

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Fármacos e Medicamentos
Campus de Araraquara - SP

**Obtenção de lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo
cetorolaco de trometamina.**

Juliana Aparecida Galli

Araraquara-SP

2011

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Fármacos e Medicamentos
Campus de Araraquara - SP

**Obtenção de lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo
cetorolaco de trometamina.**

Graduanda: Juliana Aparecida Galli

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC - apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do grau acadêmico de farmacêutico-bioquímico.

ARARAQUARA-SP

2011

AGRADECIMENTOS:

Um agradecimento mais que especial aos meus pais. O orgulho que vocês demonstram a todos por ter a mim como filha, tenham certeza que é o mesmo que demonstro por ter vocês como pais. Vocês são meu exemplo, meu alicerce, meu porto-seguro, hoje e sempre. Obrigada por tudo que vocês fizeram por mim. Sem vocês não conseguiria ter chegado até aqui, nem seria a pessoa que eu sou. Amo vocês.

Antes do agradecimento, um pedido de desculpas aos meus amigos. Aqueles de longa data. Pela ausência nos aniversários, nos churrascos, nas conversas, nas crises, nas alegrias e nas lágrimas. Obrigada por não desistirem de mim.

Ao meu amigo Guilherme, Guismo. O melhor. Obrigada por nunca desistir da nossa amizade. Por torcer pela minha felicidade, mesmo que isso às vezes me levasse para mais longe de você. Obrigada por querer me ver voando alto. Obrigada pelo carinho, pelas conversas, pelas risadas, e com certeza obrigada, pelas broncas. As suas são sempre as melhores.

“Amigo é aquele que sabe tudo a seu respeito e, mesmo assim, ainda gosta de você.” Kim Hubbard

Aos meus amigos MÔ, Joice e Bio, por fazerem parte da minha vida há tanto tempo. A paciência de vocês é com certeza uma virtude. Vocês são parte importante da minha história. Sou muito grata por tudo que passei ao lado de vocês.

Ao Dodo, Du e Daniel, meus companheiros de aventuras há tanto anos. Meus bons amigos.

Agradeço a Paulinha, Paula Paié, Pri, Tomás. Nem a distância, nem o tempo diminui o carinho, respeito e principalmente admiração que eu tenho por vocês. Vocês me ajudaram a construir a pessoa que sou hoje e acreditem em mim, serei eternamente grata.

“Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos”. Elmer G. Letterman

A Rosa, que foi presença constante na minha vida nesse último ano. Obrigada por ter me ensinado tanto, por ter estado ao meu lado até o fim! Com seu apoio e amizade foi muito mais fácil enfrentar todos os desafios.

Um agradecimento muito especial a República Krakatoa e a todas as mulheres maravilhosas que passaram por lá e fizeram parte da minha vida. Aprendi TANTO com cada uma de vocês. Tenho um orgulho imenso de poder dizer que fiz parte dessa história. Vocês são minhas amigas, minhas irmãs. Pra sempre. Sem vocês não teria conseguido.

“A gente não faz amigos, reconhece-os.” Vinícius de Moraes

As Repúblicas Várzea, Caverna, QT, Lolitas e SóCapim por terem me apresentando pessoas e amigos maravilhosos e por terem me proporcionado tantos momentos memoráveis.

Ao meu irmão, meu Pé de Jabuticaba, e minha querida cunhada Carol, meu muito obrigada, pela dedicação, paciência e incentivo.

Ao Gui, que entrou na minha vida tão inesperadamente. Você certamente fez os últimos meses em Araraquara serem inesquecíveis. Obrigada por todo apoio, palavras, sorrisos e carinho.

Aos Professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos da UNESP, em especial as Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, Maria Palmira Daflon Gremião, Maria Virgínia Scarpa, Leila A. Chiavacci, Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista por ter sanado minhas dúvidas durante o curso e acima de tudo pela amizade e entendimento.

Aos amigos Velma, Kelly, Cris Franzini, Gustavo, Charlene, Flávia, Mariana Barbi, Gabi, Hilris, obrigada pelo conhecimento compartilhado, pelas palavras, pelas viagens e pelos momentos ótimos que passei ao lado de vocês. Vocês fizeram todo trabalho parecer muito mais fácil e divertido.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira por ter me conduzido na ciência com toda sua sabedoria, confiança, incentivo e paciência. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos, pela dedicação desprendida. Por ter confiado na minha capacidade de desenvolver esse trabalho. Serei eternamente grata pelas oportunidades que o senhor me proporcionou. MUITO OBRIGADA!

A Cris Bruno, pela dedicação, pelos conselhos, pelos ensinamentos (e foram tantos!), pelo carinho. Por TUDO. Você foi fundamental na minha formação. Certamente me ajudou a ser uma profissional e uma pessoa melhor. Meu mais sincero OBRIGADA!

“Ser mestre não é apenas lecionar. Ensinar não é apenas transmitir o conhecimento. Ser mestre é ser instrutor e amigo, guia e companheiro. Ser mestre é

ser exemplo. Exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e, sobretudo, de amor.”

A FAPESP pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	35
2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS	35
2.2.1. ÍNDICE DE REFRAÇÃO	35
2.2.2. ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	36
2.3. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO CETOROLACO DE TROMETAMINA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO UV-Vis	36
2.3.1. COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO (λ_{MAX}) DO CETOROLACO DE TROMETAMINA	37
2.3.1.1 EM TAMPÃO TRIS-HCl	37
2.3.1.2 EM METANOL	37
2.3.2. CURVA PADRÃO DO CETOROLACO DE TROMETAMINA	37
2.4. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	38
2.5. CONTROLE DA VARIAÇÃO DE PH	39
2.6. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE	39
2.7. ESTUDO DE ESTABILIDADE	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1. ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	42
3.2. COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO EM METANOL	43
3.3. COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl	44

3.4. CURVA PADRÃO DO CETOROLACO DE TROMETAMINA	45
3.4.1. EM TAMPÃO TRIS-HCl	45
3.4.2. EM METANOL.....	46
3.5. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	47
3.6. CONTROLE DA VARIAÇÃO DE PH	55
3.7. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE	56
3.8. ESTUDO DE ESTABILIDADE	57
3.8.1. ESTABILIDADE DA ESTRUTURA FÍSICA DOS LIPOSSOMAS	57
3.8.1.1. ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	57
3.8.1.2. DIÂMETRO MÉDIO DOS LIPOSSOMAS	58
3.8.2. ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE DO CETOROLACO DE TROMETAMINA	66
<u>4. CONCLUSÕES</u>	69
<u>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	71

RESUMO

As patologias do segmento anterior e posterior dos olhos têm sido responsáveis pela perda de visão de grande número de pacientes. A liberação intra-ocular de fármacos é um aspecto extremamente importante nesses processos, uma vez que o maior problema na terapêutica com oftálmicos é atingir e manter concentrações eficazes de fármaco no local de ação por um período de tempo prolongado e com diminuição significativa da toxicidade. O ceterolaco de trometamina é um antiinflamatório não-esteróide, utilizado no tratamento de conjuntivites sazonais e na prevenção de inflamações decorrentes de cirurgias de catarata com ou sem implantação de lentes intraoculares. A grande vantagem na utilização dos antiinflamatórios não-esteroidais está em evitar os efeitos adversos severos que a administração frequente de antiinflamatórios esteróides induz. Sistemas transportadores de fármacos como os lipossomas têm permitido novas formas de tratamento, pois quando administrados por via tópica, subconjuntival ou diretamente no vítreo, permitem a redução da freqüência de administração, maior eficiência e comodidade para o paciente. Além disso, minimiza os efeitos colaterais de fármacos antiinflamatórios não esteróides e previne o aparecimento de doenças secundárias, como ocorre quando da utilização de corticóides no tratamento de doenças do globo ocular. Este trabalho tem como objetivo principal o estudo da encapsulação do ceterolaco de trometamina em lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina de soja hidrogenada para administração intra-ocular do fármaco, visando o controle da liberação, aumento da biocompatibilidade e o estudo dos parâmetros de encapsulação. Para realização desse trabalho foram preparados lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, contendo diferentes concentrações de ceterolaco de trometamina, veiculado em tampão Tris-HCl 10mM

pH 7,4. A eficiência de encapsulação de todas as formulações foi calculada com o objetivo de se estabelecer os melhores parâmetros tecnológicos e selecionar as mais viáveis para a sequência do estudo. O diâmetro médio dos lipossomas foi monitorado em função do tempo por espalhamento dinâmico de luz, para avaliar a estabilidade física das estruturas. Foi estudado o possível efeito protetor dos lipossomas sobre a estabilidade fotoquímica do cetorolaco de trometamina. Além disso, análises de espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS) mostram claramente que os lipossomas contendo cetorolaco de trometamina possuem a bicamada lipídica mais estruturada em relação aos lipossomas vazios.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto estrutural dos lipossomas.....	18
Figura 2. Métodos de obtenção de lipossomas.....	23
Figura 3. Fórmula estrutural do cetorolaco de trometamina.....	28
Figura 4. Avaliação estrutural dos lipossomas vazios por SAXS.....	42
Figura 5. Avaliação estrutural dos lipossomas contendo cetorolaco de trometamina por SAXS.....	42
Figura 6. Espectro de varredura do cetorolaco de trometamina em metanol apresentando λ_{\max} 320nm.....	44
Figura 7. Espectro de varredura do cetorolaco de trometamina em Tris-HCl 10 mM pH 7,4 apresentando λ_{\max} 323nm.....	45
Figura 8. Curva padrão do cetorolaco de trometamina em Tris-HCl em 323 nm.....	46
Figura 9. Curva padrão do cetorolaco de trometamina em metanol em 320 nm.....	47
Figura 10. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 6,64mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.....	48
Figura 11. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 13,28 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.....	49
Figura 12. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 19,92 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.	50
Figura 13. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 26,57 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.	50

