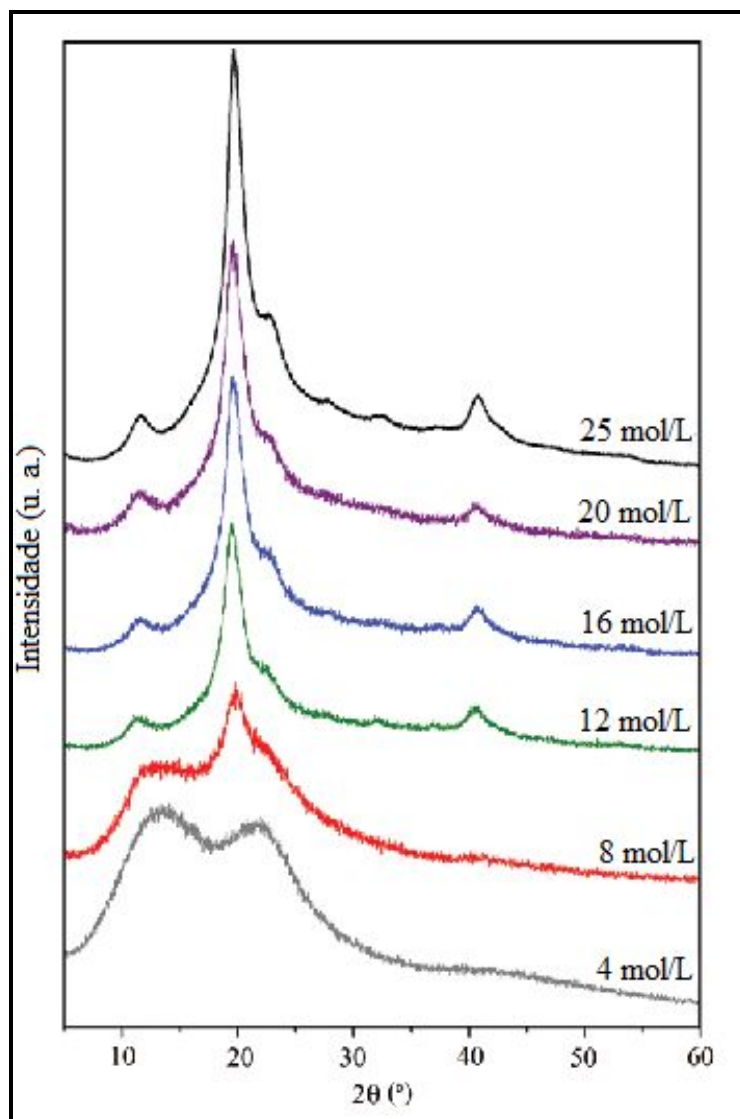


FIGURA 29. Difratomogramas de raios-X das partículas sintetizadas, amostra 1 (25 mol/L), amostra 2 (20 mol/L), amostra 3 (16 mol/L), amostra 4 (12 mol/L), amostra 5 (8 mol/L) e amostra 6 (4 mol/L).

É evidente que os novos picos de difração são uma indicação de que novos arranjos cristalográficos estão sendo formados com a adição de altas concentrações de solução de NaOH. O caso mais marcante ocorre para as partículas preparadas com uma solução de NaOH de 25 mol/L, uma vez que seu difratograma mostra quatro diferentes picos de difração de Bragg na região de 2θ de 11.5, 19.5, 23.0 e 40.5°. A largura e a forma do pico desta amostra em comparação com os outros claramente indicam que ela é mais cristalina que as outras amostras preparadas, bem como as outras partículas de PVA/PVAc previamente publicadas (COPPE/UFRJ; First Line Ind. Com. S/A, 2006; LEE *et al.*, 2005; PEIXOTO *et al.*, 2006).

A Figura 30 mostra um difratograma detalhado da amostra 1 comparado com o da amostra de PVA comercial (Boston Scientific). O pico de difração de Bragg da amostra 1 bem

definido e forte em comparação com o pico de difração de Bragg amplo da amostra comercial indica que a amostra 1 é mais cristalina. A maioria dos difratogramas de partículas de PVA relatados na literatura são semelhantes aos de DRX das partículas comerciais (COPPE/UFRJ; First Line Ind. Com. S/A, 2006; LEE *et al.*, 2005; PEIXOTO *et al.*, 2006), e este é o primeiro resultado de DRX de uma partícula de PVA altamente cristalina até agora relatado (BASSO *et al.*, 2011).

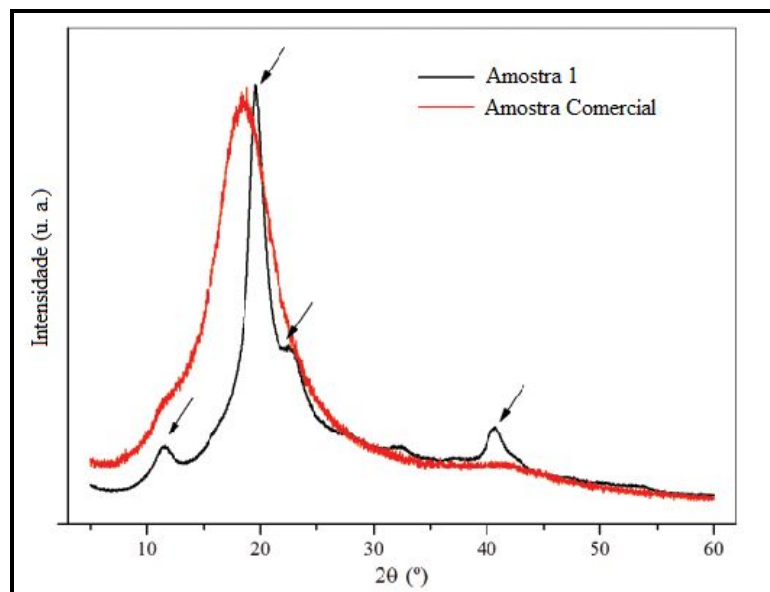


FIGURA 30. Difratogramas de raios-X da amostra comercial (Boston Scientific) e da amostra de mais alta cristalinidade (amostra 1 - 25 mol/L).

Embora de baixa intensidade, os picos nas regiões de $2\theta = 11,5$, $23,0$ e $40,5^\circ$ são bem definidos em relação à amostra comercial, isso é bastante evidente na região de $11,5^\circ$, pois o ombro que existe na amostra comercial se resolveu em um pico de difração na amostra 1. Além disso, o pico de difração de maior intensidade da amostra 1 apresenta largura à meia altura consideravelmente menor em comparação com a amostra comercial, ele está bem definido na região de $19,5^\circ$.

A amostra 1, portanto, apresenta um padrão de difração de Bragg característico de uma amostra com cristalinidade superior tanto em relação às outras amostras sintetizadas como em relação à amostra comercial e isso se deve às condições de síntese em que foi submetida. Todavia, a condição mais relevante em questão é a concentração da base na etapa da saponificação.

6.3. Grau de Cristalinidade Calculado por Calorimetria Diferencial de Varredura

A Figura 31 mostra o grau de cristalinidade das partículas de PVA/PVAc calculado a partir de medidas de DSC, usando a seguinte correlação:

$$\text{Cristalinidade (\%)} = \frac{\Delta H}{\Delta H^0} \times 100 \quad (5)$$

onde ΔH^0 é a mudança no calor de fusão do PVA 100% cristalino, que pode ser obtida diretamente das curvas de DSC, e normalmente é tomada como 150 J/g (HASSAN; PEPPAS, 2000; MANDAL; PANGARKAR, 2002; RICCIARDI *et al.*, 2004; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; WANG, 2009).

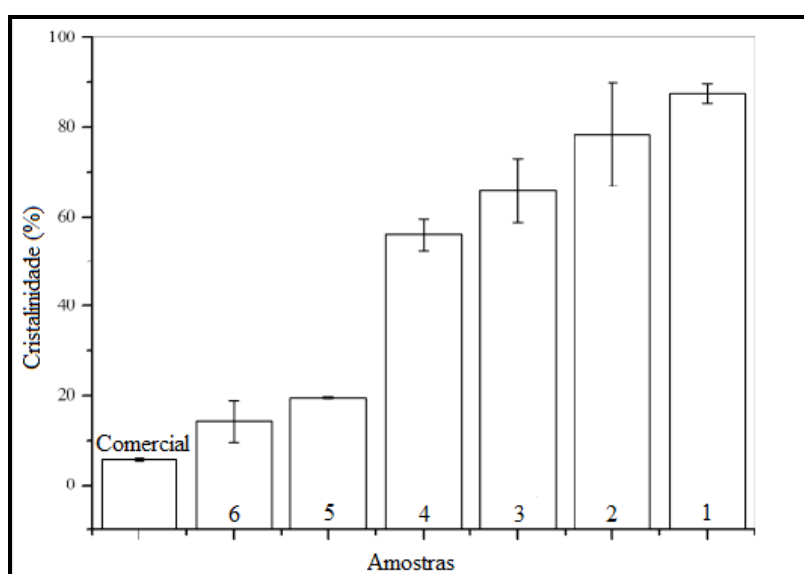


FIGURA 31. Comparação do grau de cristalinidade (obtido por calorimetria diferencial de varredura - DSC) da amostra comercial (Cook Medical) e das amostras 1 (25 mol/L), 2 (20 mol/L), 3 (16 mol/L), 4 (12 mol/L), 5 (8 mol/L) e 6 (4 mol/L).

Os graus de cristalinidade estão listados na Tabela 3 e é evidente, pelos dados, que eles aumentam com a concentração da solução de NaOH (Figura 31). A amostra 1 apresenta o maior grau de cristalinidade ($87,5 \pm 2,1\%$) comparado com as outras amostras e a amostra comercial (Cook Medical), que apresenta o menor grau de cristalinidade, que foi calculado em torno de $5,7 \pm 0,3\%$.

TABELA 3. Condições de saponificação e grau de cristalinidade das partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) / poli(acetato vinílico) (PVAc).

Amostra	Concentração de NaOH (mol/L)	Grau de cristalinidade (%)
---------	------------------------------	----------------------------

1	25	$87,5 \pm 2,1$
2	20	$78,4 \pm 11,5$
3	16	$65,8 \pm 7,0$
4	20	$56,0 \pm 3,6$
5	8	$19,6 \pm 0,2$
6	4	$14,3 \pm 4,6$

6.4. Ressonância Magnética Nuclear

A fim de ganhar uma nova percepção das diferenças estruturais das partículas sintetizadas, a caracterização por RMN CP/MAS foi realizada. ^{13}C RMN CP/MAS é uma ferramenta poderosa para estudar a estrutura de fase de misturas poliméricas para a detecção de interações intermoleculares. A Figura 32 mostra os espectros de ^{13}C RMN CP/MAS da amostra comercial (Boston Scientific), da amostra 1 e da amostra 6. Os espectros das amostras 2, 3, 4 e 14 são muito similares ao espectro da amostra 1, e os espectros das amostras 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 são muito similares ao da amostra 6. Então, apenas os espectros das amostras 1 e 6 estão sendo apresentados.

