

RESSALVA

Alertamos para ausência dos itens:
“Resultados, Discussão, Conclusão,
Perspectivas, Referências e Anexos”, não
incluídos pelo autor no arquivo original.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

VINÍCIUS LADEIA SEMENZIM

Pesquisa e desenvolvimento de microesferas de poli(vinil álcool)
com alta cristalinidade para utilização em embolização e
quimioembolização

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP
2012

VINÍCIUS LADEIA SEMENZIM

Pesquisa e desenvolvimento de microesferas de poli(vinil álcool) com alta cristalinidade para utilização em embolização e quimioembolização

Dissertação apresentada como parte dos requisitos 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

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2012

Semenzim, Vinícius Ladeia.

Pesquisa e desenvolvimento de microesferas de Poli(vinil álcool) com alta cristalinidade para utilização em embolização e quimioembolização / Vinícius Ladeia Semenzim. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2012.

94 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Geraldo Nery

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

1. Poli (vinil álcool). 2. Microesferas. 3. Cristalinidade. 4. Quimioembolização. I. Nery, José Geraldo. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 678.7

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

VINÍCIUS LADEIA SEMENZIM

Pesquisa e desenvolvimento de microesferas de poli(vinil álcool) com alta cristalinidade para utilização em embolização e quimioembolização

Dissertação apresentada como parte dos requisitos 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 São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto

Dr^a. Rosa Sayoko Kawasaki Oyama
Braile Biomédica – São José do Rio Preto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
28/Junho/2012

*Aos meus pais e minha madrinha Glória (in
memorian).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Nery pelo empenho em passar seus ensinamentos e experiências profissionais no papel de orientador.

Aos meus amigos do laboratório LACET, pelo companheirismo, ajuda e conselhos.

À minha namorada Reni, pelo amor, companheirismo, sustentação e paciência.

À minha madrinha Glória que foi uma das minhas maiores incentivadoras. Espero um dia te reencontrar.

A todos os meus familiares, que sempre em bons conselhos me incentivam.

Aos colegas da Braile, pelo apoio profissional, ensinamentos e oportunidades.

A família Carvalho, que me acolheu e sempre me incentivou.

A minha família, em especial ao meu pai Roberto, minha mãe Zaíra, meu irmão Vilson, minha cunhada Roberta e meu sobrinho Arthur, por tudo.

Aos membros do Departamento de Física do IBILCE/UNESP, professores, técnicos, colegas e secretária, pelos ensinamentos e suporte.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto e sua aluna de doutorado Natália Bueno Leite, pela disponibilidade do uso de equipamentos do seu laboratório e disposição em nos ajudar com algumas medidas.

A CAPES e FINEP pelo suporte financeiro.

*“No tocante à inovação, não podemos, na verdade, prever exatamente o que vai acontecer, mas podemos sentir em que direção estamos indo.”**

Steve Jobs

* Extraído do livro “A Cabeça de Steve Jobs” (KAHNEY, L. A cabeça de Steve Jobs. Rio de Janeiro: Nova Fronteira Participações S. A., 2008, p.179).

RESUMO

Introdução: Partículas poliméricas com tamanho e morfologia controlados e propriedades físico-químicas adequadas são amplamente utilizadas em várias aplicações biomédicas, especialmente em embolização, uma técnica cirúrgica minimamente invasiva utilizada em tratamentos de diversas doenças vasculares e quimioembolização, que associa a embolização e a quimioterapia. Ela é realizada com uso de materiais denominados agentes embólicos, sendo as partículas de poli(vinil álcool) (PVA) amplamente utilizadas por apresentarem um alto grau de desempenho. As partículas de PVA estão disponíveis no mercado nas morfologias esféricas e floculares, sendo as esféricas as que apresentam menores riscos para o procedimento. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar microesferas de PVA para serem utilizadas em embolização e quimioembolização. Juntamente com a equipe de pesquisadores da empresa Braile Biomédica, a intenção é desenvolver um produto que ainda não é fabricado pela indústria nacional para ser comercializado a menores custos.

Materiais e Métodos: As microesferas de poli(vinil álcool) (PVA) foram sintetizadas pelo método de polimerização em suspensão, seguida de hidrólise alcalina (ou saponificação). Na etapa de saponificação, diferentes concentrações de NaOH foram utilizadas. As amostras sintetizadas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de Raios-X (DRX), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C - *cross polarization / magic angle spinning* (^{13}C RMN CP/MAS) e Potencial Zeta (ζ).

Resultados: A análise de MEV indicou que foram obtidas partículas esféricas. Os dados complementares de DRX, DSC e ^{13}C RMN CP/MAS indicam que à medida que se aumenta a concentração de NaOH (no processo de saponificação), as cadeias laterais da matriz polimérica se reordenam, aumentando o número de fases cristalinas do material e, consequentemente, o grau de cristalinidade. O Potencial Zeta (ζ) das amostras indicou que, em meio aquoso, há grande estabilidade coloidal da solução.

Conclusão: As microesferas de PVA foram sintetizadas com sucesso. As partículas possuem características físico-químicas desejáveis para serem utilizadas na embolização e, através da alta cristalinidade e cargas de superfície, potencialmente aplicáveis na quimioembolização.

Palavras-chave: Poli(vinil álcool); microesferas; cristalinidade; embolização; quimioembolização.

ABSTRACT

Introduction: Polymeric particles with size and morphology controlled and appropriate physicochemical properties are widely used in several biomedical applications, especially in embolization, a minimally invasive procedure routinely used in treatments of some vascular diseases, and chemoembolization, which combines embolization and chemotherapy. It is performed using materials called embolic agents, being poly(vinyl alcohol) (PVA) particles often used because its high performance. These particles are commercially available in spherical and flocculate morphologies, however spherical particles present lower risks than flocculates ones during the procedure. Thus, this study proposes to develop and improve spherical PVA particles to be used in embolization and chemoembolization. The development are being conducted by the researchers group from Braille Biomédica, the goal is to develop a product that is not yet produced in the national industry, commercializing it at lower costs.

Materials and Methods: PVA microspheres were synthesized by suspension polymerization method, followed by alkali hydrolysis (or saponification). In the saponification step, different concentrations of NaOH were used. The samples synthesized were characterized by Scanning Electronic Microscopy (SEM), X-ray Diffraction (XRD), Differential Scanning Calorimetry (DSC), ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance - cross polarization / magic angle spinning (^{13}C CP/MAS NMR) and Zeta Potential (ζ).

Results: SEM analysis indicated that spherical particles were obtained. The complementary data of XRD, DSC and ^{13}C CP/MAS NMR indicate that the use of high NaOH concentrations (in the saponification process) determines reordering in the lateral chains of the polymer, which causes an increase of material's crystallinity. Zeta Potential (ζ) data of the samples indicated that, in an aqueous medium, there is a great colloidal stability in the solution.

Conclusion: PVA microspheres were synthesized successfully. The particles have physicochemical characteristics desirable for their use in embolization and, by its high crystallinity and its surface charges, potentially applicable in chemoembolization.