Figura 14. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 33,21 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.	51
Figura 15. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 39,85 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.	52
Figura 16. Correlação entre a concentração de fármaco adicionada e a concentração recuperada em lipossomas de 20mM de FSH e diferentes concentrações de cetorolaco de trometamina.	54
Figura 17. Relação entre eficiência de encapsulação (%) e Ket adicionado (mg).....	55
Figura 18. Monitoramento da absorbância derivada do espalhamento de luz dos lipossomas contendo 20mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e 39,85 mM de cetorolaco de trometamina.....	56
Figura 19. Diâmetro médio dos lipossomas em função do tempo.....	65
Figura 20. Diâmetro dos lipossomas nas diferenças concentrações do Ket no tempo zero.....	65
Figura 21. Leituras em espectrofotômetro na região UV-Vis para preparações do cetorolaco de trometamina em lipossomas (320 nm) e solução de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (323 nm) na ausência de luz.....	67
Figura 22. Leituras em espectrofotômetro na região UV-Vis para preparações do cetorolaco de trometamina em lipossomas (320 nm) e solução de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (323 nm) na presença de luz.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eficiência de encapsulação de lipossomas contendo 20 mM de FSH e diferentes concentrações de cetorolaco de trometamina.....	53
Tabela 2. Valores dos índices de refração das formulações lipossomais	58
Tabela 3. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 0h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.....	59
Tabela 4. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 18h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.....	60
Tabela 5. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 25h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.....	61
Tabela 6. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 45h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.....	62
Tabela 7. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 70h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.....	63
Tabela 8. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 169h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.....	64

ABREVIATURAS

λ_{max} : Comprimento de onda de máxima absorção

ABS: Absorbância

AINE: Antiinflamatório Não Esteróide

COX: Ciclooxigenase

FSH: Fosfatidilcolina de Soja Hidrogenada

KET: cetorolaco de trometamina

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LUV: Vesícula Unilamelar Grande

MLV: Vesícula Multilamelar Grande

PGE₂: Prostaglandina E₂

SAXS: Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

SUV: Vesícula Unilamelar Pequena

UV-VIS: ultra-violeta e visível

1. INTRODUÇÃO

A administração de fármacos através de formas farmacêuticas convencionais em diversos tipos de terapias tem sido limitada principalmente pela impossibilidade do aumento da dosagem, a qual geralmente leva à exaltação de efeitos colaterais relacionados com a dose administrada. A degradação do agente terapêutico, a baixa solubilidade e, em especial, os efeitos tóxicos decorrentes da utilização em doses elevadas, tornam muitas vezes sua utilização inviável para a obtenção dos efeitos terapêuticos desejados. O estudo de novos sistemas para a liberação de agentes terapêuticos como os antitumorais, antibióticos, enzimas, antiinflamatórios, hormônios, agentes quelantes, vem recebendo especial atenção (OLIVEIRA & SCARPA, 1992; SANTOS & CASTANHO, 2002; OLIVEIRA et al., 2005; FORMARIZ et al., 2006). Nos últimos anos resultados significativos foram obtidos em pesquisas envolvendo o desenvolvimento de sistemas transportadores e suas interações com os fármacos encapsulados. A vantagem desses sistemas é a de mascarar as propriedades físico-químicas dos fármacos encapsulados, prevalecendo as propriedades do sistema transportador, possibilitando a modulação da farmacodinâmica, da biodisponibilidade e a diminuição dos efeitos tóxicos do fármaco, através da modificação da estrutura ou da composição do sistema transportador (OLIVEIRA et al., 1992; RIBEIRO-DE-ARAÚJO et al., 2003; FORMARIZ et al., 2006). WEN et al.(2006) demonstrou que o Arbutin, agente clareador da pele, aplicado sob a forma lipossomal foi mais eficiente do que a aplicação do fármaco não encapsulado. De acordo com Cereda et al. (2007), a utilização de anestésicos encapsulados em lipossomas prolongou o tempo de analgesia, surgindo novas perspectivas para a veiculação desta classe de fármacos.

Atualmente, os transportadores disponíveis são os sistemas transdérmicos de

liberação, implantes subcutâneos, sistemas de liberação ocular, bomba de infusão intravenosa, anticorpos monoclonais utilizados como transportadores específicos para fármacos, enzimas e fármacos radioativos para diagnóstico e tratamento de doenças e os lipossomas.

Em oftalmologia, os lipossomas, as nanopartículas e os implantes oculares têm permitido novas formas de tratamento (OGURA, 2001; OLIVEIRA et al., 2004, 2005; CARDILLO et al. 2006). Estes dispositivos quando administrados por via tópica ou diretamente no vítreo, permitem a redução da frequência de administração, maior eficiência e comodidade para o paciente (LE BOURLAIS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2004, 2005; CARDILLO et al., 2006).

A inclusão de fármacos já comercializados a sistemas transportadores é uma boa estratégia para prolongar a validade de proteção por patente, além de oferecer um ganho de tempo na fase de desenvolvimento do produto, uma vez que o fármaco já se encontra caracterizado do ponto de vista farmacológico. Nessa linha, os lipossomas ocupam uma posição de destaque (FRÉZARD & SCHETTINI, 2005).

A literatura mostra que os antiinflamatórios não esteróides (AINE) são eficazes no tratamento de doenças inflamatórias oculares. Com o conhecimento da patogênese e da participação das prostaglandinas na região ocular, a utilização dos AINE's na área de oftalmologia tende a se expandir nos próximos anos (KIM et al., 2010).

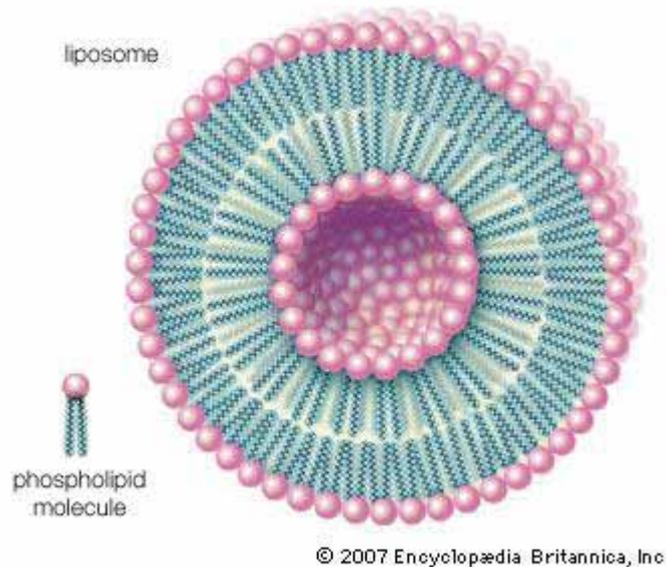
Lipossomas

Os lipossomas foram descritos inicialmente por Alec Banghan, na década de 1965. Semelhantes estruturalmente às membranas biológicas, os lipossomas são vesículas compostas por bicamadas lipídicas circundadas por fases aquosas e

contendo um compartimento aquoso central. A bicamada lipídica é capaz de regular a passagem de moléculas nos dois sentidos, sendo que a saída de substâncias de seu interior para o meio externo caracteriza o sistema de liberação controlada. Sua estrutura permite a dissolução de substâncias lipofílicas (nas bicamadas lipídicas) ou substâncias hidrofílicas (na fase aquosa compartimentalizada), bem como o controle da velocidade de liberação destas substâncias (OLIVEIRA & SCARPA, 1992; MOSQUEIRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004, 2005; WEN et al., 2006; SAHOO et al., 2008; KHAN et al., 2008). Além disso, podem proporcionar redução da toxicidade inerente à substância ativa, tornando os fármacos já existentes mais eficientes quanto aos efeitos terapêuticos e muito mais seletivos em relação ao local de ação, reduzindo desta forma os efeitos adversos e colaterais (OLIVEIRA et al., 1997; WEN et al., 2006). Os lipossomas possuem dimensões variadas da ordem de nm ou poucos μm , onde as cadeias hidrofóbicas dos tensoativos estruturais estão auto-organizadas entre si e as cabeças polares voltadas para o interior e para o exterior das estruturas mantendo contato com a fase aquosa (OLIVEIRA et al., 1992; SCARPA & OLIVEIRA, 1998; MOSQUEIRA et al., 2000; LIMA & OLIVEIRA, 2002).

Figura 1. Aspecto estrutural dos lipossomas

(<http://noopurmandrek.wordpress.com/> acesso em 10/05/2011)



Estas estruturas podem ser preparadas por uma grande variedade de métodos, dando origem às vesículas multilamelares grandes (MLV); vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) (PUISIEUX, 1983).

Estruturalmente os lipossomas podem ser constituídos por fosfolípeos naturais: fosfatidilcolina, esfingomielina, cardiolipina, esteróides (colesterol, ergosterol), fosfolípidios com cargas positivas e negativas, e os sintéticos. A utilização da fosfatidilcolina de soja hidrogenada ou colesterol aumenta a estabilidade das membranas lipídicas minimizando processos oxidativos (CHORILLI et al., 2007).

São obtidos pela dispersão da fase lipídica na solução de fármacos sob agitação vigorosa. Quando ocorre a dispersão, as moléculas de lipídio auto-associam-se para formar a bicamada lipídica. As extremidades lipofílicas das moléculas de lipídios se intercalam para formar a parte interna da membrana, e as extremidades hidrofílicas alinham-se nas superfícies externas. Por fim, a membrana dobra-se encapsulando a solução de fármaco quando então o lipossoma é formado

(OLIVEIRA & SCARPA, 1992; LASIC, 1993; FORMARIZ et al., 2006).