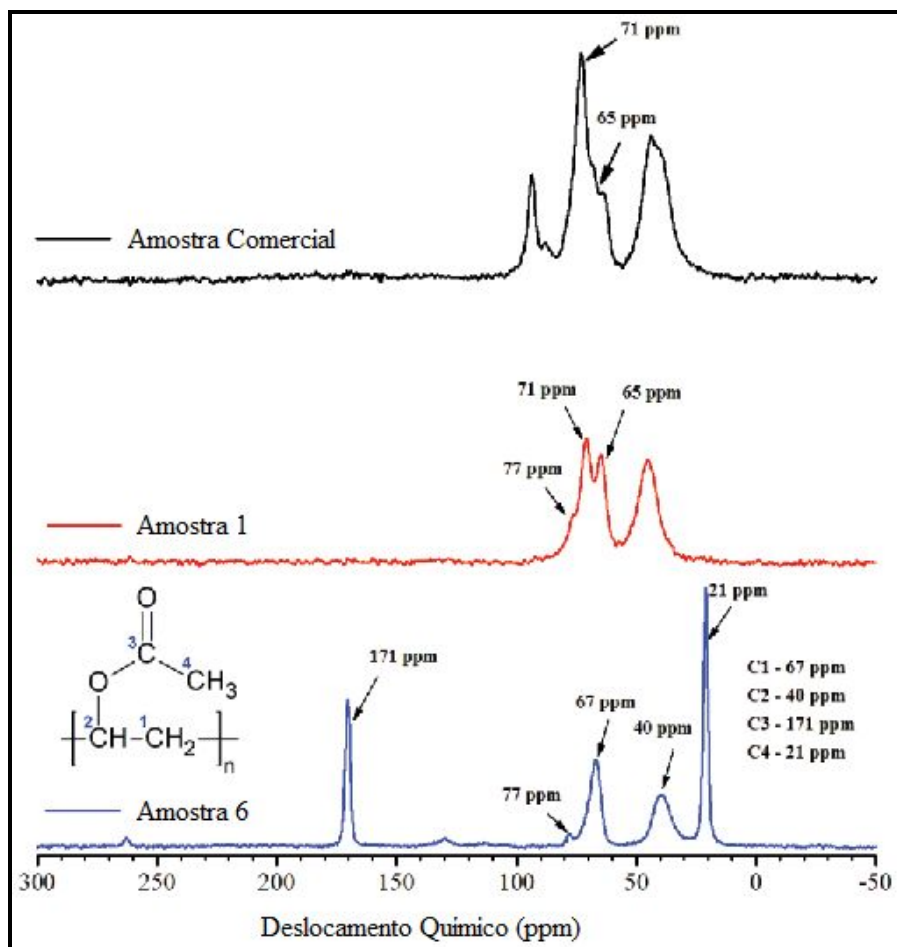


FIGURA 32. Espectro de ressonância magnética nuclear (^{13}C RMN CP/MAS) da amostra comercial (Boston Scientific), amostra 1 (25 mol/L) e amostra 6 (4 mol/L).

O espectro da amostra 6 possui algumas características peculiares em relação aos outros espectros. Primeiro, existem dois picos bem definidos, um mais à esquerda e outro mais à direita, com valores de deslocamentos químicos de 171 ppm e 21 ppm, respectivamente, e estes dois picos podem ser atribuídos ao PVAc, de acordo com a literatura (CHEUNG *et al.*, 2000; LUBACH *et al.*, 2004; TERAOKA; MAEDA; SAIKA, 1983). O PVAc no estado sólido apresenta quatro deslocamentos químicos distintos e bem caracterizados: em 40, 67, 171 e 21 ppm; enquanto que o PVA no estado sólido apresenta três valores de deslocamento químico distintos: em 77, 71 e 65 ppm (KOBAYASHI *et al.*, 1998; LUBACH *et al.*, 2004). Portanto, com base nesses dados, podemos concluir que os dois grandes picos na região de 30-80 ppm representam uma sobreposição dos picos de deslocamento químico do PVAc e do PVA, indicando uma mistura dos dois polímeros. Esta combinação de linhas amplas e estreitas no espectro de ^{13}C RMN CP/MAS da amostra 6 indica que ela é uma mistura de fases cristalinas e amorfas, e esta observação está de acordo com os dados de DRX.

O espectro de ^{13}C RMN CP/MAS da amostra 1, por outro lado, apresenta uma divisão do pico de deslocamento químico nas regiões de 65 e 71 ppm. De acordo com os dados da literatura, os deslocamentos químicos em 77, 71 e 65 ppm, observados para o PVA no estado sólido, estão relacionados com pontes de hidrogênio intra e intermolecular entre o carbono CH e o grupo hidroxila. Os deslocamentos em 77, 71 e 65 ppm são atribuídos aos carbonos CH ligados a um grupo hidroxila, por duas pontes de hidrogênio intramolecular, uma ponte de hidrogênio intermoleculares e nenhuma ponte de hidrogênio, respectivamente (KOBAYASHI *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1998; TERAOKA; MAEDA; SAIKA, 1983). Uma comparação entre os espectros da amostra comercial e da amostra 1 revela que a presença do deslocamento químico em 65 ppm na amostra 1 é uma indicação de que o número de hidrogênios ditos intermoleculares tende a aumentar, resultando, portanto, em uma estrutura polimérica com maior cristalinidade que a amostra comercial. Esta observação também está de acordo com os dados de DRX. Um modelo teórico baseado na literatura para essas atribuições está mostrado na Figura 33.

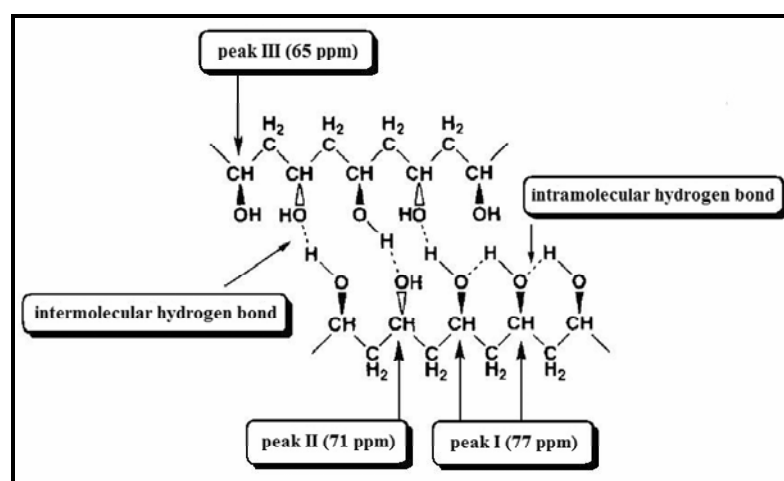


FIGURA 33. Modelo teórico das pontes de hidrogênio no poli(álcool vinílico) (PVA) (KOBAYASHI *et al.*, 1998).

Uma comparação entre os espectros de ^{13}C RMN CP/MAS da amostra comercial e da amostra altamente cristalina mostra qualitativamente que a amostra comercial é enriquecida com ligações de hidrogênio intermoleculares, uma vez que apresenta um pico muito intenso em 71 ppm. No entanto, o deslocamento químico característico de ligações de hidrogênio intramolecular (77 ppm) não está presente e o deslocamento químico em 65 ppm está presente apenas como um pequeno ombro. Por outro lado, para a amostra 1 a situação é bem diferente, pois apresenta dois picos relativamente intenso em 71 e 65 ppm e um pequeno pico em 77 ppm. O espectro da amostra altamente cristalina é muito semelhante ao espectro do PVA, no

estado sólido, com uma configuração sindiotática⁹ predominante, como relatada na literatura (KOBAYASHI *et al.*, 1998).

Com base nos resultados de ¹³C RMN CP/MAS e de DRX, uma possível explicação ou razão para a formação de partículas altamente cristalinas pode estar relacionada ao excesso de base forte (NaOH 25 mol/L) usado na etapa de saponificação. O excesso de base forte induz a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, que são formadas devido à ligação química do carbono CH da cadeia polimérica com os grupos hidroxilas que resultam em amostras altamente cristalinas e também aumentam a intensidade do pico em 65 ppm, que é uma característica do deslocamento químico de uma configuração sindiotática (Figura 33).

Essa alta cristalinidade, resultante do maior ordenamento molecular, pode ser uma característica favorável para os processos de agregação e de liberação de fármacos. Edlund e Albertsson (2000) e Edlund e Albertsson (2002) mostraram que a cristalinidade de polímeros utilizados para entrega de fármacos pode ser um fator de alta correlação com a taxa de liberação. No entanto, os estudos de quimioembolização com essas partículas estão sendo planejados a fim de compreender as interações polímero-fármaco e a taxa de liberação dos fármacos *in vitro* e *in vivo* utilizando a matriz polimérica altamente cristalina.

6.5. Análise da Biocarga

Para a amostra de partículas de 2,5 mol/L, o volume filtrado para a pesquisa de bactérias heterotróficas foi de 50 mL, para a pesquisa de esporos foi de 50 mL e para a pesquisa de fungos Sabouraud foi de 50 mL. O resultado indicou que não houve crescimento microbiano em nenhum dos três meios de cultura e, portanto, podemos dizer que a esta amostra estava livre da presença de microorganismos; também há a possibilidade deste método de análise não ser adequado para detectar os microorganismos presentes nesses meios de cultura. Para a de 25 mol/L, o volume filtrado para a pesquisa de bactérias heterotróficas foi de 50 mL, para a pesquisa de fungos Sabouraud foi de 50 mL e para a pesquisa de esporos a amostra não filtrou, pois as partículas entupiram a membrana. Foram identificadas 78 colônias de bactérias e 3 de fungos no meio de cultura próprio para pesquisa de bactérias

⁹ A taticidade é a regularidade espacial com que os grupos laterais se apresentam na cadeia polimérica. Na configuração sindiotática os grupos laterais estão dispostos de maneira alternada em relação ao plano formado pelos átomos da cadeia polimérica. Fonte: **Estrutura Molecular de Materiais Poliméricos - Definições Básicas**. Disponível em: <http://www.demar.eel.usp.br/polimeros/Estrutura_Materiais_Polimericos.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2011.

heterotróficas, 1 colônia de bactérias e 6 de fungos no meio de cultura próprio para pesquisa de fungos e nenhuma colônia no meio de cultura para pesquisa de esporos. O resultado foi de 129 UFC/g (UFC = unidades formadoras de colônias), sendo 116 de bactérias e 13 de fungos.

Para o padrão de esterilização, o conhecimento e a determinação da biocarga são muito importantes. Então, a partir do resultado desta análise complementar, com o conhecimento da biocarga, foi determinado o intervalo de irradiação para esterilização (de 20 até 50 kGy).

6.6. Esterilização por Radiação Gama

Foram coletados os difratogramas de DRX (Figuras 34 e 35) das partículas submetidas às doses de raios gama (20, 30, 40 e 50 kGy) para se observar se houve alguma mudança estrutural, ou seja, se o comportamento dos difratogramas das partículas esterilizadas é o mesmo da não esterilizada (0 kGy).

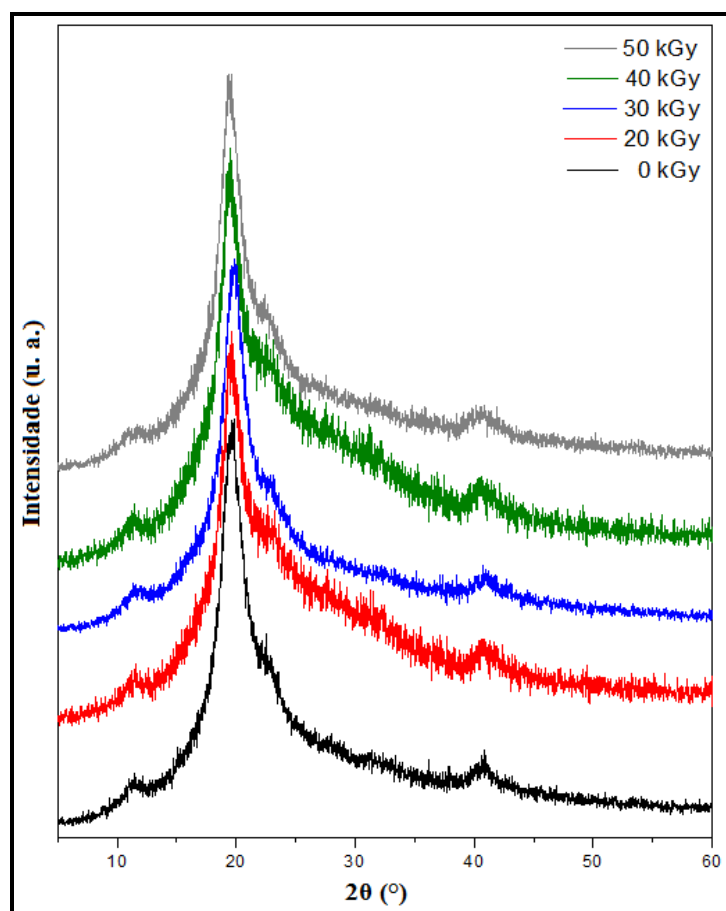


FIGURA 34. Difratogramas de raios-X da amostra 1 (25 mol/L) submetida à radiação gama.