Keywords: Poly(vinyl alcohol); microspheres; crystallinity; embolization; chemoembolization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - (a) Partículas de poli(vinil álcool) (PVA) não esféricas. (b) Partículas de PVA esféricas.....	19
FIGURA 2 - Diferentes configurações dos cateteres regulares de angiografia.....	24
FIGURA 3 - Esquema de embolização de mioma uterino.....	24
FIGURA 4 - Mecanismo de ação da quimioembolização transarterial para o tratamento de carcinoma hepatocelular.....	27
FIGURA 5 - Fórmula estrutural do Cloridrato de Doxorrubicina.....	28
FIGURA 6 - Esquema de irrigação sanguínea de um tumor antes e após o bloqueio causado pelo agente embólico	29
FIGURA 7 - Partículas de poli(vinil álcool) (PVA) não esféricas (PVA Embolization Particles - Cook [®] Medical).....	30
FIGURA 8 - Fórmula estrutural do poli(vinil álcool) (PVA).....	33
FIGURA 9 - Bead Block [™] (Biocompatibles [™]) são microesferas comercializadas em cinco tamanhos diferenciados pelas cores das seringas que as contêm	38
FIGURA 10 - Contour [®] PVA Embolization Particles (Boston [™] Scientific) são partículas de poli(vinil álcool) (PVA) não esféricas	39
FIGURA 11 - Embosphere [®] Microsphere (Biosphere [®] Medical) são microesferas gelatinosas	39
FIGURA 12 - Embozene [®] Microspheres (Celo [®] Nova) são microesferas poliméricas comercializadas em dez tamanhos e cores diferentes	40
FIGURA 13 - PVA Embolization Particles (Cook [®] Medical) são partículas de poli(vinil álcool) (PVA) não esféricas comercializadas em uma grande variedade de tamanhos: de 90 até 2.800 µm	41

FIGURA 14 - Hepasphere TM (Biosphere Medical®) – Partículas usadas para quimioembolização com Cloridrato de Doxorrubicina. São compostas do copolímero poli(vinil álcool-co-acrilato de sódio).....	41
FIGURA 15 - Imagens de microesferas para quimioembolização DC Beads® (Biocompatibles TM) preparadas com Doxorrubicina (vermelhas) e Irinotecano (azuis)	42
FIGURA 16 - Padrões de difração das partículas sintetizadas no laboratório em diferentes condições de saponificação	51
FIGURA 17 - Padrões de DRX de partículas comerciais e da amostra altamente cristalina..	53
FIGURA 18 - Comparação do grau de cristalinidade (obtido através do DSC) das amostras comerciais e sintetizadas no laboratório	54
FIGURA 19 - Distribuição de tamanhos das partículas sintetizadas. Cálculo realizado de acordo com as médias das massas obtidas em cada faixa de separação	55
FIGURA 20 - Imagens de MEV das partículas comerciais: (a,b) Cook Medical e (c) Boston Scientific.....	55
FIGURA 21 - Imagens de MEV das microesferas de PVA preparadas por polimerização em suspensão seguida de saponificação (amostra 1).....	56
FIGURA 22 - Imagens de MEV das microesferas preparadas por polimerização em suspensão seguida de saponificação (amostra 6).....	56
FIGURA 23 - Superfície das partículas sintetizadas nas condições: 4 M (amostra 6) (a-b) e 25 M (amostra 1) (c-d).....	57
FIGURA 24 - Espectros de ¹³ C RMN CP/MAS da amostra comercial, amostra 1 e 6	58
FIGURA 25 - Modelo teórico das ligações de hidrogênio no PVA	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Condições de sínteses: saponificação e velocidade de agitação das microesferas de PVA	47
TABELA 2 - Grau de cristalinidade das amostras sintetizadas nas diferentes condições de saponificação e da amostra comercial.....	53
TABELA 3 - Potencial Zeta (ζ) e condutividade em meio aquoso das amostras 1 e 6	58

LISTA DE 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 eletronegativo34
- 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(vinil acetato) (PVAc)..36
- ESQUEMA 4** - Propagação da cadeia polimérica na formação do poli(vinil acetato) (PVAc)36
- ESQUEMA 5** - Terminação da cadeia polimérica, por combinação, na formação do poli(vinil acetato) (PVAc)37
- ESQUEMA 6** - Hidrólise alcalina do poli(vinil acetato) (PVAc) para obtenção do poli(vinil acetato) (PVA), obtendo como subproduto o acetato de sódio (CH_3COONa)37
-

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

DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura

MAV - malformação arteriovenosa

MEV - microscopia eletrônica de varredura

PBS - *phosphate buffer saline*

PVA - poli(vinil álcool)

PVAc - poli(vinil acetato)

PVPi - poli(vinil pivalato)

TACE – *Transcatheter Arterial Chemoembolization*

THV - tumor hipervascularizado

TMI - terapia minimamente invasiva

UFC - unidades formadoras de colônias

UV - ultravioleta

VA - álcool vinílico

VAc – acetato de vinila

Siglas:

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

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

IBILCE - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

MAV – Malformação Arteriovenosa

SCTIE – Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos

SUS - Sistema Único de Saúde

THV – Tumores Hipervascularizados

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ESQUEMAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
 1. INTRODUÇÃO	 17
 2. JUSTIFICATIVA.....	 20
 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 22
3.1. Terapia Minimamente Invasiva	22
3.2. Embolização Vascular	22
3.3. Quimioembolização Transarterial.....	25
3.4. Agentes Embólicos.....	28
3.5. Partículas Esféricas de PVA/PVAc.....	31
3.5.1. Polimerização em Suspensão	31
3.5.1.1. Agentes de Suspensão	32
3.5.1.2. Iniciadores.....	33
3.5.2. Síntese de Partículas Esféricas de PVA/PVAc	34
3.6. Dados Econômicos.....	38
3.7. Dados Sociais.....	43
 4. OBJETIVOS	 45
4.1. Objetivos Gerais.....	45
4.2. Objetivos Específicos.....	45
 5. MATERIAIS E MÉTODOS	 46
5.1. Materiais	46
5.2. Síntese de microesferas de PVA/PVAc.....	46
5.3. Caracterização das microesferas de PVA/PVAc	48
5.3.1. Difração de Raios-X	48

5.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura	48
5.3.3. Distribuição de Tamanhos e Microscopia Eletrônica de Varredura	49
5.3.4. Ressonância Magnética Nuclear	49
5.3.5. Potencial Zeta	50
6. RESULTADOS	51
6.1. Difração de Raios-X.....	51
6.2. Calorimetria Diferencial de Varredura.....	53
6.3. Distribuição de Tamanhos e Microscopia Eletrônica de Varredura	54
6.4. Ressonância Magnética Nuclear	57
6.5. Potencial Zeta	58
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÃO	66
9. PERSPECTIVAS	67
9.1. Avaliação as Suspensão das Partículas e Liberação via Cateter.....	67
9.2. Realização de Experimentos <i>in vivo</i> com as Partículas de PVA/PVAc	67
9.3. Funcionalização Química das Partículas Cristalinas de PVA para o uso em Quimioembolização	68
9.3.1. Materiais	68
9.3.2. Preparação das Microesferas Cristalinas para o Carregamento com o Cloridrato de Doxorrubicina	69
9.3.3. Preparação e Determinação do Nível de Carregamento do Fármaco.....	69
9.3.4. Avaliação do Tamanho e Aparência das Microesferas Carregadas	70
9.3.5. Análise de Suspensão e Liberação das Microesferas Carregadas com Doxorrubicina via Cateter.....	70
9.3.6. Teste de Eluição <i>in vitro</i> das Partículas com Doxorrubicina	71
9.4. Realização de Experimentos <i>in vivo</i> com as Partículas Carregadas com o Fármaco.....	71
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
11. ANEXOS.....	86
11.1. Paper publicado no <i>Journal of Applied Polymer Science</i>	86
11.2. Paper publicado <i>on line</i> no <i>Journal of Biomedical Materials Research – Part A</i>	93

11.3. Parecer da Comissão de Ética para Teste <i>in vivo</i> das Partículas para Embolização	94
--	----

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 novas drogas 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, buscam-se meios ou vetores mais eficientes no transporte dessas drogas 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 gênica 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. Através da determinação das suas estruturas, o mecanismo de *drug delivery* que pode ser realizado com o auxílio desses materiais torna-se facilitado (LEWIS, 1990). Um dos maiores obstáculos que limita as novas terapias é a deficiência de métodos seguros e eficientes para a liberação de drogas *in situ*. Assim, é provável que sistemas baseados em polímeros tornem-se importantes ferramentas para aplicações clínicas (PACK *et al.*, 2005).

A nanotecnologia aplicada a sistemas de liberação de drogas surgiu no início da década de 80 como um método comercialmente atrativo para a administração farmacológica. Desde então, sistemas poliméricos micro e nanoestruturados estão sendo aplicados como veículos de liberação, modulando a velocidade com que os fármacos penetram na circulação sanguínea, atravessam as barreiras biológicas e atingem o alvo. Além disso, esses sistemas podem direcionar a droga 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). Este mecanismo de ação proporciona a liberação da droga no sítio

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: 03/02/2011.