Do ponto de vista químico, os fosfolipídios estruturais dos lipossomas podem sofrer degradação através de hidrólise enzimática ou de oxidação (LASIC, 1993). A oxidação dos fosfolipídios acontece preferencialmente com os fosfolipídios poliinsaturados, como é o caso da fosfatidilcolina. Essa oxidação ocorre principalmente pela formação de radicais livres, iniciada pela incidência de luz na presença de oxigênio. Assim, a presença de oxigênio, luz ou temperatura elevada são fatores que podem intensificar o processo de decomposição.

Bochot e colaboradores (2002) relataram a utilização de oligonucleotídeos e oligonucleotídeos anti-senso, encapsulados em lipossomas estericamente estabilizados para o tratamento de infecções que afetam o segmento posterior do globo ocular. Foram comparados os efeitos da administração intravitreal de solução simples de oligonucleotídeos e de oligonucleotídeos encapsulados em lipossomas estericamente estabilizados. Os oligonucleotídeos envoltos em lipossomas estericamente estabilizados foram protegidos da degradação enzimática, e permaneceram em concentração e tempo maiores quando comparado aos oligonucleotídeos em solução. Este trabalho mostrou que a liberação dos oligonucleotídeos pode ser modulada através da inserção destes neste tipo de lipossoma; os resultados foram observados *in vitro* e *in vivo*.

Fattal e colaboradores (2004; 2006) mostraram que a utilização de lipossomas dispersos em gel termossensível Pluronic®, para o endereçamento intravitreal de oligonucleotídeos anti-senso, previne a degradação dos lipossomas e conseqüentemente dos oligonucleotídeos, como também prolonga a ação terapêutica.

A facilidade de obtenção, a versatilidade quanto à encapsulação de fármacos,

e alta biocompatibilidade fazem dos lipossomas uma alternativa vantajosa para liberação controlada nos tecidos oculares. Entretanto, sua instabilidade física ainda limita seu uso generalizado (NANJAWADE et al., 2007, ARAÚJO et al., 2009).

Preparação de lipossomas

Poucos procedimentos experimentais são capazes de encapsular grandes quantidades de fármacos solúveis em água. São mais comumente utilizadas as técnicas de evaporação de fase-reversa (SZOKA e PAPAHAADJOPOULOS, 1978), injeção de solvente (DEAMER e BANGHAM, 1976; SCHIEREN et al., 1978), liofilização (PICK, 1981), extrusão (HAMILTON et al., 1980), sonicação (HAUNG, 1969), métodos mais recentes como a técnica de evaporação de fase reversa com fluido supercrítico (IMURA et al., 2002) e filtração (KATAYAMA et al., 2002) têm sido estudados. Em geral, todos os métodos de preparação envolvem três ou quatro estágios básicos: solubilização dos lipídios em solvente orgânico, remoção do solvente orgânico da solução de lipídios, dispersão dos lipídios em meio aquoso e purificação dos lipossomas (NEW, 1990).

Estes métodos podem levar a obtenção de vesículas unilamelares pequenas ou grandes (SUVs e LUVs, respectivamente) ou multilamelares (MLV) (Figura 2). MLVs são formados pela hidratação do filme lipídico seguida por agitação vigorosa em vórtex, enquanto que os LUVs em sua maioria são produzidos por evaporação de fase reversa. SUVs podem ser preparados submetendo as suspensões de MLVs ou LUVs a sonicação, procedimento no qual a preparação de MLV é submetida à radiação de ondas de ultra-som, as quais quebram as vesículas multilamelares em vesículas de diâmetro reduzido assegurando a obtenção de uma população homogênea de vesículas (VEMURI e RHODES, 1995; MEISNER e MEZEI, 1995; BOCHOT et al., 2000).

A grande variedade de métodos usados na obtenção desses agregados tem permitido dimensionar lipossomas de diferentes tipos, diâmetro e estabilidade, o que tem gerado diferentes possibilidades de aplicações como sistemas transportadores de fármacos (OLIVEIRA et al.,1997). As MLVs se formam ao aplicar-se uma força quando um excesso de volume de solução aquosa é adicionada aos lipídios previamente secos por meio de evaporação em balão de fundo redondo sob vácuo. Bangham (1977) demonstrou que a eficiência de encapsulação pode ser aumentada pelo tempo de hidratação do filme seco. Assim, o método de preparação, o tempo de hidratação e a espessura do filme lipídico podem influenciar as características das MLV que são preparadas a partir de lipídios com composição similares (VEMURI e RHODES, 1995). Vesículas unilamelares grandes (LUVs) consistem de lipossomas com diâmetros até 1000 nm (NEW, 1990). O tamanho de LUV é um tópico muito debatido, pois segundo Vemuri e Rhodes (1995) o termo “large” refere-se a estruturas vesiculares grandes, e maiores que 100 nm. São capazes de encapsular grandes volumes de soluções em sua compartimento aquoso central e possuem alta eficiência de encapsulação quando comparadas as MLV. Outras vantagens de LUVs resultam da maior quantidade de fármaco encapsulado numa menor quantidade de lipídio utilizada e reprodutibilidade da taxa de liberação do fármaco (TIRREL et al., 1976). LUVs podem ser produzidos através do método de evaporação de fase-reversa (VEMURI e RHODES, 1995).

Caracterização de lipossomas

A caracterização detalhada da estrutura dos lipossomas, incluindo distribuição de tamanho, número de bicamadas e volume de encapsulação é importante, uma vez que ela fornece informações importantes sobre diferenças na estrutura causadas por mudanças no método de preparação e na composição lipídica. Estas

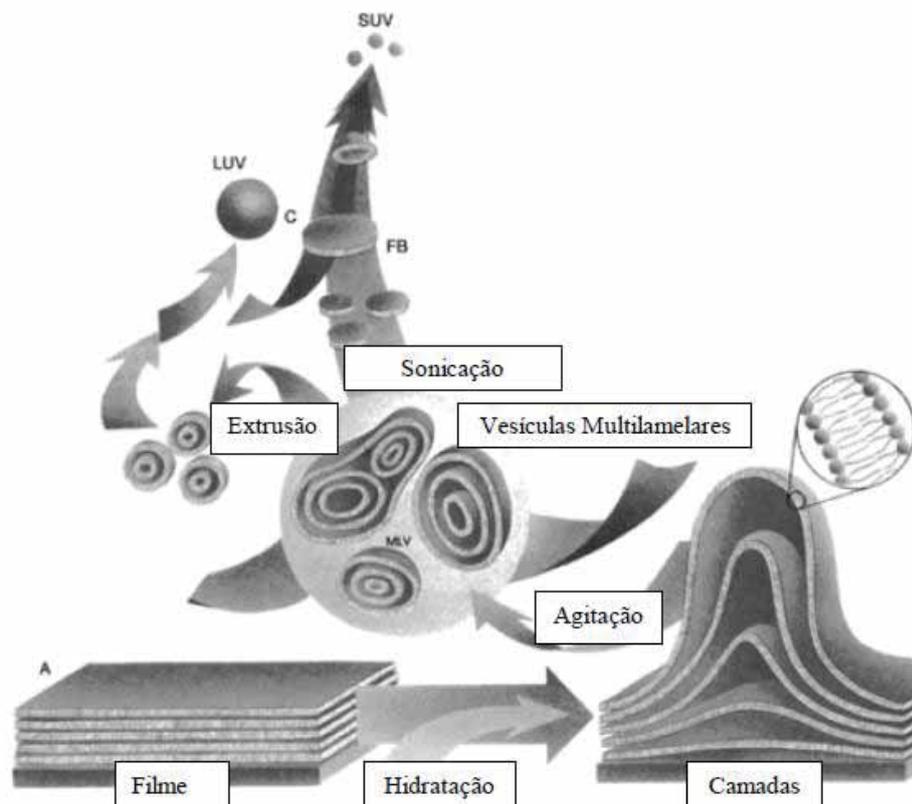
diferenças na estrutura afetam o comportamento das vesículas *in vitro*, assim como *in vivo*. Assim, uma definição apropriada da estrutura é essencial para obtenção de resultados reprodutíveis, um pré-requisito fundamental para o emprego satisfatório dos lipossomas na terapêutica (JOUSMA et al., 1987; VIDAL, 1993; LIMA, 1998).

Dentre as características que mais refletem as variações entre os distintos tipos de lipossomas estão àquelas relacionadas a encapsulação de fármacos pelas vesículas. A eficiência de encapsulação pode ser expressa de várias maneiras:

- A porcentagem ou taxa de encapsulação corresponde à proporção de fármaco encapsulada nos lipossomas em relação à quantidade inicialmente encontrada no meio.
- A massa de substância encapsulada por unidade de massa de lipídio corresponde à quantidade de fármaco encapsulado ($\mu\text{g/mol}$ ou em $\mu\text{g/mg}$).
- O volume aquoso encapsulado corresponde ao volume ou à massa de fase aquosa encapsulada por unidade de massa de lipídio ($\mu\text{g/Mol}$).

Várias técnicas podem ser utilizadas para caracterizar preparações de lipossomas, entre as quais: espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*), cromatografia, centrifugação, diálise, eletroforese, ressonância magnética nuclear e a microscopia eletrônica por criofratura (LESIEUR et al., 1991; LIMA, 1998).

Figura 2. Métodos de obtenção de lipossomas (LASIC, 1997)



Lipossomas na liberação ocular de fármacos

Um dos maiores problemas da aplicação ocular tópica é a rápida remoção do fármaco dos tecidos oculares (~90%) devido à drenagem lacrimal. Essa perda representa não só prejuízo para o tratamento como também econômico. A administração sistêmica do fármaco pode ser utilizada no tratamento de patologias do segmento posterior dos olhos, mas, devido à barreira hematorretiniana, há uma grande dificuldade do fármaco circulante no sangue penetrar a retina (CONSTABLE et al., 2005). Com isso, são necessárias altas concentrações de fármaco na circulação sanguínea para se obter um nível terapêutico deste fármaco no segmento posterior dos olhos (COLTHURST et al., 2000).