O resultado apresentados nas Figuras 34 e 35 mostram que a radiação gama não influenciou nas estruturas das partículas esterilizadas, conservando assim os seus arranjos cristalográficos e, conseqüentemente, seus picos de difração (BATH *et al.*, 2005). A radiação gama, além de ser capaz de esterilizar e reduzir a carga microbiana de um produto, também pode ocasionar a modificação estrutural de alguns materiais (CBE Embrarad, 2011), portanto, é de extrema importância verificar, depois de um processo de esterilização por radiação gama, se houve alguma modificação ou não na estrutura do material.

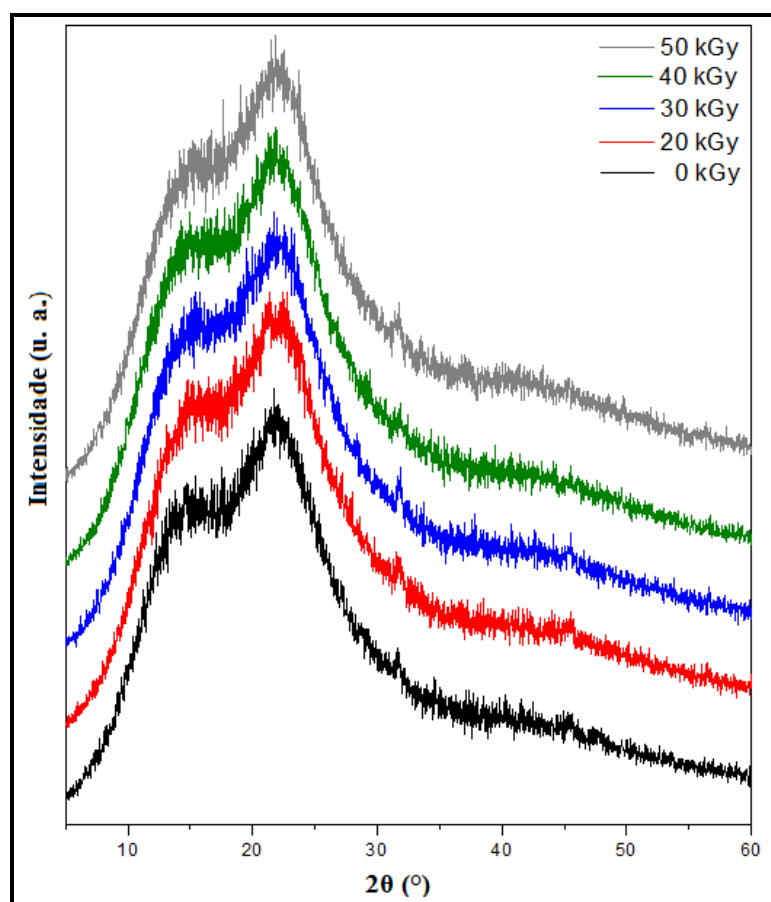


FIGURA 35. Difratogramas de raios-X da amostra 10 (2,5 mol/L) submetida à radiação gama.

6.7. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade *in vitro*

Após esterilização, as análises de citotoxicidade demonstraram que as partículas não apresentaram efeito tóxico à linhagem celular NTC clone 929, em atendimento a ISO 10.993-5, ASTM F895-84 e US Pharmacopéia 32. Os números dos IZs obtidos estão apresentados

nas Tabelas 4 e 5. Esse resultado demonstra que as partículas apresentam as características necessárias para realização da avaliação *in vivo* para determinação de sua biocompatibilidade.

TABELA 4. Índice de zona (IZ) obtido após a leitura das placas de culturas celulares para a amostra de 2,5 mol/L (350-500 μm)

	nº 1	nº 2	nº 3	nº 4
IZ	2	2	2	2
Controle Negativo	0	0	0	0
Controle Positivo	4	4	4	4

TABELA 5. Índice de zona (IZ) obtido após a leitura das placas de culturas celulares para a amostra de 25 mol/L (500-1000 μm)

	nº 1	nº 2	nº 3	nº 4
IZ	0	0	0	0
Controle Negativo	0	0	0	0
Controle Positivo	4	4	4	4

A amostra de partículas de 2,5 mol/L apresentou leve efeito tóxico para a linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1) e a amostra de 25 mol/L não apresentou efeito tóxico para a mesma linhagem celular.

7. CONCLUSÕES

Foram obtidas, por meio de reações de polimerização e de saponificação controladas, partículas esféricas de PVA/PVAc com características físico-químicas superiores às comerciais. Dos parâmetros de síntese variados, os mais significativos foram: a concentração da base utilizada na etapa da saponificação e a velocidade de agitação durante a polimerização.

As análises de MEV indicaram que as partículas sintetizadas possuem morfologia esférica, ao contrário das partículas comerciais, analisadas para efeito de comparação. A esfericidade independe da quantidade de base utilizada na etapa da saponificação, ou seja, ela é obtida durante a primeira etapa de síntese, na polimerização. A velocidade de agitação é o principal fator na determinação do tamanho e da distribuição de tamanhos das partículas.

A confirmação da regularidade superficial, ou seja, da menor rugosidade, das partículas sintetizadas foi dada pelos valores das dimensões fractais obtidos para estas partículas e para as partículas comerciais. O maior valor de dimensão obtido para as partículas comerciais está relacionado com a irregularidade superficial das mesmas, um fator indesejável que dificulta a passagem dessas partículas pelos cateteres durante procedimentos de embolização.

Foi observado, pelos resultados, que a cristalinidade das partículas depende da concentração de base utilizada na saponificação e que as partículas com maior grau de cristalinidade são constituídas por PVA, diferentemente das com menores graus de cristalinidade, que são uma mistura de PVA e PVAc. Os resultados mais significativos foram obtidos com soluções de NaOH em concentrações elevadas durante o processo de saponificação. As técnicas de DRX, DSC e ^{13}C RMN CP/MAS mostraram que as esferas obtidas com saponificação a 25 mol/L de NaOH apresentam cristalinidade bastante superior às saponificadas a concentrações menores e também às partículas de PVA disponíveis no mercado. Com isso, pode-se concluir que as condições de síntese resultaram em uma nova metodologia e foram responsáveis pela mudança estrutural do produto final, mudanças essas que podem tornar as partículas, em potencial, muito importantes para os próximos passos do projeto de pesquisa. Correlações entre os dados obtidos indicam que a alta cristalinidade das amostras pode ser atribuída à presença das ligações de hidrogênio intermoleculares que são formadas pela ligação química do carbono CH das cadeias polimérica com grupos de hidroxila nas intercadeias.

As análises da biocarga foi importante para determinar as quantidades de radiação para esterilização das partículas. Elas foram esterilizadas e os resultados de DRX posteriores indicaram que não ocorreu modificação estrutural das partículas durante a esterilização.

Os resultados das análises de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que as partículas sintetizadas não apresentaram efeito tóxico à linhagem celular NTC clone 929. Esses resultados mostraram que elas apresentam características necessárias para realização da avaliação *in vivo*, para determinação da biocompatibilidade das partículas. Através da análise de todos os resultados obtidos, conclui-se que as partículas esféricas de PVA/PVAc obtidas possuem características favoráveis para uso em embolização.

8. PERSPECTIVAS

Este trabalho terá continuidade em nível de doutoramento, tendo como perspectivas a realização das seguintes atividades:

8.1. Avaliação da Suspensão das Partículas e Liberação Via Cateter

A avaliação da capacidade de suspensão e liberação via cateter das partículas esféricas de PVA/PVAc é importante para garantir que a injeção dessas partículas ocorrerá sem dificuldades ou oclusão do cateter. A suspensão das partículas será considerada satisfatória se estas se mantiverem suspensas por pelo menos um minuto. Para a avaliação da característica de suspensão das partículas serão utilizadas 1 mL de partículas misturadas a 6 mL de meio de contraste radiopaco (diluído 50% em solução salina) em uma seringa de 10 mL e misturadas através de uma válvula de três vias. A mistura será então injetada em um cateter, ou micro-cateter, adequado de lúmen pelo menos 15% maior que o diâmetro das partículas.

8.2. Realização de Experimentos *in vivo* com as Partículas de PVA/PVAc

Para comprovar a biocompatibilidade das partículas, serão realizados experimentos *in vivo* com as partículas de PVA/PVAc, utilizando-se 48 fêmeas de coelhos albinos da raça *New Zealand*, com peso entre 2,5 e 3,0 kg. Os animais receberão cuidados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Anexo 10.2) e será desenvolvido no Centro de Cirurgia Experimental da Braille Biomédica.

Os objetivos são: a) implantar na artéria renal direita dos coelhos, via cateterismo, partículas de PVA/PVAc de alta e baixa cristalinidade e partículas não-esféricas, disponíveis comercialmente, com o intuito de promover a embolização vascular renal e b) avaliar e comparar as características macro e microscópicas dos rins pós-embolização.

Os animais serão submetidos ao procedimento de embolização em artéria renal, sob anestesia intramuscular, divididos em quatro grupos de 12 animais (um grupo para cada tipo de agente embólico e um grupo *sham* - grupo de simulação para controle da técnica de cateterização). Os procedimentos cirúrgicos serão realizados com três partículas diferentes, de

aproximadamente 100-300 μm de diâmetro: partículas de PVA/PVAc esféricas com cristalinidade alta, partículas de PVA/PVAc esféricas com cristalinidade baixa e partículas de PVA não esféricas disponíveis comercialmente.

Os animais serão mantidos em gaiolas individuais por período pré-determinado (2, 10 e 30 dias). Completado o período de embolização os animais serão anestesiados para a retirada de ambos os rins (o embolizado e o contralateral) e então sofrerão eutanásia com superdosagem anestésica. Serão realizadas análises macro e microscópicas do rim, a fim de comparar os efeitos do procedimento de embolização.

8.3. Carregamento das Partículas de PVA/PVAc com Doxorrubicina

Com o domínio da técnica de embolização e o conseqüente avanço da ciência dos materiais biocompatíveis, iniciou-se uma nova etapa na TMI associada ao tratamento quimioterápico, a quimioembolização. A quimioembolização, além de causar oclusão dos vasos, carrega o medicamento à região desejada para o tratamento quimioterápico localizado (GIROUX; BAUM; SOULEN, 2004; HONG *et al.*, 2006; LIAPI; GESCHWIND, 2007; PENTECOST, 1993; RIMON *et al.*, 2006). A entrega de fármacos antineoplasia via quimioembolização tem atraído bastante a atenção das comunidades médica e acadêmica, devido ao fato de tal procedimento mostrar-se mais eficiente do que somente a quimioterapia no tratamento de certos tumores. Este procedimento, além de possibilitar o aumento da concentração do fármaco apenas na região desejada, induz a hipoxia¹⁰ do tumor através do bloqueio da suplementação sanguínea e reduz os efeitos colaterais sistêmicos (BURT *et al.*, 1995; KATO *et al.*, 1981).

O câncer de fígado, onde é mais empregado o tratamento de quimioembolização, é o 4º câncer que mais mata no Brasil, sendo detectados cerca de 3000 novos casos por ano. Embora nos EUA mais de 50% dos pacientes acometidos por esse tipo de câncer seja submetido ao tratamento por quimioembolização, no Brasil o número de casos tratados com essa técnica ainda é inexpressivo. O principal fator para o impedimento da realização de procedimentos de quimioembolização no país é o alto custo, o que torna o procedimento impeditivo para a maioria das instituições e pacientes.