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

As terapias minimamente invasivas (TMIs) tratam doenças buscando minimizar as agressões aos tecidos envolvidos, restringindo os procedimentos apenas à área afetada. Elas podem não apenas exercer seu caráter específico, mas também serem associadas à processos de *drug delivery*. Isso acontece, na maioria dos casos, quando um agente quimioterápico está encapsulado ou funcionalizado em algum vetor típico de TMI (LEWIS, 1990). A embolização vascular é um tipo de TMI bastante utilizado no tratamento de tumores hipervascularizados (THVs) e malformações arteriovenosas (MAVs) (LATCHAW; GOLD, 1979). Ela consiste da injeção de um material embólico, por meio de um cateterismo seletivo dos vasos sanguíneos que irrigam a “área alvo”, obstruindo mecanicamente a corrente sanguínea que nutre essa área. Dessa forma, ocorre a interrupção do fornecimento de nutrientes causando a necrose tumoral e consequentemente a diminuição do seu tamanho.

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 da 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 poli(vinil álcool) (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).

O resultado da aplicação de partículas de PVA como agente embólico é altamente eficaz. Isso porque este polímero atinge níveis satisfatórios de oclusão por se aderir às paredes dos vasos sanguíneos, apresentando resposta inflamatória não grave (STAMPFL *et al.*, 2008a).

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: 03/02/2011.

Partículas de PVA não esféricas (Figura 1a) possuem a superfície muito irregular, o que propicia a aglutinação e a agregação. Além disso, dificulta a 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 a oclusão vascular (DION *et al.*, 1986; WRIGHT *et al.*, 1982). Devido à maior exatidão na calibração do tamanho das partículas esféricas, é possível obter uma maior correspondência com o diâmetro dos vasos alvos, o que torna o procedimento de embolização mais seguro e acurado (BEAUJEUX *et al.*, 1996).

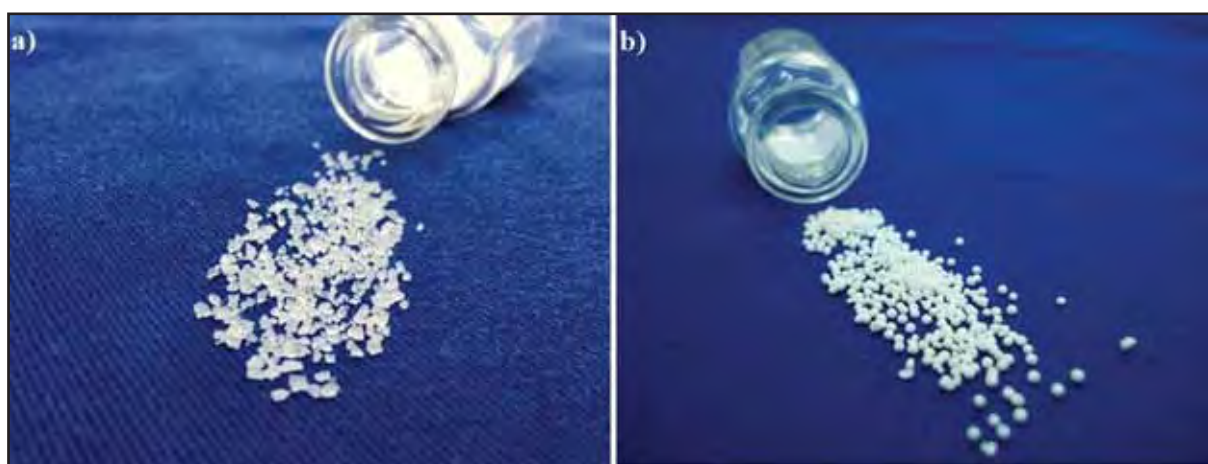


FIGURA 1 - (a) Partículas de poli(vinil álcool) (PVA) não esféricas. (b) Partículas de PVA esféricas.

2. JUSTIFICATIVA

Nos os últimos anos, foram realizados importantes avanços no desenvolvimento de sistemas poliméricos, estruturados em escalas micro e nanométricas, com potencial de aplicação em diferentes áreas como biotecnologia, indústria farmacêutica e 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 a utilização em de *drug-delivery*, onde os principais estudos estão voltados a transportes e liberação de drogas em regiões específicas do corpo.

Atualmente, um dos principais objetivos no desenvolvimento tecnológico dentro da área médica é ter várias opções para o tratamento de doenças. Dessa forma, novas terapias e procedimentos cirúrgicos estão permanentemente sendo desenvolvidos. A embolização e a quimioembolização são alternativas bem-sucedidas para o tratamento de doenças, preservando as regiões saudáveis. A embolização vascular, que tecnicamente consiste no bloqueio mecânico do fluxo sanguíneo em uma determinada região corporal, é um tipo de TMI que vem sendo bastante utilizada. A quimioembolização, sobretudo, é um “*step up*” da embolização, pois atua na oclusão dos vasos e no tratamento quimioterápico localizado.

Como o princípio da embolização é somente promover a oclusão seletiva de vasos sanguíneos, os tipos de materiais comumente usados são diferentes. Essa diferenciação dos materiais empregados depende da finalidade, nível e tempo de oclusão. O PVA é um dos materiais utilizados. Ele é empregado como um agente particulado e seu uso tem crescido proporcionalmente à recorrência dessa terapia médica. Até o presente momento, as partículas de PVA para embolização não são fabricadas no Brasil, elas precisam ser importadas para a sua aplicação. 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 por meio da embolização. É um tratamento relativamente simples, porém não é rotineiramente oferecido 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.

A quimioembolização é bastante eficaz em tumores que recebem aporte sanguíneo pelas artérias, como os do fígado, sejam eles primários ou metastáticos. Um fígado sadio tem duas vias de vascularização: a artéria hepática, responsável por 25% de nutrição do órgão e a veia porta, que responde por 75%. No câncer, essa relação se inverte e mais de 90% do sangue que vai para o tumor é levado pela artéria. Por isso, ao obstruir o suprimento arterial, são grandes as chances de reduzir o tamanho do tumor pela falta de nutrientes e o fármaco quimioterápico, complementa o tratamento destruindo as células cancerosas. Essa técnica, contudo, não tem fins curativos, ela reduz ou controla a doença possibilitando assim a realização de procedimentos posteriormente, como cirurgia ou transplante.

Diante deste panorama socioeconômico, a Braile Biomédica, que vem acompanhando a tendência mundial e, tem investindo fortemente no desenvolvimento de produtos voltados à TMI, principalmente para a área endovascular e oncológica, iniciou um projeto com o objetivo de desenvolver e comercializar microesferas para embolização e quimioembolização, com tecnologia nacional. O projeto está sendo executado em colaboração com pesquisadores da Universidade Estadual Paulista – IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto. Os resultados iniciais da síntese e análise das microesferas foram apresentados, sob a forma de duas Dissertações de Mestrado, pelos Pós-Graduandos Glaucia Grazielli Basso e Danilo Antônio da Silva, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, no ano de 2011. O presente estudo, portanto, constitui a terceira parte dos resultados inicialmente obtidos. As próximas etapas do desenvolvimento do projeto global envolverão os ensaios *in vitro* e *in vivo* para os procedimentos de embolização e quimioembolização.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Terapia Minimamente Invasiva

TMIIs são técnicas alternativas que evitam ou amenizam efeitos colaterais sistêmicos causados por tratamentos cirúrgicos convencionais. As suas principais vantagens são: a redução de sequelas, a diminuição do tempo de permanência no hospital e a diminuição de infecções e de dor pós-operatórias (COLDWELL, 1994). Todos esses benefícios reunidos resultam no retorno mais rápido do paciente às suas atividades normais.

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 (KILGER *et al.*, 2001).

As TMIIs 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 (COLDWELL, 1994).

3.2. Embolização Vascular

A embolização vascular é uma técnica da radiologia intervencionista que consiste, essencialmente, na oclusão mecânica seletiva de vasos sanguíneos que irrigam uma determinada região corporal a fim de diminuir a vascularização dessa região, ou seja, obstruir 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 especialistas em radiologia intervencionista, 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 disso, possui a vantagem de pouco ou nenhum efeito colateral pós-tratamento, que é característica de uma TMI.

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 de tumores antes de cirurgias com o objetivo de reduzir a perda sanguínea durante a operação. Atualmente as indicações para embolização incluem o controle de hemorragia, redistribuição do suprimento sanguíneo para auxiliar na terapia de infusão intravascular de drogas, 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).