A administração intravitreal de fármacos é uma das opções viáveis para o tratamento de patologias do segmento posterior do globo ocular, mas também

apresenta inconvenientes tais como o desconforto da administração, principalmente para a terapia de doenças crônicas, as quais exigem administrações repetidas e por tempo prolongado. Devido à estrutura anatômica e à própria fisiologia do olho, a penetração dos fármacos nos tecidos oculares, através da córnea, é muito baixa. Além disso, a remoção nasolacrimal faz com que os fármacos sejam removidos do local pela circulação sanguínea (CONSTABLE et al., 2005), podendo causar efeitos adversos semelhantes aos observados quando os fármacos são administrados sistemicamente (COLTHURST et al., 2000).

Por essas razões, diversos estudos visando o desenvolvimento de sistemas capazes de manter a concentração de fármacos no segmento posterior do olho, dentro de níveis terapêuticos, por um período de tempo prolongado têm sido realizados (COLTHURST et al., 2000).

Entre as alternativas terapêuticas com habilidade de prolongar o efeito terapêutico ao tempo em que podem reduzir a toxicidade dos fármacos, os lipossomas ocupam um lugar de destaque. Através da encapsulação de fármacos em lipossomas é possível obter maior concentração nos tecidos oculares, prolongamento da atividade terapêutica nos segmentos anterior e posterior do olho e, direcionamento do fármaco para o segmento posterior do olho (BOCHOT et al., 2000; ARAÚJO et al., 2009). O fato das bicamadas lipídicas serem estruturalmente semelhantes às membranas biológicas facilita também, a penetração de fármacos encapsulados nos tecidos biológicos (VEMURI & RHODES, 1995; OLIVEIRA et al., 1997; OLIVEIRA & SCARPA, 1997; SCARPA et al., 1998). Além disso, os lipossomas possuem elevada biocompatibilidade especialmente quando são formados pelos lipídios pertencentes às famílias de lipídios naturais. Essas vesículas são sistemas altamente versáteis, cujo diâmetro, lamelaridade, superfície,

composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (OLIVEIRA et al., 1997; SCARPA & OLIVEIRA, 1997; SILVA-JR et al., 2006). Os lipossomas podem atuar como transportadores de uma grande variedade de moléculas, tais como proteínas, nucleotídeos e até mesmo plasmídios, possuindo grande potencial em oftalmologia (KAUR et al., 2004).

Gupta e colaboradores (2000) demonstraram que a encapsulação de fluconazol em lipossomas aumentou a meia-vida do fármaco na cavidade vítrea, após administração intravítreal do fármaco em coelhos.

Oliveira e colaboradores (2004) mostraram que a administração intravítreal de vancomicina encapsulada em lipossomas para o tratamento de endoftalmite induzida experimentalmente em olhos de coelhos, aumenta o tempo de residência do fármaco e, conseqüentemente, o intervalo de tempo entre as aplicações. Foi também demonstrado que a administração intravítreal de triancinolona veiculada em microesferas biodegradáveis prolongou o tempo de permanência do fármaco e aumentou o seu efeito terapêutico do antiinflamatório (OLIVEIRA et al., 2005). Gillies e colaboradores (2006) relataram a diminuição da extensão do edema macular diabético refratário através da administração intravítreal de triancinolona.

A composição lipídica, a carga superficial, as propriedades físico-químicas do fármaco e a interação entre o fármaco e as vesículas lipídicas influenciam decisivamente na encapsulação dos fármacos em lipossomas (SCHAEFFER & KROHN, 1982; SCARPA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2004, 2005).

Chetoni et al. (2004) mostraram que a biodisponibilidade de uma preparação lipossomal de Aciclovir, contendo fosfolípídeos de carga positiva para uso oftálmico foi maior do que a preparação tópica já comercializada do fármaco.

Lipossomas obtidos a partir de fosfolipídios saturados conferem maior proteção ao fármaco quando na presença de lisozima e esteaseses, enzimas presentes na lágrima, tornando-o mais biodisponível (ARAÚJO et al., 2009).

Costa e Moraes (2003) mostraram que o comportamento da vesícula e sua estabilidade podem ser controlados pelo método de obtenção do sistema lipossomal. Para o fármaco 5-fluorouracil, em administrações tópicas, a evaporação por fase reversa mostrou-se mais adequada.

A utilização de lipossomas tem também se mostrado uma estratégia terapêutica para aumentar a potência farmacoterapêutica e diminuir os efeitos colaterais dos antitumorais (FAVERO & BYDLOWSKI, 2008). Em estudos realizados por Frézard e Schettini (2005), as maiores taxas de encapsulação de antimoniais foram obtidas com lipossomas constituídos de fosfolipídio de alta temperatura de transição de fase. Além disso, aqueles obtidos por evaporação por fase reversa se mostraram menos estáveis do que aqueles obtidos por hidratação do filme lipídico. Estudos mostraram que a utilização da terapia de antimoniais baseada em lipossomas tem reduzido o número de injeções, duração da terapia e efeitos colaterais quando comparada a quimioterapia convencional (FRÉZARD & SCHETTINI, 2005).

Em estudo realizado em coelhos por Hosny (2010), a formulação de ciprofloxacino lipossomal em uma matriz de hidrogel mostrou-se adequada para liberação prolongada do fármaco na região ocular, pois manteve-se estável durante a permanência do sistema na região-alvo. Além disso, o sistema lipossomal aumentou a permeabilidade da córnea ao fármaco e a biodisponibilidade em cinco vezes se comparado a solução aquosa.

Os hidrogéis, lipossomas e carreadores nanoestruturados são pesquisados

para otimizar a permanência do fármaco na região subconjuntival, reduzir os efeitos colaterais sistêmicos e o número de aplicações, aumentando a adesão do paciente ao tratamento (NANJAWADE et al., 2007).

Um estudo mostrou que o nível de dexametasona lipossomal na conjuntiva manteve-se alto após 6 horas de sua administração, mostrando que o sistema pode criar um reservatório, aumentando o tempo da penetração ocular (ARAÚJO et al., 2009).

Segundo Hosny (2009) uma formulação termosensível de hidrogel lipossomal contendo ofloxacino proporcionou a máxima biodisponibilidade ocular em coelhos. Além disso, o sistema garantiu liberação controlada e contínua aumentando a permeabilidade transcorneal ao ofloxacino.

Cetorolaco de Trometamina

Aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1989, o cetorolaco de trometamina é um membro do grupo pirrólico das drogas antiinflamatórias não hormonais (AINE), que inibe a síntese de prostaglandinas e pode ser considerado um analgésico central e periférico (ROOKS et al., 1985).

Possui fórmula química $C_{15}H_{13}NO_3$. $C_4H_{11}NO_3$, peso molecular de 376,41 g/mol com um carbono quiral na posição alfa do grupo propionato (USP 32, 2009). Possui pKa de 3,5 e osmolalidade usual das soluções de 290 mOsmol/kg (USPDI 22, 2002). O nome químico do fármaco é ácido-5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1-carboxílico misturado a 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol; é uma mistura racêmica de –S e [-]S e [+]R de cetorolaco de trometamina, podendo existir em três formas de cristal, todas igualmente solúveis em água.

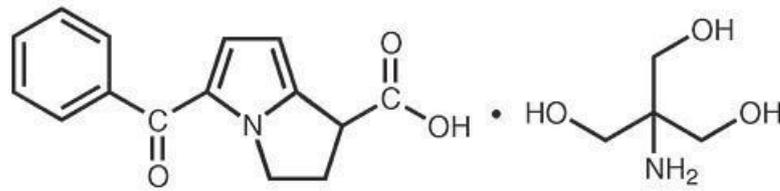


Figura 3. Fórmula Estrutural do ceterolaco de trometamina

Como um inibidor não específico da enzima ciclooxigenase (COX), o ceterolaco de trometamina inibe ambas as formas, reduzindo os níveis que são naturalmente necessários para os processos biológicos e aquelas prostaglandinas induzidas – via COX-2 pela lesão tecidual ou inflamação. É a inibição não específica das enzimas COX que produz efeitos colaterais (ANTHONY e JASINSKI, 2002).

O ceterolaco de trometamina é indicado para controlar processos dolorosos moderados e graves, como é o caso de condições pós-traumáticas ou pós-cirúrgicas, principalmente quando a utilização de analgésicos opióides é indesejável devido a seus efeitos colaterais (ROOKS et al., 1985).

Sua administração dá-se através das vias intramuscular, intravenosa, oral ou ocular, não devendo ser utilizado por mais de cinco dias consecutivos (USP 32, 2009).

O ceterolaco de trometamina é utilizado em oftalmologia para o tratamento de irritações causadas por conjuntivites sazonais, na prevenção de inflamações decorrentes de cirurgias para extração de catarata com ou sem implantação de lentes intraoculares (USP 32, 2009). O USA Food and Drug Administration (FDA) atestou também sua eficácia em conjuntivites alérgicas, dores oculares, e fotofobia (DEMIRCAN et al., 2007). A grande vantagem na utilização das AINE está em evitar os efeitos adversos que a administração freqüente de antiinflamatórios esteróides (corticóides) induz: instabilidade da lágrima, toxicidade epitelial, ceratopatia do

cristalino, força de cicatrização diminuída, atrofia de gordura orbital, ptose, limitações dos movimentos oculares, aumento da pressão intra-ocular e redução do cortisol endógeno (MCGHEE et al., 2002; MALHOTRA & MAJUNDAR, 2005). Em estudo realizado por Taban et al., 2007, pacientes que receberam injeção intravitreal de triancinolona acetonida para o tratamento de diversas doenças, incluindo degeneração macular relacionada à idade (AMD), retinopatia diabética, oclusão vascular e edema macular cistóide (CME), e que tinham história de uveíte, apresentaram risco maior de desenvolver endoftalmite não-infecciosa.