¹⁰ Hipoxia significa baixo teor de oxigênio. Fonte: GUYTON, A. C. *Fisiologia Humana*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

O Cloridrato de Doxorrubicina ($C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl$) (Figura 36) é apontado como um dos medicamentos que melhor responde a este tipo de tratamento. Ele é um antibiótico que tem sido usado com êxito para produzir regressões em várias neoplasias, tais como carcinomas de mama, pulmão, bexiga, tireóide e ovário, sarcomas ósseos e dos tecidos moles, dentre outros (LEWIS *et al.*, 2007; LEWIS *et al.*, 2008).

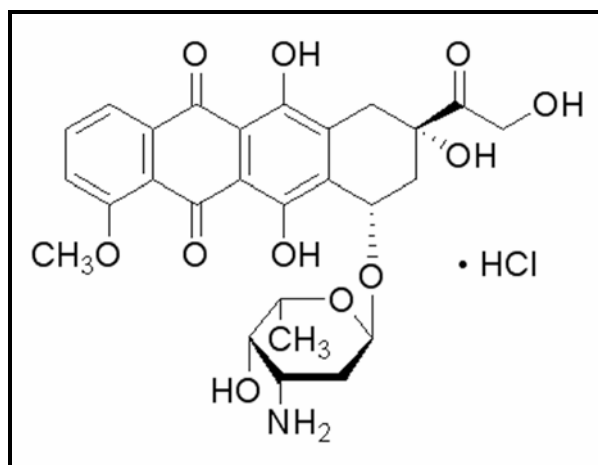


Figura 36. Fórmula estrutural do Cloridrato de Doxorrubicina.

Todavia, como a maioria dos fármacos antineoplasia, a Doxorrubicina pode causar ou induzir a alta toxicidade quando administradas em altas concentrações. Os principais sintomas dessa alta toxicidade se mostram presentes através da queda de cabelos, náuseas, vômitos e necrose local do tecido atingido (LEWIS *et al.*, 2007; LEWIS *et al.*, 2008).

Para finalizar todo o estudo de embolização e quimioembolização com a utilização das partículas esféricas de PVA/PVAc, objetivamos, futuramente, carregar a superfície das partículas com o agente quimioterápico Doxorrubicina. Essas partículas carregadas com o fármaco serão, então, usadas como vetores de entrega do fármaco nos tratamentos de quimioembolização principalmente em pacientes com câncer de rim e de fígado. A proposta é desenvolver e caracterização tais partículas para fins de estudos *in vitro* e *in vivo* no tratamento desses cânceres. O carregamento será obtido por reações entre os grupos funcionais químicos que caracterizam a superfície das partículas e o grupo químico funcional do fármaco.

Para efeitos de quimioembolização com as partículas de PVA/PVAc, é importante levar em consideração não apenas a distribuição do tamanho e a morfologia bem definida, mas também as suas estruturas cristalinas. Lee *et al.* (2005) e Lyoo e Lee (2002) investigaram as interações fármaco-polímero de partículas poliméricas para diferentes matrizes e chegaram à conclusão de que houve degradação em primeiro lugar na micro-região amorfa, seguida por

uma lenta degradação nas regiões cristalinas, sugerindo que a cristalinidade na cadeia polimérica pode afetar a taxa de degradação (EDLUND; ALBERTSSON, 2000; EDLUND; ALBERTSSON, 2002).

8.4. Determinação do Nível de Carregamento

A determinação do nível de carregamento das partículas com o fármaco será obtido por meio de imersão das partículas em uma solução com concentração pré-estabelecida do fármaco, em condição climática controlada (temperatura e luminosidade). A concentração do fármaco na solução será determinada após testes pilotos, pois a concentração do fármaco nas partículas depende do tempo de permanência delas na solução. A análise da concentração do fármaco na solução será realizada em um espectrofotômetro ultravioleta (UV) e comparada com uma curva inicial da solução de fármaco. Durante o período de carregamento das partículas com o fármaco serão avaliados o tamanho e a aparência das partículas em microscópio ótico com sistema digital de aquisição de imagem. As imagens serão adquiridas em intervalos de tempo pré-determinados e comparadas ao longo de todo o período de carregamento.

8.5. Avaliação da Compressibilidade das Partículas Carregadas

Avaliação da compressibilidade das partículas será realizada antes e depois do carregamento com o fármaco. Para essa avaliação as partículas, com e sem fármaco, serão distribuídas sobre uma superfície uniforme, de área conhecida e então cobertas com uma placa uniforme, onde deverá ser aplicada uma força compressiva conhecida, medindo-se o descolamento da placa. Essa avaliação é necessária para avaliar se partículas carregadas com o fármaco mantêm o grau de compressibilidade e a estrutura, que facilitem sua liberação através do microcateter, sem comprometer sua capacidade de embolização.

8.6. Liberação do Fármaco *in vitro*

A liberação do fármaco contido nas partículas será avaliada em água pura, meio de contraste, solução salina e *phosphate buffer saline* (PBS) *solution*. Para cada 200 mL do meio escolhido, 1 mL de partículas serão depositadas e mantidas sob agitação lenta e controlada. Em períodos pré-determinados de tempo, uma amostra do meio será analisada sob espectroscopia UV. Para avaliação da liberação do fármaco em meio de contraste será utilizado uma diluição diferente, onde 1 mL de partículas serão diluídas em 1 mL de solução salina e 2 mL de contraste radiopaco, misturados em uma válvula de três vias e então avaliado em espectroscopia UV.

8.7. Realização de Experimentos *in vivo* com as Partículas Carregadas

Serão utilizados 15 coelhos machos adultos de uma raça apropriada, com peso entre 2,5 e 3,0 kg. Os animais receberão cuidados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA. O projeto será desenvolvido no Centro de Cirurgia Experimental da Braile Biomédica, após aprovação pela CEEA da FAMERP. O estudo envolverá o implante de partículas de PVA/PVAc de 200 e 1000 μm de diâmetros, no lóbulo hepático esquerdo de coelhos. Os animais serão divididos em três grupos de 5 animais:

Grupo I: implante de partículas de diâmetros 200 μm carregadas com Doxorrubicina;

Grupo II: implante de partículas de 1000 μm com Doxorrubicina;

Grupo Controle: implante de partículas sem fármaco.

Todos os animais serão previamente anestesiados. Após assepsia do local, será realizada uma incisão para acesso da artéria femoral direita que será dissecada para introdução do microcateter. O microcateter será introduzido até o lobo ou segmento hepático esquerdo, onde serão liberadas as partículas de PVA/PVAc. Cerca de 10 minutos após o término do procedimento de embolização será realizada uma angiografia para certificação do bloqueio de sangue. Uma semana após a embolização será realizada novamente uma angiografia.

Para a avaliação da concentração plasmática de Doxorrubicina liberada pelas partículas, serão coletadas amostras de sangue no primeiro dia e 15 dias após a embolização. Os animais serão avaliados diariamente e após 30 dias de embolização, três animais de cada

grupo serão submetidos à eutanásia para avaliação do fígado pós-retirada. Os dois animais restantes de cada grupo sofrerão eutanásia 90 dias após a embolização.

Ao final do período pré-estabelecido de implante, todos os animais serão submetidos a novo procedimento cirúrgico para retirada do fígado. Os fígados serão retirados, cortados e corados para avaliação dos componentes celulares. Serão avaliados também os padrões de distribuição, forma e aparência das partículas, bem como as reações perivasculares associadas. Após a retirada do fígado os animais sofrerão eutanásia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSI/AAMI/ISO 11.137-1. **Sterilization of medical devices**. Microbiological methods - Part 1: Estimation of the population of microorganisms on product, 1995.

ASTM F895-84. **Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity**, 1984.

Austin Radiological Association. **Varicocele embolization**, 2004. Disponível em: <<http://www.varicocele texas.com/treatment.html>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

BARTH, K. H.; STRANDEBERG, J. D.; WHITE, R. I. Long-term follow-up of transcatheter embolization with autologous clot, oxycel, and gelfoam in domestic swine. **Investigative Radiology**, v. 12, n. 3, p. 273-280, 1977.

BASSO, G. G. *et al.* Synthesis and characterization of novel, highly crystalline poly(vinyl alcohol) microspheres for chemoembolization therapy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 3, p. 1417-1423, 2011.

BATH, N. V. *et al.* Effect of γ -radiation on the structure and morphology of polyvinyl alcohol films. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 237, n. 3-4, p. 585-592, 2005.

BCC Research. **Advanced Materials - Microspheres: Technologies and global markets**, 2010. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/microspheres-tech-markets-avm073a.html>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

BEAUJEU, R. *et al.* Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, II: Preliminary clinical evaluation in tumors and arteriovenous malformations. **American Journal of Neuroradiology**, v. 17, n. 3, p. 541-548, 1996.

BENDSZUS, M. *et al.* Efficacy of trisacryl gelatin microspheres versus polyvinyl alcohol particles in the preoperative embolization of meningiomas. **American Journal of Neuroradiology**, v. 21, n. 2, p. 255-261, 2000.

Biocompatibles. **Bead Block**, 2011. Disponível em: <<http://www.biocompatiblesoncology.com/pages/bead-block-summary>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

Biosphere Medical. **Embosphere Microsphere - Promoting embolization efficacy**, 2004. Disponível em: <<http://www.biospheremed.com/products/embosphere.cfm>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

Boston Scientific. **Contour PVA Embolization Particles**, 2011. Disponível em: <http://www.bostonscientific.com/Device.bsci?page=HCP_Overview&navRelId=1000.1003&method=DevDetailHCP&id=10069011&pageDisclaimer=Disclaimer.ProductPage>. Acesso em: 20 ago. 2010.

BROOKS, B. The treatment of traumatic arterio-venous fistula. **Southern Medical Journal**, v. 23, n. 2, p. 100-106, 1930.

BURT, H. M. *et al.* Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly(*d,l*-lactic acid). **Cancer Letters**, v. 88, n. 1, p. 73-79, 1995.

CBE Embrarad. **Tecnologia em esterilização**, 2011. Disponível em: <<http://www.cbesa.com.br>>. Acesso em: 04 mar. 2011.

Celo Nova Biosciences. **Embozene Microspheres**, 2010. Disponível em: <<http://www.celonova.com/index.php?q=node/29>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

CHATZI, E. G.; KIPARISSIDES, C. Drop size distributions in high holdup fraction dispersion systems: Effect of the degree of hydrolusis of PVA stabilizer. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 24B, p. 5039-5052, 1994.

CHEUNG, M. K. *et al.* Miscibility of poly(epichlorohydrin) / poly(vinyl acetate) blends investigated with high-resolution solid-state ¹³NMR. **Polymer**, v. 41, n. 4, p. 1469-1474, 2000.

COLDWELL, D. M.; STOKES, K. R.; YAKES, W. F. Embolotherapy: Agents, clinical applications, and techniques. **Radiographics**, v. 14, n.3, p. 623-643, 1994.

COOK, R. L. *et al.* A modified cross-polarization magic angle spinning ¹³C NMR procedure for the study oh humic materials. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 22, p. 3979-3986, 1996.

Cook Medical. **PVA Foam Embolization Particles**, 2010. Disponível em: <<http://www.cookmedical.com/di/dataSheet.do?id=4742>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

COPPE/UFRJ - Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio De Janeiro; First Line Indústria e Comércio S/A (Rio de Janeiro). José Carlos Costa da Silva Pinto. **Process for the synthesis of poly(vinyl alcohol) and/or poly(vinyl acetate) with spherical morphology and shell-and-nucleus structure and its use in vascular embolization**. WO 050591 A2, 2006.

DERDEYN, C. P. *et al.* Polyvinyl-alcohol particle-size and suspension characteristics. **American Journal of Neuroradiology**, v. 16, n. 6, p. 1335-1343, 1995.