Os profissionais capacitados a conduzir este procedimento realizam, previamente, uma angiografia⁴ no paciente, a partir da qual é feita uma avaliação para determinar quais vasos sanguíneos podem ser embolizados. 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, os tecidos doentes serão destruídos ou desvitalizados, resultando em um benefício terapêutico (SMITH, 2000).

A escolha do agente embólico e do cateter que irá conduzi-lo é extremamente importante e estratégico para o sucesso terapêutico. Existem essencialmente 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.

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.; SONDA, I.; DINI, L. I.; CALCAGNOTTO, F. N.; MARCHETT, N.; COBALCHINI, P. C. Fístula carótido-cavernosa com epistaxe letal: Relato de caso. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 59, n. 2A, p. 276-279, 2001.

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: 03/02/2011.

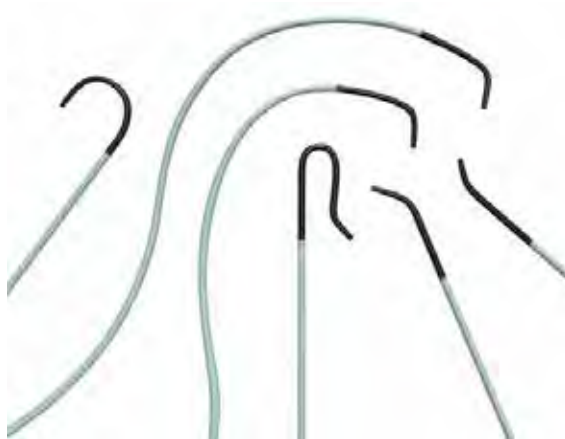


FIGURA 2 - Diferentes configurações dos cateteres regulares de angiografia.

(COOK MEDICAL, 2012)

A Figura 3 ilustra, esquematicamente, um procedimento de embolização uterina, onde as partículas são introduzidas por um fino cateter através da artéria femoral e depositadas na artéria uterina. Após o estudo angiográfico, os agentes embólicos (devidamente calibrados de acordo com os vasos sanguíneos) são injetados na artéria uterina, fluem para o mioma hipervascularizado, bloqueiam pequenas artérias e causam necrose isquêmica⁵ (SMITH, 2000; NAKAO, 2008).

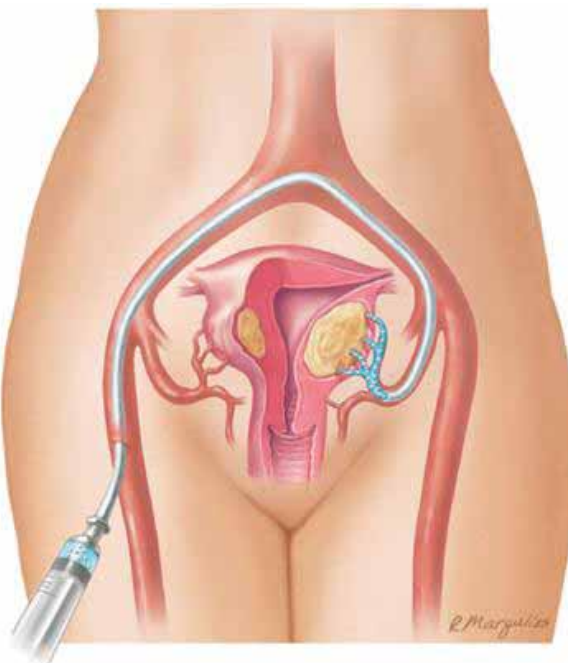


FIGURA 3 - Esquema de embolização de mioma uterino.

(PORTAL DO MIOMA, 2008)

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: 03/02/2011.

O sucesso da embolização fez crescer o interesse médico e acadêmico por essa terapia e pelos materiais utilizados para a realização do procedimento. Isso estimulou a capacitação de mais profissionais e o desenvolvimento de novos agentes para aperfeiçoar o tratamento terapêutico (COLDWELL; STOKES; YAKES, 1994).

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 (COLDWELL; STOKES; YAKES, 1994; PENTECOST, 1992).

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

3.3. Quimioembolização Transarterial

Na medicina oncológica existe a idéia antagônica de que a quimioterapia eleva os níveis do fármaco ao paciente em grandes e pequenas quantidades simultaneamente. ‘Grandes’ por causa das consequências tóxicas e ‘pequenas’ porque os níveis de droga são claramente inadequados no local do tumor. A razão para isto é que não foi identificada uma via metabólica para que o mecanismo de ação dos fármacos distinga células sadias de células cancerosas. Na ausência desta tecnologia, rotas alternativas estão sendo desenvolvidas para que veículos anti-proliferativos possam restringir a disposição de fármacos em certos órgãos e tecidos específicos, poupando tecidos não envolvidos da exposição aos fármacos e, conseqüentemente, dos efeitos nocivos das drogas citotóxicas (WILLMOTT, 1987). Dentre as várias modalidades terapêuticas que aplicam este mecanismo de ação, a quimioembolização transarterial é atualmente uma das alternativas mais bem sucedidas (RAJPUT & AGRAWAL, 2010).

A quimioembolização transarterial ou *Transcatheter Arterial Chemoembolization* (TACE) é um procedimento terapêutico minimamente invasivo aplicado por médicos especialistas em Radiologia Intervencionista e Oncologia e que associa os efeitos da embolização e da quimioterapia. A embolização causa isquemia, que produz hipóxia⁶ e morte celular. Adicionalmente, a hipóxia aumenta a permeabilidade das células e, por consequência, a concentração local do agente quimioterápico. A embolização também reduz o período de eliminação do fármaco, aumentando o tempo de exposição local (SOUSA *et al.*, 2011; BURT *et al.*, 1995; KATO *et al.*, 1981). A TACE possibilita uma concentração de quimioterápico no tumor 100 vezes superior ao conseguido na quimioterapia sistêmica (SOUSA *et al.*, 2011; RAMSEY, 2002).

Desde o início da década de 80, quando os primeiros estudos *in vitro* e *in vivo* foram relatados, a entrega de drogas anticâncer via quimioembolização tem atraído bastante a atenção das comunidades científicas, devido ao fato de tal procedimento mostrar-se mais eficiente do que somente a quimioterapia no tratamento de certos tumores (WIDDER, 1981). Todavia, o potencial de se transportar fármacos para a ação direta *in loco* encontrou diversas barreiras que teriam de ser vencidas, como as questões de esterilidade do produto, a encapsulação do fármaco no agente embólico, a alta complexidade de dosagem na liberação e o estudo dos agentes não virais que mais se adequariam a essas necessidades (WILLMOTT, 1987).

O procedimento foi inicialmente utilizado para o tratamento de diversos tipos de tumores, tais como renais e ósseos (KATO *et al.*, 1981), urológicos (SCHULTHEIS *et al.*, 1983) e localizados na cabeça e no pescoço (OKAMOTO *et al.*, 1985). Entretanto, nos dias atuais, a quimioembolização transarterial é mais conhecida por ser o procedimento mais indicado para pacientes com carcinomas hepatocelulares e que apresentam adequada preservação da função hepática. Isso porque um fígado saudável possui alta vascularização e sua irrigação sanguínea é realizada por duas vias: a veia porta, responsável por 75%, e a artéria hepática, responsável por 25%. No caso de carcinomas hepatocelulares, a situação se inverte e a irrigação é quase que totalmente realizada pela artéria hepática (80-90%). A obstrução dessa via, portanto, é uma rota decisiva para o tratamento de pacientes que

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

apresentam este quadro clínico (SOUSA, 2011; KALVA, 2008). A Figura 4 ilustra um esquema de como a quimioembolização hepática é realizada.