Por atuarem apenas na via da ciclooxigenase, os AINEs não interferem na cicatrização de feridas, como os corticóides, que alteram a síntese do colágeno, sendo este fato de relevante importância quando da utilização dos AINEs nas cirurgias oftalmológicas (MEIRELES-TEIXEIRA et al., 2003).

Wafapoor e McCluskey (2006) propuseram a utilização do ceterolaco por via intravitreal como uma alternativa aos corticóides no tratamento do edema macular. O estudo de caráter retrospectivo incluiu pacientes portadores de edema macular associado ao diagnóstico de glaucoma. Complicações como catarata e aumento de pressão intra-ocular não foram observadas.

Estudos mostraram que a utilização do ceterolaco de trometamina após a cirurgia de catarata como profilático diminuiu consideravelmente a incidência do edema macular cistóide (WALTERS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008). O edema macular cistóide é a causa mais freqüente de diminuição da acuidade visual após cirurgias de catarata.

Wittpenn e colaboradores (2008) sugeriram que a utilização pré-operatória do ceterolaco de trometamina junto à administração pós-operatória de prednisolona 1% (antiinflamatório esteróide), reduz significativamente a incidência de edema macular

cistóide e espessamento macular em pacientes submetidos à cirurgia de catarata.

Hon-Vu et al. (2007) concluiu que a recuperação visual, inflamação da câmara anterior, e os efeitos subjetivos das cirurgias de catarata são similares em pacientes tratados com cetorolaco ou nepafenac, um novo agente de uso tópico indicado para o tratamento de dor e inflamação associados com essa cirurgia. Estes fármacos se diferem estrutural e farmacologicamente. Nesse estudo, houve uma maior incidência de opacificação da cápsula posterior no grupo tratado com nepafenac, além de uma ligeira melhora na satisfação e na dor pós-operatória dos pacientes submetidos ao tratamento com cetorolaco.

Em um estudo *in vitro* realizado por Walters et al. (2007) para o tratamento de inflamações decorrentes de cirurgia de catarata, o cetorolaco é, entre os AINES, o que melhor inibe a COX-1, além disso, a especificidade para a COX-1 reduz a incidência de efeitos colaterais no sistema gastrointestinal, cardíaco e renal quando comparado com AINES seletivos para COX-2 (BEAULIEU, 2007).

O mecanismo de ação cetorolaco de trometamina envolve a inibição da ciclooxigenase, enzima que converte o ácido aracdônico a prostaglandinas, sendo que a administração ocular do fármaco reduz significativamente os níveis da prostaglandina E₂ (PGE₂) no humor aquoso (ANTHONY e JASINSKI, 2002).

Em estudo realizado por Parulekar e Dahanukar (1993), o cetorolaco de trometamina foi comparado ao ibuprofeno, comumente utilizado em hospitais para analgesia pós-operatória. A dor pós-operatória relatada pelos pacientes foi reduzida com o uso de cetorolaco de trometamina quando comparado ao ibuprofeno. Isso pode ser atribuído a concentração plasmática do fármaco que é atingida mais rapidamente além da sua maior meia vida. Além disso, os pacientes tratados com o cetorolaco não necessitaram de nova dose para analgesia adicional.

Outro estudo comparando ceterolaco de trometamina e bromfenac em pacientes que se submeteram a cirurgia de catarata, a maior concentração no humor aquoso e a melhor inibição da PGE₂ foi promovida pelo ceterolaco de trometamina (CHO et al., 2009).

Foi descrito na literatura que o ceterolaco de trometamina aplicado topicamente possui maior atividade anti-inflamatória na região ocular se comparado ao diclofenaco. Também foi demonstrado que o ceterolaco tópico é tão eficaz quanto os derivados esteróides na inflamação pós-operatória na região ocular (MACA et al., 2010)

Estabilidade

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2004).

Formulações Líquidas são mais sujeitas a algum tipo de decomposição química. Essas decomposições podem alterar as propriedades organolépticas ou até mesmo produzir produtos tóxicos. A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser definida como a capacidade de determinada formulação em um sistema fechado manter suas características físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas (MORENO, 2007).

A deterioração de um produto pode ser acelerada sob condições elevadas de estresse. Esses estudos proporcionam um ganho de tempo considerável num processo de desenvolvimento do produto, pois identifica com rapidez as formulações

que possuem estabilidade aceitável (MORENO, 2007; FARINELLI, 2008).

A necessidade de garantir a identidade, pureza, potência, eficácia e segurança de um produto no momento da utilização, torna fundamental o estudo da estabilidade das preparações farmacêuticas.

No estudo de estabilidade de fármacos a hidrólise dos fármacos sob aumento de temperatura tem uma importância significativa, já que o aumento da temperatura aumenta a velocidade da reação facilitando sua medida (MORENO, 2007). De modo geral, a velocidade da reação de degradação de um fármaco duplica ou triplica para cada 10° C de aumento de temperatura (FERREIRA, 2002).

A existência de muitos fármacos fotossensíveis torna a luz um parâmetro importante no estudo da estabilidade, já que ela pode oferecer a energia necessária para uma reação de degradação.

Existem vários mecanismos de degradação das moléculas dos fármacos, entretanto os processos de instabilidade mais comuns são por hidrólise, oxidação, decomposição, pirólise, fotólise, interações, efeitos de substituintes, entre outros (MORENO, 2007).

Estabilidade de Lipossomas

A composição de uma formulação e os processos químicos, físicos e biológicos pode interferir diretamente a estabilidade dos lipossomas e, conseqüentemente em sua meia-vida. Independentemente do método de preparação dos lipossomas, alterações da estabilidade durante o período de armazenamento podem ocorrer. A conseqüência desta estabilidade físico-química limitada é considerada como grande obstáculo para a transposição da escala laboratorial para a industrial. A estabilidade química dos lipossomas pode ser afetada por reações de degradação como a

hidrólise das ligações do tipo éster e a peroxidação de insaturações das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios. Estas reações em geral levam a alterações na permeabilidade da bicamada lipídica (SCHAFFAZICK et al., 2002).

A instabilidade física leva a problemas tais como a liberação indesejável do composto terapêutico do interior da vesícula, e a alteração no diâmetro e forma das vesículas decorrentes de processos de agregação e fusão dos lipossomas. O processo de agregação consiste na formação de estruturas maiores compostas por lipossomas individuais, a princípio de caráter reversível. A fusão é resultante da formação de novas estruturas coloidais, sendo um processo de caráter irreversível.

A liofilização dos lipossomas, pela retirada da fase aquosa, aumenta a meia vida, pois a estabilidade destes em estado seco é maior. A inclusão de uma pequena quantidade de lipídio com carga na preparação reduz esses problemas, pois promove uma repulsão eletrostática entre as vesículas (BATISTA et al, 2007). No momento do congelamento da amostra para submetê-la ao processo de liofilização, é empregado um crioprotetor ou um lioprotetor para evitar o rompimento das vesículas. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões lipossomais.

Hashem et al., (2007) mostraram que a estabilidade de lipossomas foi mantida com o processo de liofilização sem mudanças significativas na temperatura de transição de fase, forma e distribuição do tamanho em estocagem a 5° C por mais de um ano.

Em estudo realizado por loele e colaboradores (2005), a encapsulação de ácidos retinóicos (isotretinoína e tretinoína) em lipossomas aumentou a fotoestabilidade em comparação com suas soluções etanólicas. Além disso, os lipossomas aumentaram em vinte vezes a meia vida da isotretoína em comparação

com sua solução em etanol.

Glavas-Dodov et al.(2005) mostraram que lipossomas contendo 5- fluorouracil na presença de crioprotutores tornaram-se mais estáveis e menos permeáveis ao extravasamento do fármaco encapsulado quando submetido ao processo de liofilização.

Tursilli e colaboradores (2006) demonstraram que a encapsulação de melatonina em micropartículas lipídicas aumentou sua fotoestabilidade.

Sob o ponto de vista microbiológico, os lipossomas são um meio bastantes propício para a contaminação microbiana. Além disso, outro fator a ser considerado é a possível interação dos lipossomas com os antimicrobianos, que pode culminar na desestabilização física e química (SCHÖLER et al., 2000).

A baixa estabilidade dos lipossomas em suspensão aquosa inviabiliza a sua apresentação nesta forma farmacêutica. Entretanto, o armazenamento na forma liofilizada e na presença de um crioprotetor tem se mostrado uma alternativa viável, pois o crioprotetor evita a fusão das membranas desidratadas e o extravasamento da substância encapsulada no momento da reidratação (FRÉZARD & SCHETTINI , 2005).

Para verificar o efeito do lioprotetor no processo de liofilização a composição da bicamada lipídica deve ser avaliada, já que estabilidade da membrana de fosfolípídeo facilita a obtenção de lipossomas liofilizados. A distribuição homogênea do lioprotetor sobre a bicamada tem influência sobre seu efeito, assim como o diâmetro dos lipossomas. A liofilização é capaz de orientar fármacos lipofílicos para a bicamada melhorando sua estabilidade a longo prazo (CHEN et al., 2010).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

As dispersões lipídicas contendo fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. A partir de uma solução clorofórmica de FSH foi obtido um filme lipídico pela evaporação do solvente utilizando gás nitrogênio. Para assegurar a completa remoção do solvente, a preparação foi mantida em dessecador sob vácuo por, pelo menos, 2 horas. Ao filme preparado foi adicionada 4 mL de solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 para hidratação e mantido em repouso à temperatura ambiente por 40 minutos. Após este tempo, a dispersão foi agitada em vortex até total desprendimento da parede do balão. Os MLVs assim obtidos foram sonicados com pulsos de 1 minuto de sonicação durante 20 minutos. Após a sonicação, a dispersão de lipossomas foi centrifugada a 2550 x g durante 15 minutos, a fim de eliminar o resíduo de titânio liberado pela haste do sonificador.