DION, J. E. *et al.* Dextran microsphere embolization: Experimental and clinical-experience with radiologic-pathological correlation. **Radiology**, v. 160, n. 3, p. 717-721, 1986.

DOWDING, P. J.; VICENT, B. Suspension polymerisation to form polymer beads. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 161, n. 2, p. 259-269, 2000.

DRIA, K. J.; SACHLEBEN, J. R.; HATCHER, P. G. Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance of humic acids at high magnetic field strengths. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 2, p. 393-401, 2002.

EDLUND, U; ALBERTSSON, A. -C. Morphology engineering of a novel poly(L-lactide)/poly(1,5-dioxepan-2-one) microsphere system for controlled drug delivery. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 786-796, 2000.

EDLUND, U; ALBERTSSON, A. -C. Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. **Advances in Polymer Science**, v. 157, p. 67-112, 2002.

Embolution. **Soluções médicas por emboloterapia**, 2011. Disponível em: <<http://www.embolution.com.br>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

ENCARNACION, C. E. *et al.* Gastrointestinal bleeding: Treatment with gastrointestinal arterial embolization. **Radiology**, v. 183, n. 2, p. 505-508, 1992.

FALCONER, K. **Techniques in fractal geometry**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997.

GIBAUD, S. *et al.* Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 9, p.944-950, 1996.

GIROUX, M. F.; BAUM, R. A.; SOULEN, M. C. Chemoembolization of liver metastasis from breast carcinoma. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 15, n. 3, p. 289-291, 2004.

GREENFIELD, A. J. Transcatheter vessel occlusion: Selection of methods and materials. **Cardiovascular and Interventional Radiology**. v.3, n.4, p. 222-228, 1980.

HARNED, R. K. *et al.* Partial splenic embolization in five children with hypersplenism: Effects of reduced-volume embolization on efficacy and morbidity. **Radiology**, v. 209, n. 3, p. 803-806, 1998.

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels. **Macromolecules**, v. 33, n. 7, p. 2472-2479, 2000.

HEMINGWAY, A. P.; ALLISON, D. J. Complications of embolization: Analysis of 410 procedures. **Radiology**. v.166, n.3, p. 669-672, 1988.

HERRERA, M. *et al.* Ivalon shavings - Technical considerations of a new embolic agent. **Radiology**, v. 144, n. 3, p. 638-640, 1982.

HONG, K. *et al.* New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: Preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 8, p. 2563-2567, 2006.

ISO 10.993-5. **Biological evaluation for medical devices tests for cytotoxicity: *in vitro* methods**, 2009.

JACK, C. R. *et al.* Polyvinyl alcohol sponge for embolotherapy - Particle size and morphology. **American Journal of Neuroradiology**, v. 6, n. 4, p. 595-597, 1985.

KATO, T. *et al.* Transcatheter arterial chemo-embolization of renal-cell carcinoma with microencapsulated mitomycin-C. **Journal of Urology**, v. 125, n. 1, p. 19-24, 1981.

KERBER, C. W.; BANK, W. O.; HORTON, J. A. Polyvinyl-alcohol foam: Prepackaged emboli for therapeutic embolization. **American Journal of Roentgenology**, v. 130, n. 6, p. 1193-1194, 1978.

KHANKAN, A. A. *et al.* Embolic effects of superabsorbent polymer microspheres in rabbit renal model: Comparison with tris-acryl gelatin microspheres and polyvinyl alcohol. **Radiation Medicine**, v. 22, n. 6, p. 384-390, 2004.

KIPARISSIDES, C. Polymerization reactor modeling: A review of recent developments and future directions. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 10, p. 1637-1659, 1996.

KISILEVZKY, N.; ELKIS, H. Provision of a mobile uterine artery embolization service to medically underserved areas in Brazil. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 22, n. 4, p. 490-496, 2011.

KISILEVZKY, N. H.; MARTINS, M. S. Embolização uterina para tratamento de mioma sintomático. Experiência inicial e revisão da literatura. **Radiologia Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 129-140, 2003.

KOBAYASHI, M. *et al.* Structural study of poly(vinyl alcohol) in the gel state by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. **Macromolecules**, v. 28, n. 19, p. 6677-6679, 1995.

KOBAYASHI, M. *et al.* Structural and dynamical studies of poly(vinyl alcohol) gels by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 440, n. 1-3, p. 155-164, 1998.

KWAK, B. K. *et al.* Chitin-based embolic materials in the renal artery of rabbits: Pathologic evaluation of an absorbable particulate agent. **Radiology**, v. 236, n. 1, p. 151-158, 2005.

LATCHAW, R. E.; GOLD, L. H. A. Polyvinyl foam embolization of vascular and neoplastic lesions of the head, neck and spine. **Radiology**, v. 131, n. 3, p. 669-679, 1979.

LAZRAK, N.; LE BOLAY, N.; RICARD, A. Droplet stabilization in high holdup fraction suspension polymerization reactors. **European Polymer Journal**, v. 34, n. 11, p. 1637-1647, 1998.

LEE, S. G. *et al.* Preparation of novel syndiotactic poly(vinyl alcohol) microspheres through the low-temperature suspension copolymerization of vinyl pivalate and vinyl acetate and heterogeneous saponification. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 95, n. 6, p. 1539-1548, 2005.

LEE, S. G.; LYOO, W. S. Preparation of monodisperse poly(vinyl alcohol) microspheres by heterogeneous surface saponification and iodine complex formation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 3, p. 1701-1709, 2008.

LEWIS, D. H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: CHASIN, M.; LANGER, R. (Ed.). **Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker, v. 45, p. 1-41, 1990.

LEWIS, A. L. *et al.* Doxorubicin eluting beads - 1: Effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 1691-1699, 2007.

- LEWIS, A. L. *et al.* Doxorubicin eluting beads - 2: Methods for evaluating drug elution and *in-vitro*: *in-vivo* correlation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 767-775, 2008.
- LIAPI, E.; GESCHWIND, J. F. H. Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 8, p. 978-986, 2007.
- LINFANTE, I.; WAKHLOO, A. K. Brain aneurysms and arteriovenous malformations: Advancements and emerging treatments in endovascular embolization. **Stroke - Journal of the American Heart Association**, v. 38, n. 4, p. 1411-1417, 2007.
- LUBACH, J. W. *et al.* Solid-state NMR studies of pharmaceutical solids in polymer matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 6, p. 1504-1510, 2004.
- LUO, D. Nanotechnology and DNA delivery. **Material Research Society Bulletin**, v. 30, n. 9, p. 654-658, 2005.
- LYOO, W. S.; LEE, H. W. Synthesis of high-molecular-weight poly(vinyl alcohol) with high yield by novel one-batch suspension polymerization of vinyl acetate and saponification. **Colloid and Polymer Science**, v. 280, n. 9, p. 835-840, 2002.
- MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007.
- MACK, M. J. Minimally invasive and robotic surgery. **Journal of American Medical Association**, v. 285, n. 5, p. 568-572, 2001.
- MANDAL, S.; PANGARKAR, V. G. Pervaporative separation of a 1-methoxy propanol and water mixture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, n. 9, p. 2194-2210, 2002.
- MCCARTHY-KEITH; DESIREEE, M.; ARMSTRONG, A. Y. Innovations in uterine fibroid therapy. **Therapy**, v. 8, n. 2, p. 189-200, 2011.
- MENDES, W. D. S. *et al.* Estudo comparativo da reação inflamatória renal entre álcool de polivinil-flocular e álcool de polivinil + acetato de polivinil-esférico: Estudo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 3, p. 120-126, 2005.
- MO BIO. **Bioburden**, 2010. Disponível em: <<http://www.mobio.com/pages/services-bioburden.html>>. Acesso em: 04 mar. 2011.
- MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 13. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.504-505, 1996.
- OLIVEIRA, A. G. *et al.* Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n. 1, p.131-138, 2004.
- PACK, D. W. *et al.* Design and development of polymers for gene delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 7, p. 581-593, 2005.
- PATEL, A. A.; SOULEN, M. C. Agents for small vessel/tissue embolization and transcatheter tissue ablation - Current status and the future. In: BAUM, S; PENTECOST, M. J. (Ed.).
-

Abrams' angiography: Interventional radiology. 2. ed. Philadelphia, Pennsylvania - USA: Lippincott Williams & Wilkins, p. 169-175, 2006.

PEERSEN, O. B. *et al.* Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. **Journal of Magnetic Resonance, Series A**, v. 104, n. 3, p. 334-339, 1993.

PEIXOTO, L. S. *et al.* Synthesis of poly(vinyl alcohol) and/or poly(vinyl acetate) particles with spherical morphology and core-shell structure and its use in vascular embolization. **Macromolecular Symposia**, v. 243, p. 190-199, 2006.

PELAGE, J. P. *et al.* Uterine artery embolization in sheep: Comparison of acute effects with polyvinyl alcohol particles and calibrated microspheres. **Radiology**, v. 225, n. 3, p. 923-923, 2002.

PENTECOST, M. J. Transcatheter treatment of hepatic metastases. **American Journal of Roentgenology**, v. 160, n. 6, p. 1171-1175, 1993.

PORSTMAN, W. *et al.* Nonsurgical closure of oversized patent ductus-arteriosus with pulmonary-hypertension - Report of a case. **Circulation**, v. 50, n. 3, p. 376-381, 1974.

Portal do Mioma. **Embolização de miomas uterinos**, 2008. Disponível em: <<http://www.portaldomioma.com/2008/02/embolizacao-de-miomas-uterinos.html>>. Acesso em: 22 nov. 2010.

RAMAKANTAN, R. *et al.* Massive hemoptysis due to pulmonary tuberculosis: Control with bronchial artery embolization. **Radiology**, v. 200, n. 3, p. 691-694, 1996.

RASULI, P. *et al.* Spherical versus conventional polyvinyl alcohol particles for uterine artery embolization. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 19, n. 1, p. 42-46, 2008.

REINEKE, T. M.; GRINSTAFF, M. W. Designer materials for nucleic acid delivery. **Material Research Society Bulletin**, v. 30, n. 9, p. 635-639, 2005.

REPA, I. *et al.* Mortalities associated with use of a commercial suspension of polyvinyl alcohol. **Radiology**, v. 170, n. 2, p. 395-399, 1989.

RICCIARDI, R. *et al.* Investigation of the crystallinity of freeze/thaw poly(vinyl alcohol) hydrogels by different techniques. **Macromolecules**, v. 37, n. 25, p. 9510-9516, 2004.

RIMON, U. *et al.* Ethanol and polyvinyl alcohol mixture for transcatheter embolization of renal angiomyolipoma. **American Journal of Roentgenology**, v. 187, n. 3, p. 762-768, 2006.

SHI, H. B. *et al.* Preoperative transarterial embolization of spinal tumor: Embolization techniques and results. **American Journal of Neuroradiology**, v. 20, n. 10, p. 2009-2015, 1999.

SMITH, S. J. Uterine fibroid embolization. **American Family Physician**, v. 61, n. 12, p. 3601-3607, 2000.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S/A, v. 1, p. 388-391, 2001.

SPYT, T. J.; DE SOUZA, A. C. Minimally invasive therapy and robotics. **British Medical Bulletin**, v. 59, p. 261-268, 2001.

STADLER, P. *et al.* Minimally invasive operations in vascular surgery. **Casopis Lekaru Ceskych**, v. 150, n. 4-5, p. 244-249, 2011.

STAMPFL, S. *et al.* Inflammation and recanalization of four different spherical embolization agents in the porcine kidney model. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 19, n. 4, p. 577-586, 2008a.

STAMPFL, S. *et al.* Biocompatibility and recanalization characteristics of hydrogel microspheres with polyzene-F as polymer coating. **Cardiovascular and Interventional Radiology**, v. 31, n. 4, p. 799-806, 2008b.

STAMPFL, S. *et al.* Immunohistochemical characterization of specific inflammatory tissue reactions following embolization with four different spherical agents in the minipig kidney model. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 20, n. 7, p. 936-945, 2009.