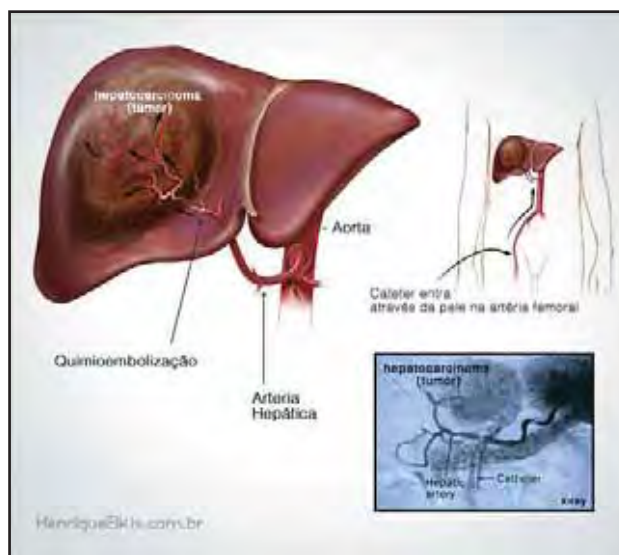


FIGURA 4 - Mecanismo de ação da quimioembolização transarterial para o tratamento de carcinoma hepatocelular.

(ELKIS INTERVENÇÃO, 2012)

Um exemplo da eficácia deste procedimento foi reportado por Li *et al.* (2011), que realizaram estudo clínico comparando o tratamentos em grupos de crianças diagnosticadas com tumores hepáticos metastáticos em estágios avançados. Neste estudo, os autores constataram que, aplicando a quimioembolização pré-operatória, 80,9% dos pacientes tiveram seus tumores removidos totalmente (ressecção) sem apresentar metástases, enquanto 65% tiveram o mesmo diagnóstico quando o tratamento pré-operatório foi a quimioterapia convencional. O estudo mostrou ainda que, para a quimioembolização associada à uma quimioterapia menos agressiva e mais curta (2 semanas), o sucesso da aplicação foi em 89% dos pacientes.

A eficácia do método terapêutico de quimioembolização depende de mais dois outros fatores: a droga com que se deseja realizar a quimioterapia localizada e o material responsável por ser o veículo de transporte e liberação *in loco*. Existem vários protocolos de tratamentos quimioterápicos e cada um está associado aos vários tipos de células cancerígenas, diagnóstico do paciente, dosagem, entre outros fatores. Isso compõe, complementarmente, o status do paciente e fornece informações para a estratégia a ser adotada. Dependendo do caso abordado, o fármaco escolhido atua sozinho ou associado a outras drogas. Todavia, alguns medicamentos são bem conhecidos, como o 5 -Fluorouracil (5-FU) (LONGLEY; HARKIN;

JOHNSTON, 2003), o Cloridrato de Irinotecano (FIORENTINI *et al.*, 2009) e o Cloridrato de Doxorrubicina (LI *et al.*, 2011).

O Cloridrato de Doxorrubicina ($C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl$), cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 5, é apontado como um dos medicamentos que melhor responde ao procedimento de quimioembolização. Por consequência, é o fármaco mais utilizado para esta finalidade. Ele é um antibiótico que tem sido usado com êxito para produzir regressões em várias neoplasias, tais como carcinomas de fígado, mama, pulmão, bexiga, tireóide e ovário, sarcomas ósseos e dos tecidos moles, dentre outros (LEWIS *et al.*, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2008).

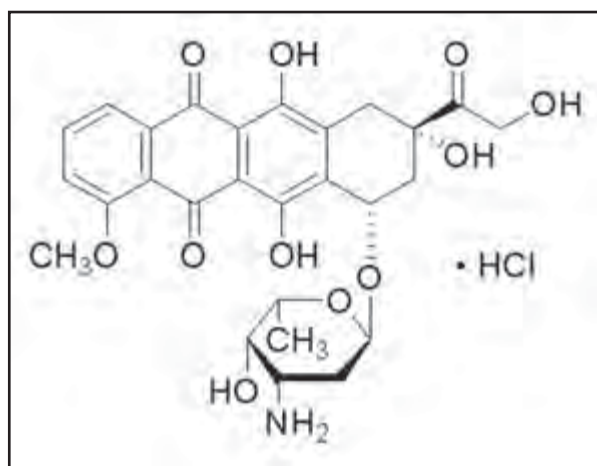


FIGURA 5 - Fórmula estrutural do Cloridrato de Doxorrubicina.

3.4. 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 6). 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 (GREENFIELD, 1980). Durante a aplicação desses agentes embólicos é necessário que haja uma atenção especial para a compatibilidade entre o tamanho do material a ser injetado 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 angiográfico (HEMINGWAY; ALLISON, 1988).

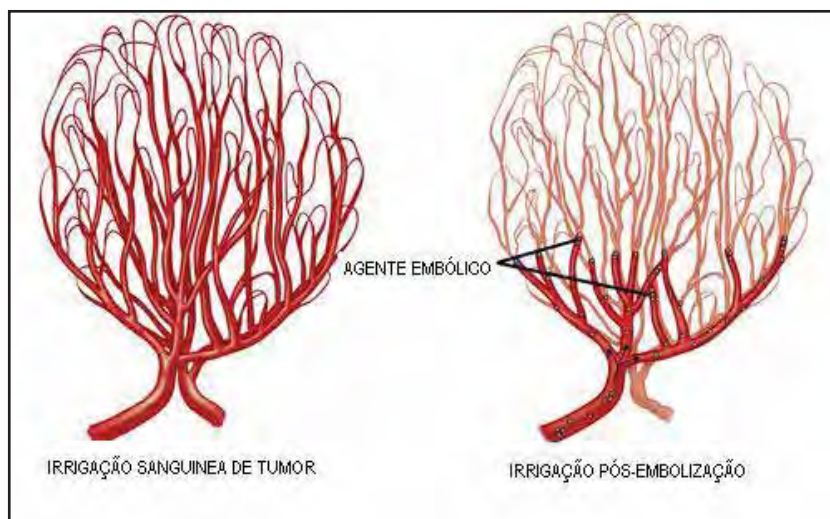


FIGURA 6 - Esquema de irrigação sanguínea de um tumor antes e após o bloqueio causado pelo agente embólico.

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

- a. Ao aspecto físico: podem ser agentes particulados (como o Gelfoam^{®7}, as partículas de PVA e as microesferas de outros 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.

O PVA é o agente embólico particulado mais utilizado. Todavia, algumas partículas de PVA existentes comercialmente apresentam alguns aspectos indesejáveis, como morfologia irregular (não uniformes) (Figura 7), o que torna a sua aglutinação mais recorrente,

⁷ 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: 10/02/2011.

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). Diante disso, foram desenvolvidas tecnologias de aprimoramento do material embólico e a utilização de partículas esféricas foi e ainda está sendo uma solução.



FIGURA 7 - Partículas de poli(vinil álcool) (PVA) não esféricas (PVA Embolization Particles - Cook® Medical).

(COOK MEDICAL, 2010)

Na quimioembolização, as características que o agente embólico (ou quimioembólico) precisa ter são as mesmas da embolização, somada à propriedade de ser um carregador e liberador de fármacos. Vários biopolímeros naturais e sintéticos já foram testados como carregadores: o amido, a albumina, gelatinas, o poli(L-ácido láctico) (PLLA)/ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA) e o PVA (NATSUME *et al.*, 1985; LIU *et al.*, 2006; LEWIS *et al.*, 2007). Há uma preferência generalizada no uso de microesferas pelos mesmos motivos da embolização. De uma forma geral, elas podem ser transportadas mais precisamente a distâncias maiores do que as partículas irregulares, além de proporcionarem oclusões mais uniformes de vasos sanguíneos (LIU, *et al.*, 2006). Rajput e Agrawal (2010) reportam que a tecnologia de microesferas é a única que oferece sistemas carregadores para diversos fármacos indicados para tratamentos de câncer e alta tolerância de adesão às paredes dos tecidos cancerosos.

3.5. Partículas Esféricas de PVA/PVAc

3.5.1. 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 são utilizados monômeros insolúveis na água, contendo um iniciador solúvel na fase orgânica. 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 (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

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 de gotas durante a polimerização. Ele pode afetar o tamanho e a forma das partículas, bem como sua cristalinidade e 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. Primeiro, ele diminui a tensão interfacial entre as gotas de monômero e a água, promovendo a dispersão das gotas. E 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. Foi observado que 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 8) 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).

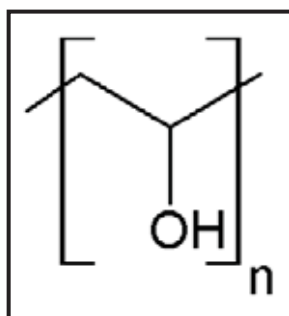


FIGURA 8 - Fórmula estrutural do poli(vinil álcool) (PVA).