Lipossomas contendo cetorolaco de trometamina

Para obtenção de lipossomas contendo cetorolaco de trometamina foi utilizado o procedimento descrito acima, onde as diferentes concentrações do fármaco: 6,64; 13,38; 19,92; 26,57; 33,21; 39,85 mM foram dissolvidas no Tris-HCl 10 mM pH 7,4 adicionado à preparação.

2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS

2.2.1. Índice de refração

O índice de refração é um parâmetro importante para determinação do raio

hidrodinâmico dos lipossomas por espalhamento dinâmico de luz. Por isso ele foi determinado antes de submeter as preparações ao *light scattering*. As determinações foram realizadas conforme a Farmacopéia Americana (USP 32, 2009) utilizando-se um refratômetro de Abbé e ambiente climatizado a 20 °C. O índice de refração da água purificada foi o padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.2. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A nanoestrutura dos lipossomas foi analisada por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). As medidas foram realizadas na linha de SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas. Esta linha é equipada com um monocromador de silício (111) produzindo um feixe de raios-X ($\lambda=1,488 \text{ \AA}$) colimado e focalizado horizontalmente no intervalo do vetor espalhamento (q) de 0.017 a 0.35 \AA^{-1} . A intensidade do feixe espalhado $I(q)$ em função do módulo do vetor de espalhamento que foi determinada com um detector 2D Imagem Plate e o espalhamento parasita do ar foi subtraído da intensidade total espalhada. As curvas resultantes foram normalizadas levando em consideração os efeitos do decaimento natural e, da intensidade da fonte de radiação síncrotron, da sensibilidade do detector, da transmitância e espessura da amostra. Cada espectro foi coletado por 300s.

2.3. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO CETOROLACO DE TROMETAMINA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO UV-Vis

2.3.1. Comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) do cetorolaco de trometamina

2.3.1.1 Em Tampão Tris-HCl

Para determinar o comprimento de onda de máxima absorção do cetorolaco de trometamina foi preparada uma solução padrão do fármaco a 20,66 $\mu\text{g/mL}$ a partir de uma solução estoque de 2,5 mg/mL do fármaco em Tris-HCl 10 mM pH 7,4. A amostra foi então analisada por espectrofotometria de varredura na região UV-Vis no intervalo entre 200 e 400 nm.

2.3.1.2 Em metanol.

Para determinar o comprimento de onda de máxima absorção do cetorolaco de trometamina foi preparada uma solução padrão do fármaco a 20,66 $\mu\text{g/mL}$ a partir de uma solução estoque de 2,5 mg/mL do fármaco em metanol. A amostra foi então analisada por espectrofotometria de varredura na região UV-Vis no intervalo entre 200 e 400 nm.

2.3.2. Curva padrão do cetorolaco de trometamina

As curvas padrão do cetorolaco de trometamina foram realizadas em Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e em metanol. Gráficos de absorbância em relação à concentração foram construídos a partir de uma solução estoque contendo 2,5 mg/mL de cetorolaco de trometamina. Uma alíquota da solução estoque foi colocada na cubeta e sucessivas diluições foram realizadas em Tris-HCl, 10 mM pH 7,4 e em metanol diretamente na cubeta do espectrofotômetro de modo a obter concentrações na faixa de 0,50 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$. A cada diluição, a solução era homogeneizada e a leitura da absorbância foi realizada nos comprimentos de onda de 323 nm e 320 nm, contra um branco de Tris-HCl ou de metanol.

A equação da reta foi obtida por regressão linear (Equação 1):

$$\text{Abs} = a.[\text{Ket}] + b \quad (1)$$

Onde:

Abs = absorvância do fármaco obtida em 323 e em 320 nm;

a = coeficiente angular da reta;

b = intercepto da curva em relação ao eixo da absorvância do fármaco;

[Ket] = concentração de cetorolaco de trometamina.

2.4. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Separação do fármaco não encapsulado

Para determinação da eficiência de encapsulação foi necessário primeiramente realizar a separação do fármaco não encapsulado pelos lipossomas. A metodologia adotada foi a cromatografia de exclusão utilizando gel de Sephadex G-50 (dextrana reticulada) como fase estacionária. Foram pesados 10 g de Sephadex G-50 e feita hidratação por 24 horas com água deionizada previamente desaerada para evitar a incorporação de ar na matriz. Após o período de hidratação, a Sephadex G-50 foi transferida para uma coluna de vidro (30 x 3 cm) e eluídos 500 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4, também desaerado, para empacotar a coluna. Em seguida, aplicou-se 2,0 mL das preparações lipossomais de cetorolaco utilizando tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 desaerado como fase móvel. Antes das amostras, foram aplicados 2,0 mL da dispersão de lipossomas vazios para saturar os sítios de ligação da resina.

Foram coletadas 50 frações eluídas da coluna de, aproximadamente, 2 mL cada uma, sendo o fluxo de 2 mL/min. Estas frações foram monitoradas por

espectrofotometria em 410 e 323 nm. Em 410 nm observou-se o perfil de eluição dos lipossomas e em 323nm a eluição do fármaco.

Cálculo da eficiência de encapsulação

As frações correspondentes à saída dos lipossomas, ou seja, que apresentaram turbidez em 410 nm foram reunidas e liofilizadas. O liofilizado foi pesado e uma alíquota de 10 mg foi dissolvida em metanol para que as vesículas lipossomais fossem rompidas e liberassem o fármaco encapsulado. As absorbâncias das amostras foram determinadas por espectrofotometria utilizando-se como branco uma solução metanólica de lipossomas vazios. Através da curva analítica do fármaco em metanol foi possível determinar a massa de cetorolaco encapsulada pelos lipossomas.

2.5. CONTROLE DA VARIAÇÃO DE pH

A variação do pH de todas as amostras foi acompanhada utilizando fitas de pH nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 72, 84, 96, 108, 120 e 340 horas.

2.6. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE

Uma preparação lipossomal de 39,85 mM de cetorolaco de trometamina acondicionada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz foi analisada em espectrofotômetro na região de 323 nm nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 21, 24, 33, 48, 54, 70, 121, 145, 169, 193, 217, 241, 265, 289, 313 horas para se avaliar o comportamento dos lipossomas.

2.7. ESTUDO DE ESTABILIDADE

Preparações de lipossomas contendo concentrações de 6,64; 13,38; 19,92; 26,57; 33,21; 39,85 mM de cetorolaco de trometamina tiveram seu diâmetro determinado por espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering) (New, 1990). As amostras foram obtidas nos intervalos de 0, 18, 25, 45, 70, e 169 horas.

Os parâmetros para a análise foram:

- Temperatura 20°C
- Comprimento de onda do laser 514 nm
- Índice de refração de acordo com o índice da amostra analisada.

Estudo de fotoestabilidade

Para o estudo de fotoestabilidade do cetorolaco de trometamina em uma preparação lipossomal foi utilizado uma câmara com uma luz ultravioleta de potência 22 W e frequência de 25 KHz. que ficou ligada ininterruptamente enquanto o experimento estava sendo realizado. Foram utilizadas, para efeito de comparação, soluções do fármaco em tampão Tris- HCl 10 mM pH 7,4 para mostrar a eficiência do lipossoma na foto proteção. Soluções do fármaco livre, lipossomal e lipossomas vazios foram utilizados nesse experimento. As soluções foram colocadas em frascos de vidro transparentes para que a incidência da luz ultra-violeta fosse máxima.

Em dois frascos foram colocadas a solução do fármaco livre. Uma ficou protegida por um papel preto e outra ficou totalmente exposta a luz. Desse modo, foi possível descartar qualquer interferência que não fosse a da luz na degradação do fármaco. Utilizou-se o mesmo procedimento experimental para o fármaco lipossomal. Para a avaliação quantitativa do fármaco os lipossomas foram rompidos com metanol.

Dos outros dois frascos com lipossomas vazios, um também foi totalmente

protegido e outro foi exposto à luz. Essas dispersões foram utilizadas como branco na determinação quantitativa do fármaco lipossomal, protegido e exposto, respectivamente, garantindo assim que as possíveis interferências da degradação da FSH não interferissem na análise. Os lipossomas dessas soluções também foram rompidos com metanol.

Nesse estudo foi utilizada a preparação de 39,85 mM de cetorolaco de trometamina e as amostras foram retiradas nos tempo: 0, 3, 9, 29, 51, 81, 190, 216, 250 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

A análise por SAXS mostrou que os lipossomas obtidos apresentaram perfil característico e que a encapsulação de cetorolaco de trometamina conferiu maior estruturação às bicamadas dos lipossomas (figuras 4 e 5).

Figura 4 - Avaliação estrutural dos lipossomas vazios por SAXS.

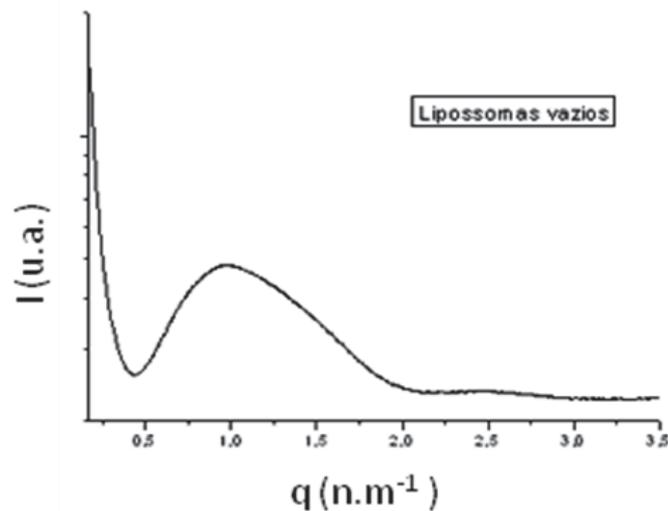
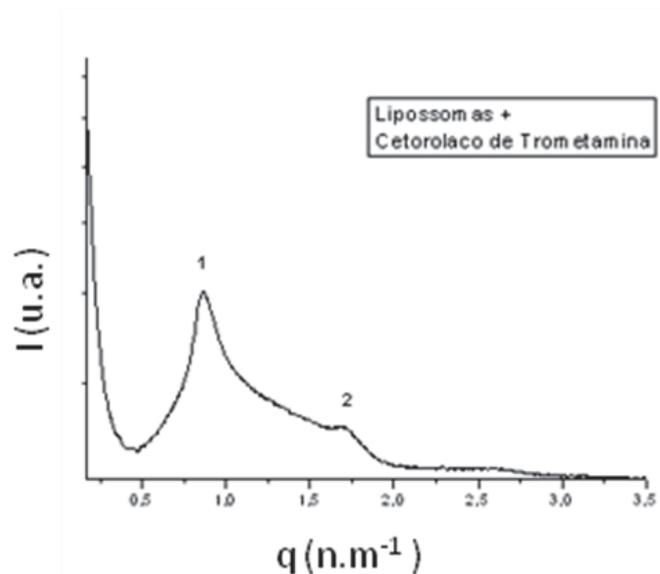


Figura 5 - Avaliação estrutural dos lipossomas contendo Ket por SAXS.