STAMPFL, U. *et al.* Experimental liver embolization with four different spherical embolic materials: Impact on inflammatory tissue and foreign body reaction. **Cardiovascular and Interventional Radiology**, v. 32, n. 2, p. 303-312, 2009.

STROSBERG, J. R. *et al.* Selective hepatic artery embolization for treatment of patients with metastatic carcinoid and pancreatic endocrine tumors. **Cancer Control**, v. 13, n. 1, p. 72-78, 2006.

TADAVARTHY, S. M.; MOLLER, J. H.; AMPLATZ, K. Polyvinyl-alcohol (Ivalon) - New embolic material. **American Journal of Roentgenology**, v. 125, n. 3, p. 609-616, 1975.

TERAO, T.; MAEDA, S.; SAIKA, A. High-resolution solid-state ^{13}C NMR of poly(vinyl alcohol) enhancement of tacticity splitting by intramolecular hydrogen bonds. **Macromolecules**, v. 16, n. 9, p. 1535-1538, 1983.

TRICOT, C. **Curves and fractal dimension**. New York: Springer-Verlag, 1995.

US PHARMACOPEIA 32. **Biological reactivity tests *in vitro***, 2009.

WHITE, R. I. Embolotherapy in vascular disease. **American Journal of Roentgenology**, v. 142, n. 1, p. 27-30, 1984.

WRIGHT, K. C. *et al.* Partial splenic embolization using polyvinyl-alcohol foam, dextran, polystyrene, or silicone: An experimental-study in dogs. **Radiology**, v. 142, n. 2, p. 351-354, 1982.

XIAO, H. *et al.* Arterial embolization: A novel approach to thyroid ablative therapy for graves' disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 8, p. 3583-3589, 2002.

YUAN, H. G.; KALFAS, G.; RAY, W. R. Suspension polymerization. **Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics**, v. C31, n. 2-3, p. 215-299, 1991.

ZHANG, W.; ZHANG, Z.; WANG, X. Investigation on surface molecular conformations and pervaporation performance of the poly(vinyl alcohol) (PVA) membrane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 333, n. 1, p. 346-353, 2009.

10.1. Artigo Publicado

BASSO, G. G. *et al.* Synthesis and characterization of novel, highly crystalline poly(vinyl alcohol) microspheres for chemoembolization therapy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 3, p. 1417-1423, 2011.

Synthesis and Characterization of Novel, Highly Crystalline Poly(vinyl alcohol) Microspheres for Chemoembolization Therapy

Vinícius Ladeia Semenzim,¹ Glaucia Grazielli Basso,¹ Danilo Antonio da Silva,¹ Adriano de Vasconcellos,¹ Guilherme Agreli,² Ana Paula Marques Lima-Oliveira,² Rosa Sayoko Kawasaki-Oyama,² Domingo Marcolino Braille,² José Geraldo Nery¹

¹Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

²Departamento de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, Braille Biomédica Indústria, Comércio e Representações Limitada, São José do Rio Preto, São Paulo 15091-450, Brazil

Received 15 June 2010; accepted 17 October 2010

DOI 10.1002/app.33623

Published online 3 March 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

ABSTRACT: Biodegradable polymeric microspheres can be used to deliver drugs through controlled rate and targeted processes. The drug is released from the particles by drug leaching or degradation of the polymeric matrix. Crystallinity can play a very important role in the degradation of polymeric matrices; it can affect the drug-release rate, especially in chemoembolization. Most commercial embolic agents have a low degree of crystallinity, and the correlation between the drug-delivery rate and the degree of crystallinity is not fully understood. This study presents

the appropriated synthesis conditions for the preparation of highly crystalline poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) microspheres and physico-chemical characterizations by scanning electron microscopy, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and cross-polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 121: 1417–1423, 2011

Key words: biomaterials; NMR; synthesis; X-ray

INTRODUCTION

The decodification of the human genome and the rapid technological advancement in nanotechnology has created the ability to design patient-specific drugs that can alter the cellular machinery at the genetic level in a way that controls or treats a specific disease. Designing nucleic acid drugs and engineering novel delivery vehicles that encapsulate and effectively transport genetic materials into cells provides an opportunity to enhance the understanding of disease mechanisms and may help treat or cure these diseases.¹ There has been considerable research effort into the search for novel families of nonviral vectors that can be

assembled with entities, such as small molecules of drugs, peptides, proteins, and nucleic acids, to be used as a new class of therapeutic entities for targeted cancer treatment.¹ Polymeric particles with a controlled size and morphology associated with appropriate chemical properties, such as hydrophilicity, sorbability, bioaffinity, and biodegradability, have been widely used in several biomedical applications,^{2,3} especially in embolization and chemoembolization.^{4–7}

Embolizations are defined as therapeutic vascular occlusions that are used to prevent or treat pathological conditions *in situ*. The intravascular interventional procedures that produce artificial embolizations can be useful in mammals for controlling internal bleeding, blocking the blood supply to tumors, and relieving pressure in vessel walls near aneurysms. Chemoembolization advantageously combines arterial embolization of the vascular supply of a neoplasm with the controlled intra-arterial infusion of chemotherapeutic drugs.^{8–14} Currently, some of the most commonly used embolic agents are particles made of poly(vinyl alcohol) (PVA), and their use is directly related to their biocompatibility, good elasticity, high compressibility, and effective chemical resistance to acids, bases, and detergents.⁶

PVA particles are divided into two classes of particles: nonspherical PVA foams or sponges and

V. L. Semenzim and G. G. Basso contributed equally to this work.

Correspondence to: J. G. Nery (nery@ibilce.unesp.br).

Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Contract grant sponsor: Braille Biomédica Indústria, Comércio e Representações Limitada.

Contract grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Journal of Applied Polymer Science, Vol. 121, 1417–1423 (2011)
© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

spherical particles. Traditional nonspherical PVA foams or sponges are irregularly shaped and generally contain a range of pore sizes that are produced during the manufacturing process by the whipping of air into the PVA solution before crosslinking. The disadvantages of these particles include their imprecise size and the open edges on the particles, which can cause them to clump together and subsequently plug up delivery catheters or become occluded at a site next to the target site. Usually, the undesirable characteristics related to nonspherical PVA particles can be minimized by the use of spherical particles. Spherical particles can penetrate more deeply into the vasculature than traditional particles because of their uniform shape, and they are rarely reported to occlude delivery catheters.

Calibrated particles have drastically changed the conditions of embolization because the radiologist may adapt the size of the vessels to be occluded so that accurate targeting can be achieved. Trisacryl gelatin microspheres (Embosphere Microspheres, Biosphere Medical, Rockland, MA) were the first commercially approved in Europe (approval by CE (European Community)) in 1997 and in the United States (approval by the U.S. Food and Drug Administration) for general embolization in 2000 and, specifically, for uterine fibroid embolization in 2002. Thereafter, two PVA-based microspheres, named *Contour PVA Embolization Particles* (Boston Scientific, Natick, MA) and *Bead Block* (Biocompatibles, Farnham, United Kingdom), have been developed; both were approved in 2007 in Europe and in the United States.¹⁵

PVA cannot be prepared by directed polymerization because of the tautomerism of the vinyl alcohol monomer, and it is usually obtained by the saponification of poly(vinyl esters), such as poly(vinyl acetate) (PVAc) and poly(vinyl pivalate), although PVAc is the most common precursor of PVA. Commonly used polymerization methods for the monomeric precursors of PVA are bulked, solution, emulsion, and suspension polymerizations. Nevertheless, the suspension polymerization method is the most used method because it has several advantages, including the easy removal of the heat produced by the strong exothermic reaction, a high rate of conversion, and the formation of polymer particles with diameters of 30–1200 μm .^{16,17} Several authors have shown that particles with a regular spherical morphology and size could be obtained with the suspension polymerization technique instead of particles with irregular shapes and sizes,^{5,18} as are usually found in many commercial embolization products. However, a careful and critical analysis of the polymeric crystalline structures of the synthesized particles showed that there was no improvement in the crystallinity of the synthesized microspheres.

In general, a typical X-ray diffraction (XRD) pattern of the PVA microspheres synthesized by the suspension method is characterized by a broad diffraction peak. For chemoembolization with PVA microspheres, it is important to consider not only the size distribution of the polymeric particles and their well defined morphology but also their crystalline structures. Several authors have investigated drug-polymer interactions using different polymeric matrixes carried or loaded with different drugs.^{2,3} The authors concluded that the crystallinity of the polymeric matrix could affect the release rate of the drugs through the degradation rate of the chain. It was observed that degradation first occurred in the amorphous region of the polymeric matrix followed by a slower degradation in the crystalline regions. Therefore, the drugs located or loaded in the amorphous region were released more quickly than those located or loaded in the higher crystalline region.^{2,3} In this article, we present our preliminary results by reporting an experimental methodology capable of producing PVA/PVAc microparticles with a controlled size and spherical morphology and also with a higher crystallinity molecular structure compared to commercially available PVA particles.

EXPERIMENTAL

Materials

All chemicals were used without purification. Vinyl acetate (minimum purity = 99.9%), benzoyl peroxide (minimum purity = 99%), and PVA (average molecular weight = 78,000 Da, degree of hydrolysis = 85%) were supplied by Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil). Sodium hydroxide (NaOH; minimum purity = 99%) was supplied by Aldrich-Fluka (Steinheim, Germany). Distilled water was used as the suspending medium.

Synthesis of the PVA/PVAc microspheres

PVA/PVAc microspheres were synthesized from modified procedures reported in the literature.^{5,6} In a typical reaction, the suspending agent, PVA (0.07 g), was dissolved in water (100 mL) under a nitrogen atmosphere and with constant stirring in a 250-mL homemade reactor fitted with a condenser. After degassing, 25 mL of the solution of the vinyl acetate monomers and 1 g of the initiator, benzoyl peroxide, were added all at once at a fixed polymerization temperature of 70°C. The system was kept under isothermal conditions with an agitation speed of 700 rpm. The reactions were interrupted after 5 h, and the particles were filtered, washed with distilled water, and then submitted to the saponification procedure.

For the saponification reaction, a flask equipped with a reflux condenser, a thermocouple, a dropped

TABLE I
Saponification Conditions and Degree of Crystallinity
of the PVA Microspheres

Sample	NaOH concentration (M)	Degree of crystallinity (%)
1	25	87.5 ± 2.1
2	20	78.4 ± 11.5
3	16	65.8 ± 7
4	12	56 ± 3.6
5	8	19.6 ± 0.2
6	4	14.3 ± 4.6

funnel, and a stirring device and an alkali solution of NaOH at different concentrations (see Table I) were used. The PVAc microspheres were slowly added to the flask with stirring, and the time for saponification reaction varied from 2 to 6 h at 35°C. After the saponification reaction, the particles were poured into cold distilled water and kept there for approximately 12 h to separate and sink the PVA/PVAc microspheres. The final products were dried *in vacuo* at 37°C for 1 day before characterization by XRD, solid-state cross-polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance (CP-MAS NMR), differential scanning calorimetry (DSC), and scanning electronic microscopy (SEM).

PVA/PVAc microsphere characterization

The XRD patterns of the synthesized polymeric particles were collected with a Rigaku RotaFlex RU200B (Tokyo, Japan) on a rotating anode source with a flat-plate Bragg-Brentano geometry, operating with Cu K α radiation (wavelength = 1.5418 Å) at 50 kV and 100 mA, and equipped with a graphite monochromator. The powder diffraction patterns were recorded in the range $2\theta = 5\text{--}80^\circ$ with a scan step of 0.02° and at a rate of 10 s/step. NMR measurements were performed with a Varian Inova spectrometer (Palo Alto, California) operating at 400 and 100.5 MHz for ^1H and ^{13}C , respectively. A 5-mm magic angle spinning probe (Jackobsen design) was used in the measurement. The CP-MAS method with a linear amplitude variation of the ^1H pulse was used.^{19–21} The strength of the ^1H decoupling field applied during the signal acquisition was 60 KHz. A contact time of 1 ms, a spinning frequency of 10 KHz, and recycle delays of 3 s were used. SEM images were recorded with an XL30 FEG instrument, and before the analysis, a thin coating of gold was deposited onto the samples. Small amounts of dried polymeric particles (2.2 mg) were characterized by DSC (DSC 404C controlled by TASC 424/3A, Netzsch 404C controlled by TASC 424/3A, Selb, Germany) between 25 and 300°C with a platinum crucible. The equipment was calibrated against an indium standard (melting temperature = 158.5°C). A

constant heating rate of 10°C/min and a flux of 0.50 cm³/min of nitrogen were used.