3.5.1.2. Iniciadores

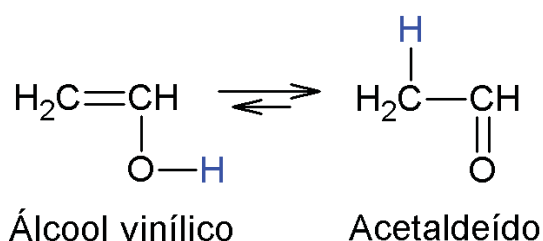
Os iniciadores utilizados em polimerizações em suspensão são solúveis na fase orgânica, já que a polimerização ocorre nas gotas do monômero. Durante a escolha do iniciador é importante considerar a solubilidade no monômero. Usualmente em polimerizações em suspensão são utilizados como iniciadores os peróxidos orgânicos e azo compostos, 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 tautomerismo⁸. Um composto, cuja estrutura aparece um grupo OH ligado a um dos átomos de carbono da ligação C=C, denomina-se enol. Quando se tenta preparar um composto com estrutura enólica, obtém-se, quase sempre, ao invés dele, um composto com um grupo carbonila (C=O), ou seja, um ceto-composto (MORRISON, R.; BOYD, R., 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, R.; BOYD, R., 1996)

Elas são, geralmente, obtidas a partir de poli(vinil ésteres), tais como, poli(vinil acetato) (PVAc) e poli(vinil pivalato) (PVPi). O meio mais convencional de produzi-las envolve duas etapas: a polimerização do acetato de vinila (VAc) em PVAc e uma posterior etapa de hidrólise alcalina do PVAc, usando uma base forte, para a troca do 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 poliadiacção 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

⁸ Compostos, cujas estruturas diferem uma da outra pela disposição dos átomos, mas que encontram-se em equilíbrio rápida e facilmente atingível, dizem-se tautômeros. O tipo mais frequente 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.

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 a utilizadas no corpo humano, uma série de cuidados devem ser tomados na escolha dos reagentes que, preferencialmente, devem ser não tóxicos e que melhorem a biodegradabilidade no organismo (COPPE/UFRJ; FIRST LINE IND COM S/A, 2006).

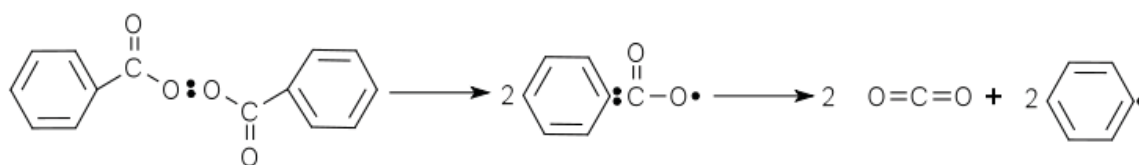
Um exemplo é o uso do VAc ($\text{CH}_3\text{COOCHCH}_2$) puro como monômero. Uma das propriedades desse composto é que ele é biocompatível e isso não ocorre com outros compostos vinílicos. A partir dele, forma-se o PVAc ($[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}]_n$).

Como iniciador, usa-se o BPO ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$) 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 hidróxi-celulose (COOK *et al.*, 1996; COPPE/UFRJ; FIRST LINE IND COM S/A, 2006). O PVA ($[\text{CH}_2\text{CHOH}]_n$) 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.

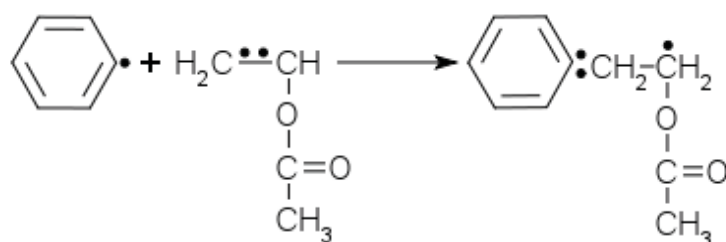
O solvente usado juntamente com o monômero não deve interagir com a água. Vários compostos orgânicos podem ser usados nesse caso, porém o álcool terc-butílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) tem baixa interação com a água e é miscível no VAc, no PVAc e no BPO, sendo perfeitamente indicado para esse 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.



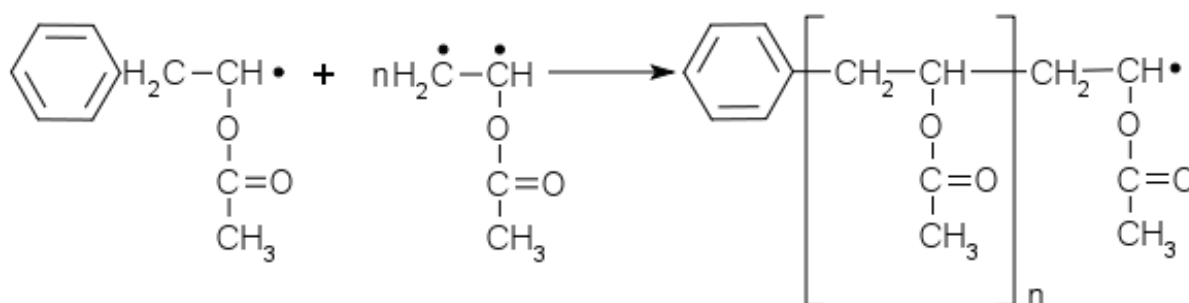
ESQUEMA 2 - Formação dos radicais livres benzoílas a partir do peróxido de benzoíla (BPO).

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



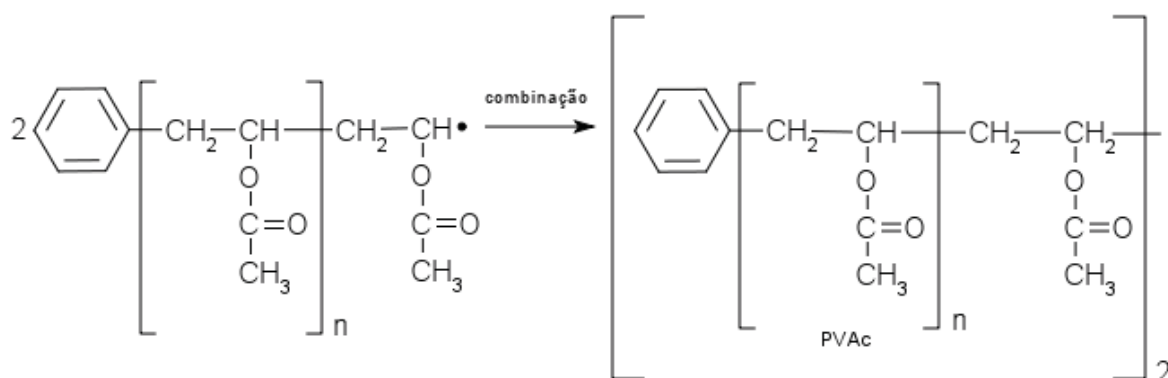
ESQUEMA 3 - Iniciação da cadeia polimérica na formação do poli(vinil acetato) (PVAc).

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.



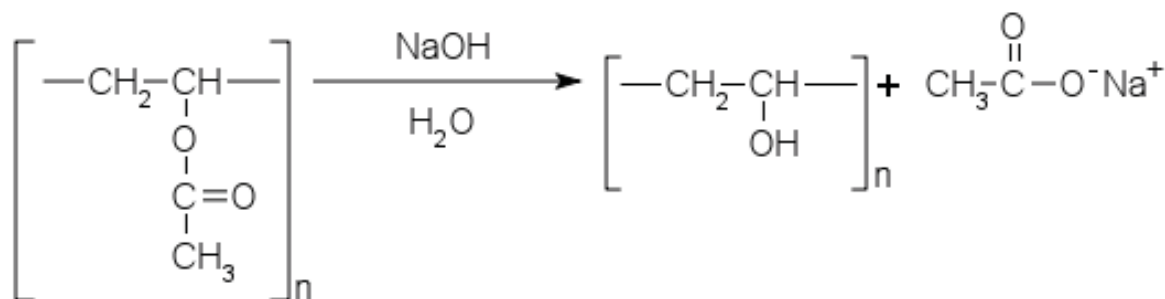
ESQUEMA 4 - Propagação da cadeia polimérica na formação do poli(vinil acetato) (PVAc).