A presença de picos de difração (1 e 2) bem definidos (figura 5) indica formação de vesículas com alta estruturação molecular, alteração provavelmente devida à encapsulação do fármaco.

A figura 4 apresenta um pico largo que vai da região de 0,5 até aproximadamente 1,75 q, indicando que a bicamada dos lipossomas sem fármaco apresenta certo grau de estruturação. Na figura 5 pode-se observar dois picos dentro da mesma região. A ocorrência do segundo pico é indicativo de sistemas mais estruturados, o que sugere que o cetorolaco de trometamina se interpõe entre as cadeias fosfolipídicas da bicamada e confere a ela uma melhor organização. Isso ocorre devido ao fato da molécula do fármaco apresentar regiões com características polares e apolares. A trometamina tem característica polar, enquanto o cetorolaco apresenta anéis de carbono que conferem característica apolar à molécula, permitindo que ela se situe tanto na região interna da bicamada quanto no interior aquoso.

A maior estruturação do sistema pode modificar a velocidade de liberação do fármaco e alterar parâmetros farmacocinéticos como aumento da solubilidade e biodisponibilidade. Com isso é possível diminuir a toxicidade dos fármacos além de aumentar a eficácia clínica.

3.2. COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO EM METANOL

O pico de absorção no λ_{\max} do cetorolaco de trometamina, na concentração de 20,66 $\mu\text{g/mL}$ ($5,49 \times 10^{-5}$ M) do fármaco determinado em metanol, foi obtido na região de 320 nm, conforme pode ser observado na figura 6. O coeficiente de extinção molar (ϵ) do fármaco calculado através da equação 2 nessas condições foi de $15.962 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, foi definido como a razão entre a absorbância (**A**) no λ_{\max} dividido

pela concentração molar da solução da substância (**c**), utilizando uma cubeta com caminho óptico **L** = 1 cm.

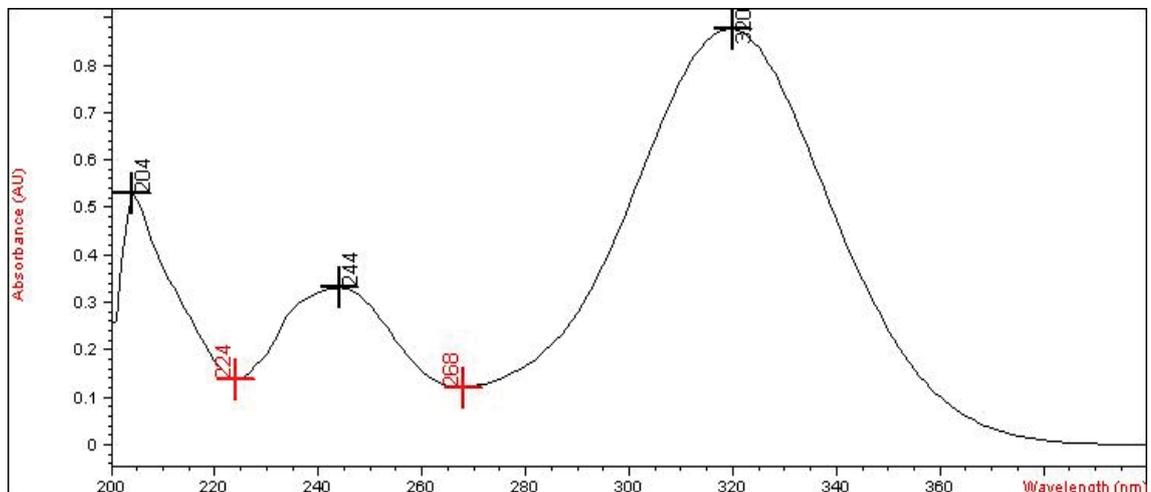
$$A = \epsilon c L$$

Absorbância \rightarrow A \leftarrow Caminho óptico(cm) L
 \uparrow Concentração(M) c \uparrow Coeficiente de extinção Molar ($M^{-1}cm^{-1}$) ϵ

(2)

A determinação do λ_{max} do cetorolaco de trometamina é importante para as determinações de eficiência de encapsulação que foi conduzida no solvente, o qual é capaz de romper os lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, liberando o fármaco, que poderá então ser avaliado quantitativamente.

Figura 6. Espectro de varredura do cetorolaco de trometamina em metanol apresentando λ_{max} 320nm.

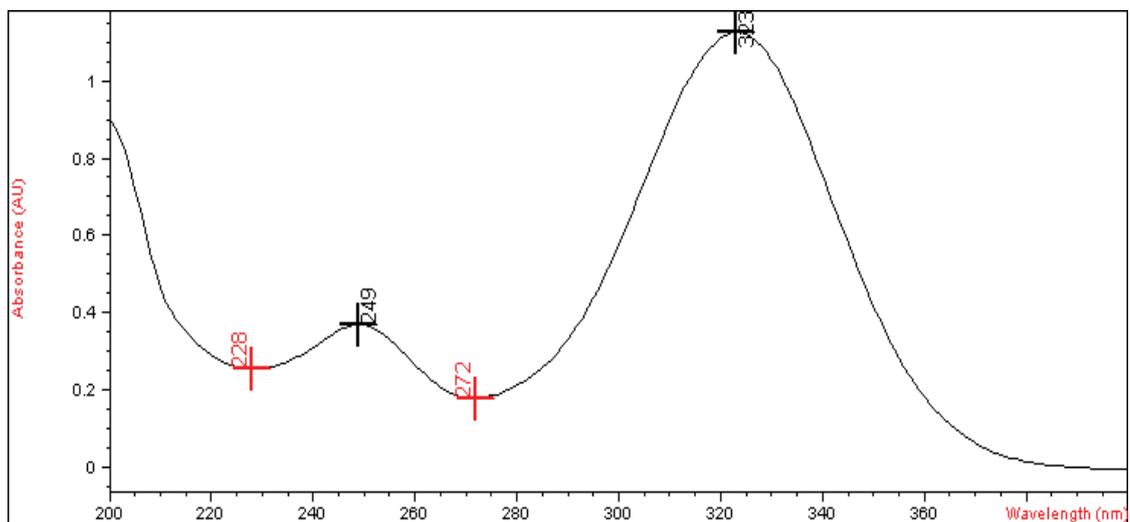


3.3. COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO EM TAMPÃO TRIS-HCl.

O pico de máxima absorção (λ_{max}) do cetorolaco de trometamina, na concentração de 20,66 $\mu g/mL$ ($5,49 \times 10^{-5} M$) em Tris-HCl, 10 mM, pH 7,4, foi obtido na região de 323 nm, conforme pode ser observado na figura 7. O coeficiente de extinção molar (equação 2) encontrado para o cetorolaco de trometamina em Tris-

HCl foi de $20.535 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Como o caminho ótico utilizado é sempre o mesmo, os valores elevados de ϵ para o cetorolaco de trometamina, tanto em metanol (menor neste solvente) quanto em Tris-HCl indicam que o método de detecção e quantificação na região UV-Vis é bastante sensível.

Figura 7. Espectro de varredura do cetorolaco de trometamina em Tris-HCl 10 mM pH 7,4 apresentando λ_{max} 323nm.

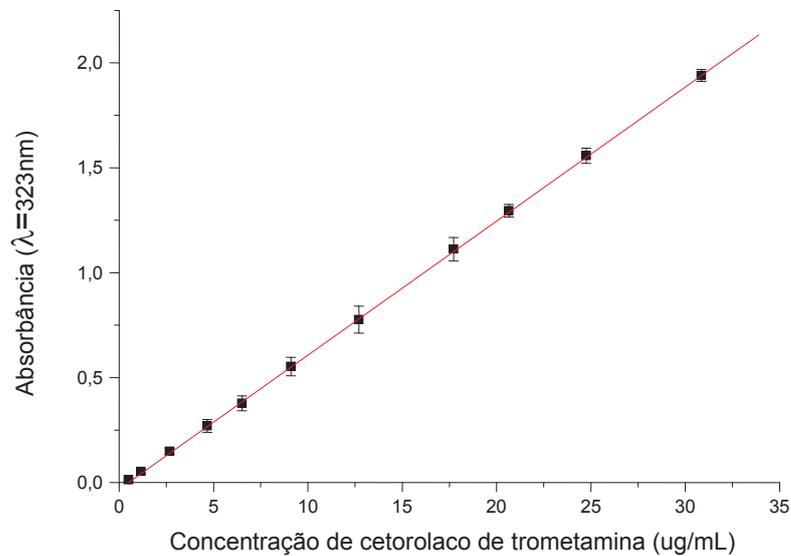


3.4. CURVA PADRÃO DO CETOROLACO DE TROMETAMINA

3.4.1. Em tampão Tris-HCl

Para obtenção da curva analítica do cetorolaco de trometamina em Tris-HCl 10 mM pH 7,4 foram realizadas determinações das absorbâncias em triplicata por espectrofotometria em 323 nm e calculados a média e o desvio padrão (Figura 8).