RESULTS AND DISCUSSION

The XRD data shown in Figure 1 provide strong evidence that the crystalline structures of the synthesized polymeric particles changed with the increasing NaOH concentration used during the saponification process. It is clear from Figure 1 that the saponification reactions performed with NaOH concentration of 4 and 8M resulted in polymeric particles whose XRD patterns were characterized by very broad Bragg diffraction peaks in the region $2\theta = 7\text{--}30^\circ$. The absence of well-defined and intensive Bragg diffraction peaks for these samples revealed their amorphous nature. On the other hand, when the NaOH concentration was increased from 12 to 25M, the XRD patterns of the resulting polymeric particles showed a completely different spectrum. It was evident from the XRD patterns that the new diffraction peaks were an indication that novel crystallographic arrangements were formed with the addition of high-concentration NaOH solutions. The

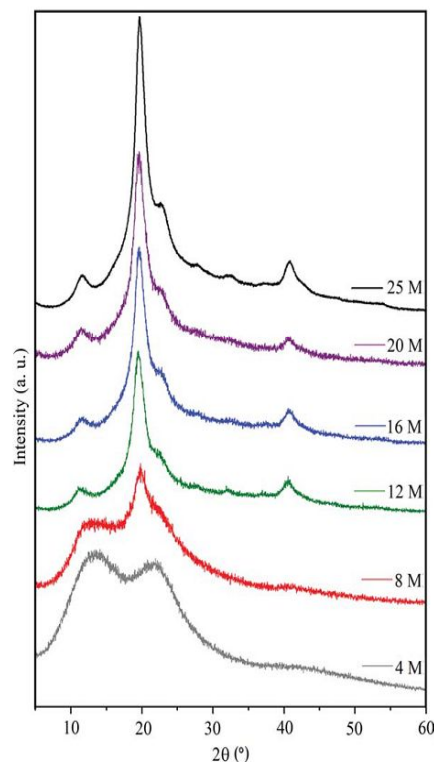


Figure 1 XRD patterns of the laboratory-made polymeric particles. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

1420

SEMENZIM ET AL.

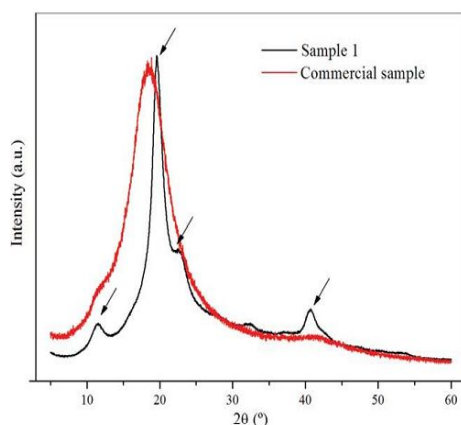


Figure 2 XRD patterns of the commercial and highly crystalline polymeric particles. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com]

most striking case occurred for the sample prepared with a 25M NaOH solution (sample 1) because its XRD pattern showed four distinct Bragg diffraction peaks at 2θ values of 11.5, 19.5, 23.0, and 40.5°. The breadth and peak shape of this sample in comparison with the other ones clearly indicated that sample 1 was more crystalline than the other samples prepared in this study and the other PVA/PVAc polymeric particles previously reported in the literature.^{5,6,16}

Figure 2 shows a detailed XRD pattern of sample 1 compared with the XRD pattern of the commercial PVA sample available on the market (Boston Scientific). The well-defined and strong Bragg diffraction peaks of sample 1 compared to the broad Bragg diffraction peak of the commercial one indicated that sample 1 was more crystalline than its counterpart. Most of the XRD patterns of the PVA microspheres reported in the literature were similar to the XRD pattern of the commercial sample,^{5,6,16} and to the best of our knowledge, this was the first XRD pattern of a highly crystalline PVA microsphere reported up to this point. PVA is a semicrystalline synthetic polymer whose structure is characterized by chains in transplanar conformation packed in a monoclinic unit cell with $a = 7.81 \text{ \AA}$, $b = 2.52 \text{ \AA}$ (chain axis), $c = 5.51 \text{ \AA}$, and $\beta = 91.42^\circ$ and containing single monomer units of two chains (a , b and c are the unit cell parameters and β is the angle of the monoclinic unit cell parameters). The strongest PVA crystalline reflections occurred at $2\theta = 19.4$ and 20.1° ; these reflections correspond to the superposition of the equatorial (10 $\bar{1}$) and (101) reflections, respectively.^{22–24}

On the basis of the unit cell proposed by Bunn²² and other more recent crystallographic studies on the structures of PVA hydrogels,^{25,26} PVA microfibrils,^{27,28} and PVA films,²⁹ it was possible to assign

the diffraction peaks of sample 1 observed at 2θ values of 11.5, 19.5, 23.0, and 40.5° to the (100), (10 $\bar{1}$), (200), and (201) reflections, respectively.

Figure 3 shows the degree of crystallinity of the PVA particles calculated from the DSC data with the following correlation:

$$\text{Crystallinity (\%)} = \frac{\Delta H}{\Delta H^0} \times 100$$

where ΔH is the change in the heat of fusion and ΔH^0 is the change in the heat of fusion of 100% crystalline PVA (this can be obtained directly from DSC plots and is usually considered to be 150 J/g).^{27,30–32} The calculated degrees of crystallinity are listed in Table I. It was evident from the data that the degree of crystallinity of the samples increased with the concentration of the NaOH solution (see Fig. 3). Sample 1 presents the highest degree of crystallinity ($87.5 \pm 2.1\%$) compared with the other samples, and the commercial sample (PVA Foam Embolization Particles, Cook Medical (Bloomington, Indiana)) presented the lowest degree of crystallinity, which was calculated to be around $5.7 \pm 0.3\%$.

Although the syntheses conditions described in Table I affected the degree of crystallinity of the PVA particles, in terms of morphology, we did not notice any significant difference. All of the samples prepared according to the conditions described in Table I presented a spherical morphology, unlike the commercial samples (Fig. 4), and the main differences among them, besides the degree of crystallinity, were related to their color and stickiness. Sample 1 (Fig. 5) was reddish, and the particles were free-flowing spheres with a very small amount of debris. Samples 2–5 were yellowish, sample 6 (Fig. 6) was white, and the particles were sticky spheres that easily could form aggregates.

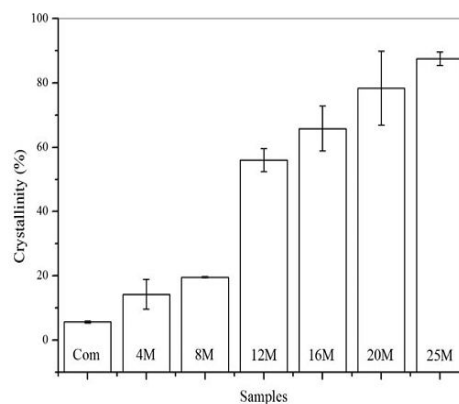


Figure 3 Comparison of the degree of crystallinity (obtained by DSC) for the commercial (Com) and laboratory-made polymeric particles.

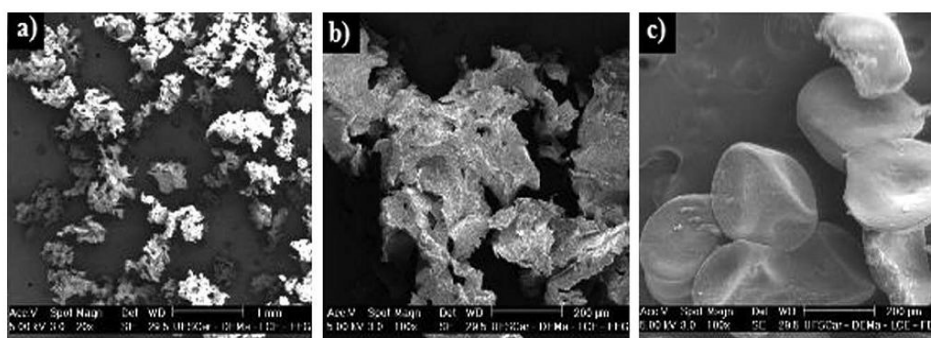


Figure 4 SEM images of the commercial PVA particles: (a,b) Cook Medical and (c) Boston Scientific.

To gain a better insight into the structural differences among the samples prepared in this study, solid-state CP-MAS ^{13}C -NMR experiments were performed. CP-MAS ^{13}C -NMR is a powerful tool for studying the miscibility and phase structure of polymer blends and for detecting specific intermolecular interactions.^{33–35} Figure 7 shows the CP-MAS ^{13}C -NMR spectra of the commercial sample (Boston Scientific) and samples 1 and 6. The spectra of samples 2–4 were very similar to the spectrum of sample 1, and the spectrum of sample 5 was very similar to the spectrum of sample 6. Therefore, only the spectra of samples 1 and 6 are shown.

The CP-MAS ^{13}C -NMR spectrum of sample 6 had some features that were very interesting: there were two sharp peaks to the far left and to the right with chemical shift values of 171 and 21 ppm, respectively, and these two peaks were assigned to PVAc, according to the literature.^{34–36} The CP-MAS ^{13}C -NMR spectrum of PVAc in the solid state presented four distinct and well-characterized chemical shifts: 40, 67, 171, and 21 ppm, whereas that of PVA in the solid state showed three distinct chemical shift values of 77, 71, and 65 ppm.^{34,37} Therefore, on the basis of these values reported in the literature, we

concluded that the two broad peaks in the region 30–80 ppm were a peak overlap of the chemical shifts of PVAc and PVA and indicated a blend of the two polymers.

The CP-MAS ^{13}C -NMR spectrum of the highly crystalline sample 1, on the other hand, showed splits for the chemical shift peak in the regions 65 and 71 ppm. It was proposed in the literature that the chemical shifts at 77, 71, and 65 ppm observed for solid PVA originated from the intramolecular and intermolecular hydrogen bonding of the CH carbon to the hydroxyl groups.^{36–38} The chemical shift at 77 ppm was assigned to the CH carbon with two intramolecular hydrogen bonds with the hydroxyl groups. The chemical shift at 71 ppm was assigned to the CH carbon with one intermolecular hydrogen bond with the hydroxyl group, whereas the chemical shift at 65 ppm was not assigned or related to any hydrogen bond with the hydroxyl groups in the cross-linked region. A theoretical model based in the literature for these assignments is shown in Figure 8.³⁷

A comparison between the CP-MAS ^{13}C -NMR spectra of the commercial sample and the highly crystalline sample 1 showed that, qualitatively, the commercial sample was greatly enriched with

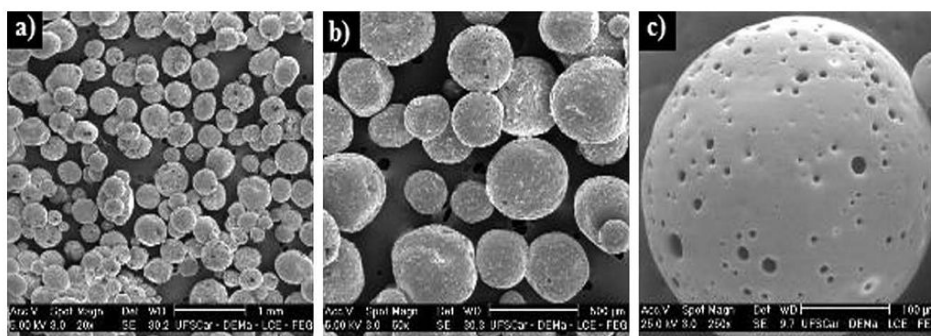


Figure 5 SEM images of the PVA/PVAc microspheres prepared by polymerization and saponification (sample 1).