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(vinil acetato) (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(vinil acetato) (PVAc) para obtenção do poli(vinil álcool) (PVA), obtendo como subproduto o acetato de sódio (CH_3COONa).

A maioria das partículas de PVA disponíveis 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 estão sendo desenvolvidas em um convênio com o programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do IBILCE/UNESP e a Braile Biomédica Indústria Comércio e Representações Ltda (empresa localizada na cidade de São José do Rio Preto - SP). Elas possuirão um valor mercadológico competitivo com todas as demais disponíveis no mercado externo.

Dentre as micropartículas disponíveis comercialmente, que são utilizadas mundialmente em tratamentos de embolização, destacam-se:

- a. Bead Block™ Compressible Microspheres for Embolisation (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. Bead Block™ é um dispositivo embólico destinado a provocar embolização de vasos sanguíneos de uma variedade de THVs (por exemplo, mioma uterino) e MAVs (Figura 9);



FIGURA 9 - Bead Block™ (Biocompatibles™) são microesferas comercializadas em cinco tamanhos diferenciados pelas cores das seringas que as contêm.

(BIOCOMPATIBLES ONCOLOGY PRODUCTS DIVISION, 2011)

- b. Contour® PVA Embolization Particles (Boston Scientific™ - Natick, Massachusetts, USA): são partículas de PVA, não esféricas (Figura 10), 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 10. Contour[®] PVA Embolization Particles (Boston[™] Scientific) são partículas de poli(vinil álcool) (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 (feita de pele de porco). Estão disponíveis nos seguintes tamanhos de esferas calibradas: 40-120, 100-300, 300-500, 500-700, 700-900 e 900-1200 μm (Figura 11) (BIOSPHERE MEDICAL, 2004) Essas microesferas foram liberadas pela 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 11 - 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 12). (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);

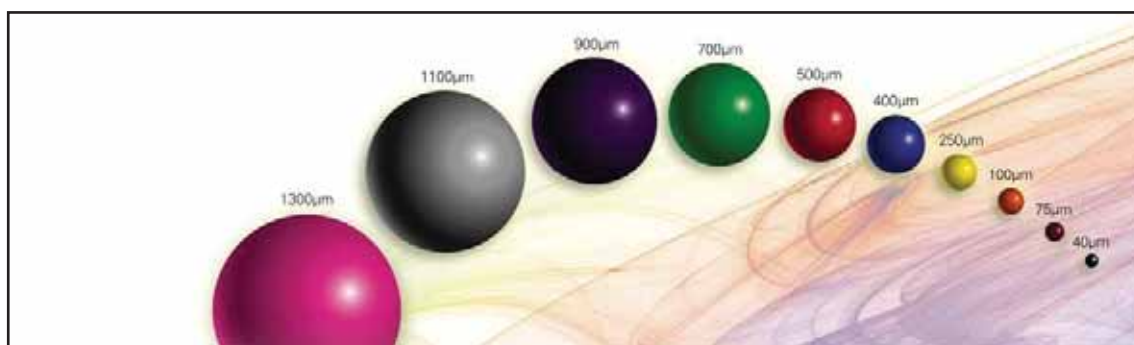


FIGURA 12 - Embozene[®] Microspheres (Celo[®] Nova) são microesferas poliméricas comercializadas em dez tamanhos e cores diferentes.

(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 13). 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.



FIGURA 13 - PVA Embolization Particles (Cook® Medical) são partículas de poli(vinil álcool) (PVA) não esféricas comercializadas em uma grande variedade de tamanhos: de 90 até 2.800 μm .

(COOK MEDICAL, 2010)

Algumas microesferas disponíveis comercialmente para quimioembolização são:

- a. Hepasphere™/Quadrasphere® Microspheres (Biosphere® Medical - South Jordan, Utah, USA): Partículas negativamente carregadas compostas do copolímero poli(vinil álcool-co-acrilato de sódio), com alta capacidade de absorção em meios de concentração de 0,9% de NaCl (pode chegar até 4X o seu tamanho no estado seco) (LEE *et al.*, 2010). São microesferas usadas para tratamento de carcinomas hepatocelulares e que realizam o carregamento e liberação de cloridrato de doxorrubicina. Disponível nos diâmetros de 50-100, 100-150 e 150-200 μm (Figura 14).



FIGURA 14 - Hepasphere™ (Biosphere Medical®) - Partículas usadas para quimioembolização com Cloridrato de Doxorrubicina. São compostas do copolímero poli(vinil álcool-co-acrilato de sódio).

(CHEMOEMBOLI.RU, 2012)

- b. DC Bead® (Biocompatibles™ Oncology Products Division - Farnham, Surrey, UK): São microesferas de poli(vinil álcool) com superfície modificada com grupos sulfônicos (LEWIS *et al.*, 2007), o que torna a partícula com caráter negativamente carregado. Ela interage ionicamente com cloridrato de doxorrubicina e cloridrato de irinotecano para o tratamento de carcinomas hepatocelulares (JORDAN, *et al.*, 2010). Disponível nos diâmetros de 100-300, 300-500, 500-700, 700-900 μm (Figura 15).



FIGURA 15 - Imagens de microesferas para quimioembolização DC Beads® (Biocompatibles™) preparadas com Doxorrubicina (vermelhas) e Irinotecano (azuis).

(DEVICE TECHNOLOGIES NEW ZELAND, 2012)

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 a 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 (ADVANCED MATERIALS, 2010). As partículas relacionadas acima são vendidas nacionalmente entre R\$ 500,00 e R\$ 1.000,00 o 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.

Essas partículas irão oferecer tratamentos a um número maior de pacientes, com a diminuição do custo do produto aos hospitais e pacientes e a substituição das importações. Além de ampliar o número de tratamentos utilizados, deve-se oferecer um tratamento seguro e eficaz. Com a fabricação das partículas esféricas de PVA para embolização, o Brasil passará

de importador a exportador, diminuindo importações e 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. Cerca de 20% destas mulheres apresentam dores e sangramentos anormais durante a menstruação. A maioria delas depende exclusivamente do SUS para o seu atendimento. Kisilevzky e Elkis (2011) reportam um estudo clínico que comprova a viabilidade e segurança da embolização de miomas uterinos em hospitais públicos e apresenta resultados positivos, tais como:

- 90% de melhora no quadro clínico;
- 95% das pacientes satisfeitas;
- 97,5% de índice de recomendação para o procedimento;
- aumento na qualidade de vida de 40 pontos, antes do tratamento, para 80 pontos depois (numa escala de 100) (KISILEVZKY, ELKIS, 2011; POL, 2010).

A embolização de miomas uterinos é um tratamento relativamente simples, com taxa de sucesso de cerca de 90%. As pacientes submetidas à este tratamento necessitam permanecer menos tempo no hospital, por ser um procedimento minimamente invasivo e obtêm um rápido retorno às atividades normais (KISILEVZKY, ELKIS, 2011).

O carcinoma hepatocelular é o quinto tumor maligno mais comum e o terceiro que mais mata no mundo (SOUSA *et al.*, 2011). Pode ser dividido em dois tipos: primário (originário no próprio fígado) ou secundário (que é resultado de metástases, chegando ao órgão). Dependendo do estágio em que for diagnosticado, pode ser curado através de ressecção cirúrgica. Embora a taxa de sobrevida em 5 anos seja de 50%, o índice de reincidência do tumor é alto, chegando a 80% no quinto ano. Por outro lado, para indivíduos cujo tratamento não é a ressecção, ainda não existe uma terapia padrão estabelecida, sendo a quimioembolização transarterial um dos procedimentos indicados (KATAMURA *et al.*, 2009; YOO *et al.*, 2010; YEH *et al.*, 2011).