1422

SEMENZIM ET AL.

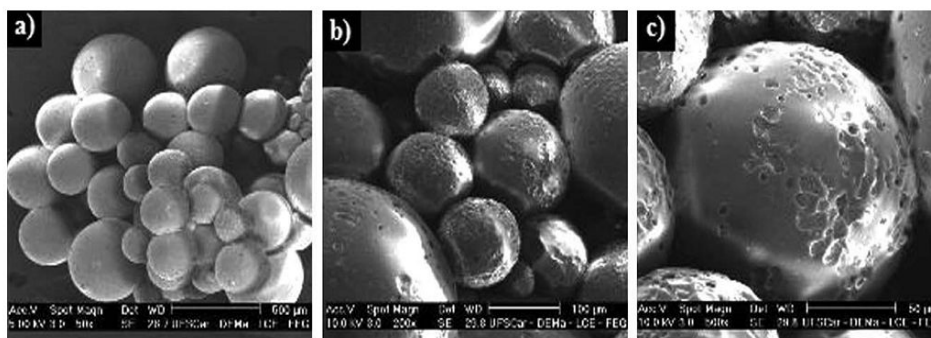


Figure 6 SEM images of the PVA/PVAc microspheres prepared by polymerization and saponification (sample 6).

intermolecular hydrogen bonds because it presented a very intense peak at 71 ppm. However, the chemical shift characteristic of intramolecular hydrogen bonds (77 ppm) was not present, and the chemical shift at 65 ppm was present only as a small shoulder. On the other hand, for sample 1, the situation was quite different because this sample presented two relatively intense chemical shift peaks (71 and 65 ppm) and a small peak at 77 ppm. The CP-MAS ^{13}C -NMR spectrum of the highly crystalline sample 1 was very similar to the spectrum of PVA in the solid state, with a predominant syndiotactic configuration, as reported in the literature.³⁷

On the basis of both the CP-MAS ^{13}C -NMR and XRD data, one possible explanation or reason for the

formation of highly crystalline PVA microspheres is the excess of strong base (25M NaOH) used in the saponification step of the reaction. The excess of strong base induced the formation of intermolecular hydrogen bonds, which were formed because of the chemical bonding of the CH carbon of the polymer interchains with the hydroxyl groups in the cross-linked region; this resulted in highly crystalline samples and also increased the intensity of the peak at 65 ppm, which is a chemical shift characteristic of a syndiotactic configuration (see Fig. 8).

At this time, chemoembolization studies with these new highly crystalline microspheres are being performed to examine the drug-polymer interactions and release rate of the loaded drugs *in vitro* and *in vivo* with the highly crystalline polymeric matrix. The results of this ongoing research will be reported in future publications.

CONCLUSIONS

Highly crystalline and spherical PVA particles were prepared through a controlled polymerization reaction followed by a saponification process. Several syntheses were made. However, the best results were obtained when NaOH solutions at high concentrations were used during the saponification process.

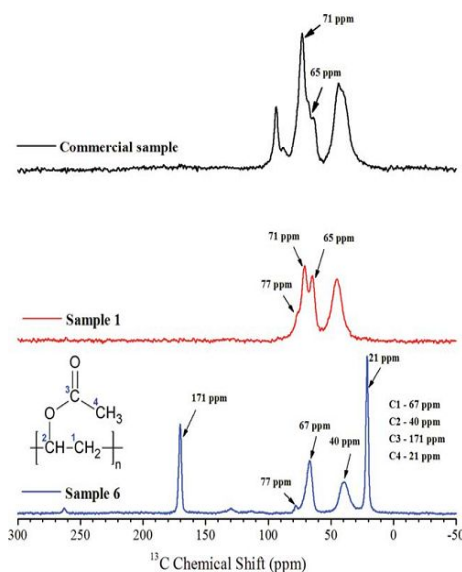


Figure 7 ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the commercial sample, sample 1, and sample 6. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://www.interscience.wiley.com)]

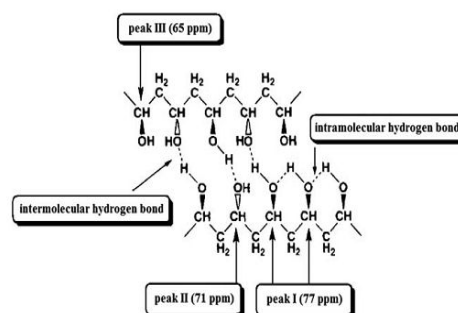


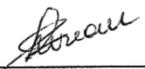
Figure 8 Theoretical model of the hydrogen bonds in PVA.

The crystallinity of the PVA microspheres obtained through this procedure was superior to commercially available ones. Correlations between the XRD and CP-MAS ^{13}C -NMR data indicated that the high crystallinity of the samples was due to the presence of the intermolecular hydrogen bonds, which were formed by the chemical bonding of the CH carbon of the polymer interchains with the hydroxyl groups in the crosslinked region.

References

- Reineke, T. M.; Grinstaff, M. W. *MRS Bull* 2005, 30, 635.
- Edlund, U.; Albertsson, A.-C. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2000, 38, 786.
- Edlund, U.; Albertsson, A.-C. *Adv Polym Sci* 2002, 157, 67.
- Nitta, N.; Ohta, S.; Tanaka, T.; Takazakura, R.; Toyama, T.; Sonoda, A.; Seko, A.; Furukawa, A.; Takahashi, M.; Murata, K.; Kurumi, Y.; Tani, T.; Sakamoto, T.; Tabata, Y. *Eur J Radiol* 2009, 71, 519.
- Pinto, J. C.; Lopez, G. B.; Niemeyer, M. A. L.; Silva, F. M.; Melo, P. A.; Nele, M. W.O. Pat. 050591A2 (2006).
- Peixoto, L. S.; Silva, F. M.; Niemeyer, M. A. L.; Espinosa, G.; Melo, P. A.; Nele, M.; Pinto, J. C. *Macromol Symp* 2006, 243, 190.
- Liu, X.; Heng, W. S.; Paul, A.; Li, Q.; Chan, L. W. *J Controlled Release* 2006, 116, 35.
- Raoul, J. L.; Heresbach, D.; Bretagne, J. F.; Ferrer, D. B.; Duvauferrier, R.; Bourguet, P.; Messner, M.; Gosselin, M. *Cancer* 1992, 70, 585.
- Roos, G.; Christensson, P. I.; El Hag, I. A.; Jakobsson, B.; Teder, H.; Stenram, U. *Anticancer Res* 1993, 13, 635.
- Kyotani, S.; Nishioka, Y.; Okamura, M.; Tanaka, T.; Miyazaki, M.; Ohnishi, S.; Yamamoto, Y.; Ito, K.; Ogiso, T.; Tanada, S.; Terao, M. *Chem Pharm Bull* 1992, 40, 2814.
- Teder, H.; Johansson, C. J. *Anticancer Res* 1993, 13, 2161.
- Bechtel, W.; Wright, K. C.; Wallace, S.; Mosier, B.; Mosier, D.; Mir, S.; Kudo, S. *Radiology* 1986, 161, 601.
- Burton, M. A.; Chen, Y.; Atkinson, H.; Codde, J. P.; Jones, S. K.; Gray, B. N. *Int J Hyperther* 1992, 8, 485.
- Chiannilkulchai, N.; Ammoury, N.; Caillou, B.; Devissaguet, J. P.; Couvreur, P. *Cancer Chemother Pharm* 1990, 26, 122.
- Laurent, A. *Tech Vasc Intervent Radiol* 2007, 10, 248.
- Lee, S. G.; Kim, J. P.; Lyoo, W. S.; Kwak, J. W.; Noh, S. K.; Park, C. S.; Kim, J. H. *J Appl Polym Sci* 2005, 95, 1539.
- Lyoo, W. S.; Lee, H. W. *Colloid Polym Sci* 2002, 280, 835.
- Lee, S. G.; Lyoo, W. S. *J Appl Polym Sci* 2008, 107, 1701.
- Peersen, O. B.; Wu, X. L.; Kustanovich, I.; Smith, S. O. *J Magn Reson Ser A* 1993, 104, 334.
- Cook, R. L.; Langford, C. H.; Yamdagni, R.; Preston, C. M. *Anal Chem* 1996, 68, 3979.
- Dria, K. J.; Sachleben, J. R.; Hatcher, P. G. *J Environ Qual* 2002, 31, 393.
- Bunn, C. W. *Nature* 1948, 161, 929.
- Sakurada, I.; Fuchino, K.; Okada, N. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ* 1950, 23, 78.
- Bunn, C. W.; Peiser, H. S. *Nature* 1947, 159, 161.
- Cho, J. D.; Lyoo, W. S.; Chvalun, S. N.; Blackwell, J. *Macromolecules* 1999, 32, 6236.
- Lyoo, W. S.; Chvalun, S. N.; Ghim, D. H.; Kim, J. P.; Blackwell, J. *Macromolecules* 2001, 34, 2615.
- Ricciardi, R.; Auriemma, F.; Gaillet, C.; De Rosa, C.; Lauprêtre, F. *Macromolecules* 2004, 37, 9510.
- Ricciardi, R.; Auriemma, F.; De Rosa, C.; Lauprêtre, F. *Macromolecules* 2004, 37, 1921.
- Strawhecker, K. E.; Manias, E. *Macromolecules* 2001, 34, 8475.
- Hassan, C. M.; Peppas, N. A. *Macromolecules* 2000, 33, 2472.
- Zhang, W.; Zhang, Z.; Wang, X. *J Colloid Interface Sci* 2009, 333, 346.
- Mandal, S.; Pangarkar, V. G. *J Appl Polym Sci* 2002, 86, 2194.
- Wu, C.; McGinity, J. W. *Eur J Pharm Biopharm* 2003, 56, 95.
- Lubach, J. W.; Padden, B. E.; Winslow, S. L.; Salisbury, J. S.; Masters, D. B.; Topp, E. M.; Munson, E. J. *Anal Bioanal Chem* 2004, 378, 1504.
- Cheung, M. K.; Wang, J.; Zheng, S.; Mi, Y. *Polymer* 2000, 41, 1469.
- Terao, T.; Maeda, S.; Saika, A. *Macromolecules* 1983, 16, 1535.
- Kobayashi, M.; Ando, I.; Ishii, T.; Amiya, S. *J Mol Struct* 1998, 440, 155.
- Kobayashi, M.; Ando, I.; Ishii, T.; Amiya, S. *Macromolecules* 1995, 28, 6677.

10.2. Parecer da Comissão de Ética

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA FAMERP	<i>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto</i> Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/ SP
DELIBERAÇÃO CEEA Nº 003/2011	
A Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEEA/FAMERP, em reunião desta data analisou o projeto de pesquisa intitulado “Embolização vascular renal e coelhos para estudo comparativo da reação inflamatória renal entre micropartículas de poli (álcool vinílico)” (Protocolo FAMERP nº 0741/2011), sob responsabilidade do Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi aprovado por essa Comissão, com a seguinte recomendação: o pesquisador deverá monitorar o bem estar dos animais no período pós-cirúrgico para se certificar da necessidade de um analgésico que não interfira com os dados a serem coletados na pesquisa.	
Atenção: Ao final do estudo o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final e enviar ao CEEA.	
São José do Rio Preto, 10 de fevereiro de 2011.	
 Profa. Dra. Débora Ap. Pires de Campos Zuccari Presidente da CEEA FAMERP	

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____ de _____ de 2011.

Assinatura