O projeto denominado Angiomóvel (Unidade de Radiologia Intervencionista Móvel) teve como objetivo visitar 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 e Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE) do Ministério da Saúde, para a inclusão da embolização uterina entre os procedimentos médicos cobertos pelo SUS (POL, 2010). Porém, a embolização uterina e a quimioembolização de carcinomas hepatocelulares ainda não são rotineiramente oferecidas em hospitais públicos no Brasil devido à falta de estrutura tecnológica, de equipamentos, de materiais e de equipes médicas especializadas. Toda a estrutura para realização desses procedimentos ainda tem um custo muito alto, dificultando o acesso de mulheres de baixa renda a essa tecnologia. (KISILEVZKY, MARTINS, 2003).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

O presente estudo é parte inicial do desenvolvimento de microesferas de PVA para utilização em embolização e quimioembolização.

4.2. Objetivos Específicos

- Síntese de partículas de PVA com morfologia esférica pelo método de polimerização em suspensão seguido de hidrólise alcalina;
 - Obtenção de amostras utilizando diferentes concentrações de NaOH no processo de saponificação;
 - Caracterização físico-química para determinação do grau de cristalinidade das partículas por meio de técnicas de estado sólido.
-

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Materiais

Os reagentes químicos utilizados nas sínteses das microesferas de PVA foram utilizados sem purificação prévia. O PVA (99,0% de pureza, peso molecular de 78,000 Da e grau de hidrólise de 85%), o BPO (99,0% de pureza) e o VAc foram adquiridos da Vetec Química Fina (Duque de Caxias, Brasil). A solução de NaOH (50% em água) (99,0% de pureza) foi adquirida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O álcool terc-butílico (99,0% de pureza) foi adquirido da MERCK (Darmstadt, Alemanha). Água com qualidade Mili-Q (obtida de um sistema de purificação com resistividade de 18,2 MΩcm, Máxima USF ELGA, High Wycombe, Reino Unido) foi utilizada como meio reacional.

5.2. Síntese das microesferas de PVA/PVAc

As microesferas de PVA/PVAc foram sintetizadas a partir de procedimentos modificados da literatura (LEE *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008). Assim como em uma reação típica de polimerização em suspensão, as sínteses de partículas com morfologia esférica ocorreram utilizando-se os seguintes componentes reacionais em quantidades abaixo relacionadas:

- 100 mL de água destilada (meio de suspensão reacional);
- 0,07 g de PVA (agente de suspensão que não permite a aglutinação das gotas de monômero no meio de reacional);
- 25 mL de VAc (monômero do polímero precursor, PVAc);
- 25 mL de álcool terc-butílico (solvente orgânico insolúvel em água adicionado juntamente com o monômero);
- 1 g de BPO (inicia a reação através da emissão de radicais livres);
- 100 mL de solução de NaOH (base forte usada para a hidrólise alcalina das microesferas de PVAc).

O PVA foi dissolvido em água sob atmosfera de nitrogênio e com agitação mecânica constante em um reator encamisado com capacidade de 1 L, conectado à um condensador. Em

seguida, a solução composta do monômero, solvente orgânico e iniciador foi adicionada (VAc + álcool + BPO) no meio de suspensão com temperatura fixada em 60 °C. O sistema foi mantido sob condições isotérmicas com uma velocidade de agitação de 300 rpm. As reações foram interrompidas após 5 horas e as partículas foram filtradas, lavadas com água destilada e, em seguida, foram submetidas ao procedimento de saponificação.

Para a reação de saponificação, a montagem do aparato exigiu um balão volumétrico equipado com um condensador de refluxo e um funil de gotejamento. A solução aquosa (100 mL) com as microesferas de PVAc, já lavadas e filtradas, foi mantida sob agitação lenta e temperatura constante de 35 °C. Estabelecidas estas condições, a solução alcalina foi lentamente gotejada e a reação de hidrólise alcalina seguiu com as condições constantes por 6 horas. Foram analisadas diferentes condições de saponificação para a obtenção das partículas. A variação se deu na concentração da solução de NaOH, conforme apresentado na Tabela 1.

Após a reação de saponificação, as partículas foram novamente lavadas com água destilada fria, onde foram mantidas por aproximadamente 12 horas em descanso para a decantação das microesferas de PVA/PVAc. Em seguida, as partículas foram congeladas para liofilização (Liotop – Liobrás, São Carlos, Brasil) e, no estado seco, separadas granulometricamente, com a utilização de peneiras de separação de diferentes tamanhos e caracterizadas por DRX, ^{13}C CP/MAS RMN, DSC, MEV e Potencial Zeta.

TABELA 1 - Condições de sínteses: saponificação e velocidade de agitação das microesferas de PVA.

Amostra	Concentração de NaOH (M)	Agitação (rpm)
1	25	300
2	20	300
3	16	300
4	12	300
5	8	300
6	4	300

5.3. Caracterização das microesferas de PVA/PVAc

Para comparar os resultados das amostras obtidas com as amostras existentes no mercado, foram adquiridas amostras de partículas de PVA comerciais, uma da Boston Scientific (Contour PVA Embolization Particles) e outra da Cook Medical (PVA Foam Embolization Particles). As partículas de PVA/PVAc sintetizadas, assim como as partículas comerciais adquiridas, foram caracterizadas por Difração de Raios-X (DRX), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C - *Cross Polarization / Magic Angle Spinning* (^{13}C -RMN CP/MAS) e Potencial Zeta.

5.3.1. Difração de Raios-X

A cristalinidade das amostras foi determinada pela técnica de DRX. Os padrões de DRX das partículas sintetizadas foram coletados utilizando um difratômetro Rigaku RotaFlex RU200B (Tóquio, Japão) em uma fonte de ânodo rotativo usando uma placa plana na geometria de Bragg-Brentano, operando com radiação de $\text{Cu-K}\alpha$ (comprimento de onda de 1,5418 Å) à 50 kV e 100 mA e equipado de um monocromador de grafite. Os padrões de difração de pó foram coletados na faixa de $2\theta = 5\text{-}80^\circ$ com scan de $0,02^\circ$ e uma faixa de 10s/step.

5.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura

O grau de cristalinidade das partículas de PVA foi calculado a partir dos dados de DSC e sua correlação com as concentrações alcalinas utilizadas nas sínteses. Os valores foram obtidos através do cálculo de ΔH de cada amostra, que é representado pela área do pico de *melting* nas curvas de DSC, utilizando o equipamento DSC 404C controlado por TASC 424/3A. O equipamento operou na faixa de temperatura de 25 a 300 °C, com panelinhas de platina. O equipamento foi calibrado contra um padrão de índio (temperatura de *melting* de 158,5 °C). Foi aplicado um aquecimento constante de 10 °C/min e um fluxo de 0,50 cm³/min de nitrogênio.

Os graus de cristalinidade das partículas de PVA, calculados a partir dos dados de DSC, foram obtidos com a seguinte correlação:

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

Onde ΔH é a variação no calor de fusão e ΔH^0 é a variação do calor de fusão do PVA 100% cristalino (que pode ser obtido diretamente das curvas de DSC e é usualmente considerada como sendo 150 J/g) (RICCIARDI *et al.*, 2004a; HASSAN; PEPPAS, 2000; ZHANG; ZHANG; WANG, 2009; MANDAL; PANGARKAR, 2002).

5.3.3. Distribuição de Tamanhos e Microscopia Eletrônica de Varredura

A distribuição de tamanho das partículas foi obtida através da separação granulométrica das microesferas liofilizadas, utilizando peneiras de separação nas faixas de tamanhos de 1180-1000, 1000-850, 850-710, 710-500, 500-300, 300-106 e <106 μm . As médias com seus respectivos desvios foram plotados no software OriginLab versão 8.0.

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 das análises, um revestimento fino de ouro foi depositado sobre as amostras.

5.3.4. Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de RMN CP/MAS de carbono 13 (^{13}C -RMN CP/MAS) é uma ferramenta poderosa para estudar a miscibilidade e a estrutura de fase de combinações poliméricas para a detecção de interações intermoleculares específicas (WU; MCGINITY, 2003; LUBACH *et al.*, 2004; CHEUNG *et al.*, 2000). No presente estudo os dados da análise de ^{13}C -RMN CP/MAS foram utilizados para fornecer informações detalhadas das diferenças estruturais entre as amostras sintetizadas e a amostra comercial. As medidas de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Varian Inova (Palo Alto, EUA), operando à 400 e 100,5 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Uma sonda de 5 mm (modelo Jackobsen) foi utilizada na medida. O