Figura 8.- Curva padrão do cetorolaco de trometamina em Tris-HCl em 323 nm.



A equação linear (1) representativa obtida para curva analítica da figura 8 é:

$$y = 0,06353x + (-0,02011), \text{ onde } y = \text{Abs e } x = [\text{Ket}] \text{ com } r^2 = 0,99998.$$

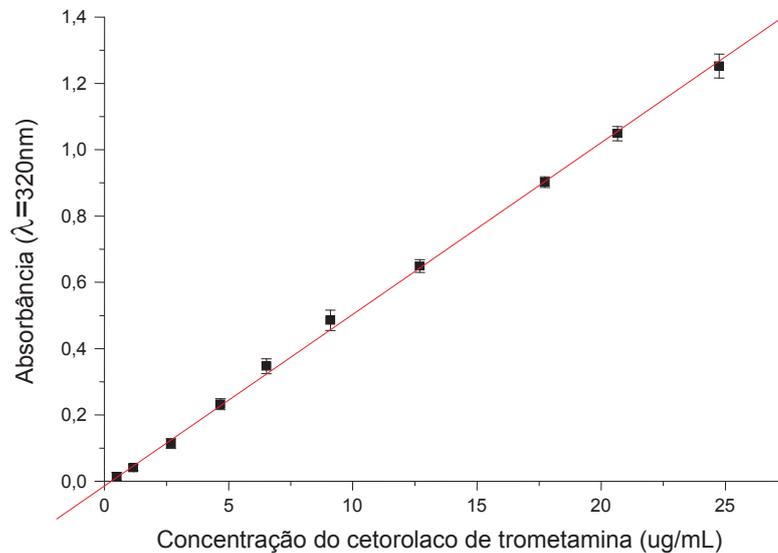
Os resultados da figura 8 mostram que nos limites de concentração entre 0,5 a 30,0 µg/mL de fármaco, a curva padrão comporta-se de forma linear, seguindo a Lei de Lambert-Beer. O coeficiente de determinação da reta (r^2) próximo a 1 confirma essa linearidade. Desse modo, torna-se possível a análise quantitativa do fármaco em tampão Tris-HCl por espectrometria na região UV-Vis em 323nm.

3.4.2. Em metanol.

Para obtenção da curva analítica do cetorolaco de trometamina em metanol foram realizadas determinações das absorbâncias em triplicata por espectrofotometria em 320 nm e calculados a média e o desvio padrão.

A curva padrão obtida em metanol (Figura 9) tem como objetivo possibilitar a determinação da concentração do cetorolaco de trometamina encapsulado nos lipossomas.

Figura 9. - Curva padrão do cetorolaco de trometamina em metanol em 320 nm.



A equação linear (1) representativa obtida para curva analítica da figura 9 é:

$$y = 0,05187x + (-0,01448), \text{ onde } y = \text{Abs e } x = [\text{Ket}] \text{ com } r^2 = 0,99969.$$

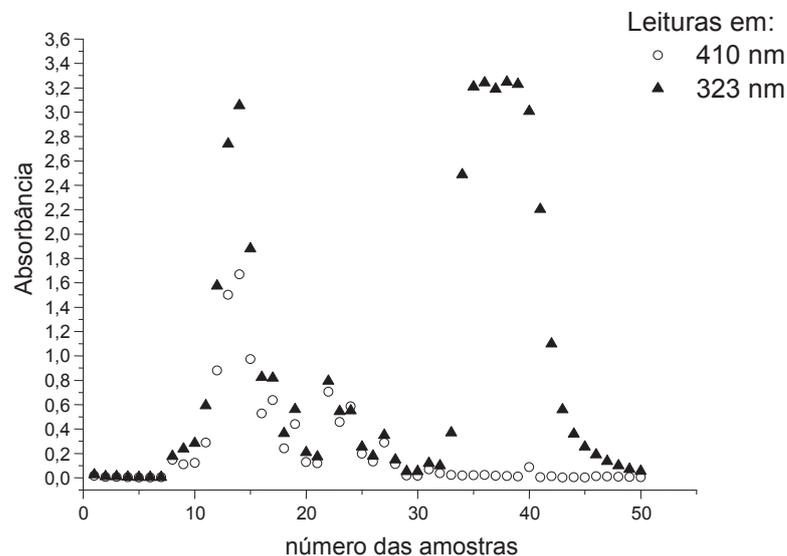
Os resultados da figura 9 mostram que nos limites de concentração entre 0,5 a 30,0 µg/mL de fármaco a resposta da absorvância em relação à concentração foi linear, seguindo a Lei de Lambert-Beer. O coeficiente de determinação da reta (r^2) próximo a 1 confirma essa linearidade. Desse modo, torna-se possível a análise quantitativa do fármaco em metanol por espectrometria na região UV-Vis em 320 nm.

3.5. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Nas figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15 estão representadas o perfil de eluição dos lipossomas (410nm) e do fármaco não encapsulado, nas diferentes concentrações. A eluição dos lipossomas foi monitorada por espectrofotometria na região UV-Vis no comprimento de onda de 410 nm, enquanto para o cetorolaco a monitoração foi conduzida em 323 nm, região de máxima absorção do fármaco (Figura 7)

Na figura 10, onde o fármaco encontra-se na concentração de 6,64 mM, observa-se que entre as amostras 8 e 30 coletadas havia presença de lipossomas e cetorolaco de trometamina, que possui diâmetro maior do que o fármaco em solução. Desse modo, a passagem pela coluna de separação é mais rápida, já que os lipossomas eluem entre as partículas de resina e não através delas. As amostras coletadas em seguida apresentaram apenas a presença do fármaco mostrando que a separação através da coluna foi eficiente. As últimas amostras tiveram absorção muito próxima a zero evidenciando que todo fármaco adicionado na coluna foi recuperado.

Figura 10. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 6,64mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.



Nas figuras 11, 12 e 13, onde o fármaco encontra-se nas concentrações de 13, 28 mM, 19,92mM e 26,57mM, respectivamente, observa-se que entre nas primeiras amostras coletadas havia presença de lipossomas e cetorolaco de trometamina. Entre essas e as que continham apenas a presença do fármaco houve aquelas que

não apresentaram absorção sendo, portanto, apenas o eluente. Isso evidencia uma separação eficiente através da coluna.

Figura 11. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 13,28 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.

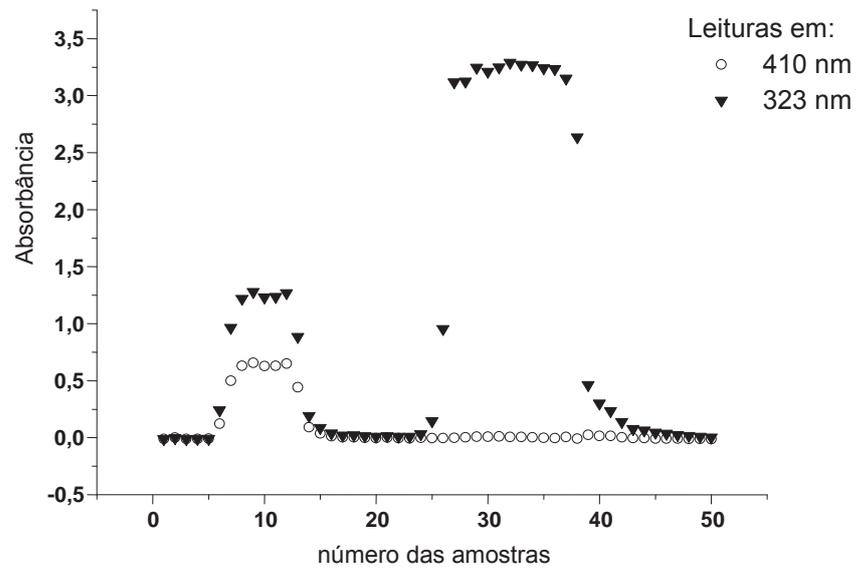


Figura 12. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 19,92 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.

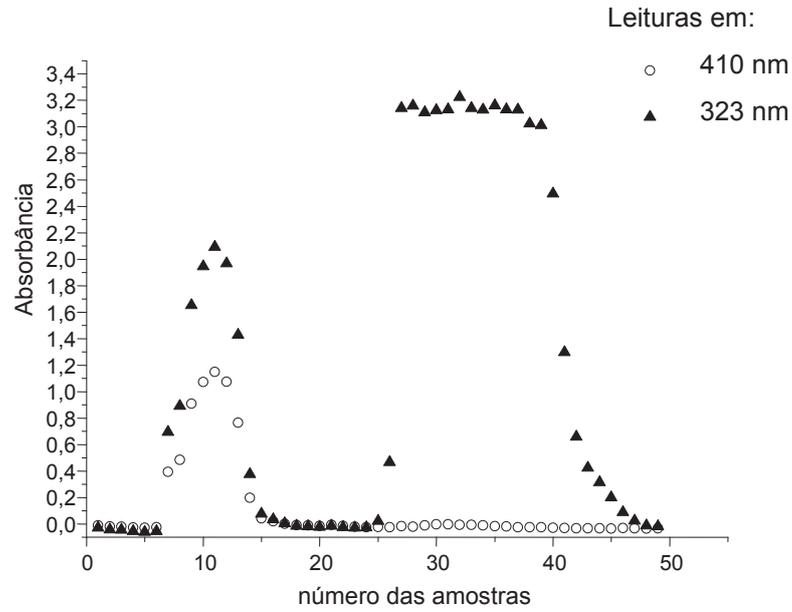
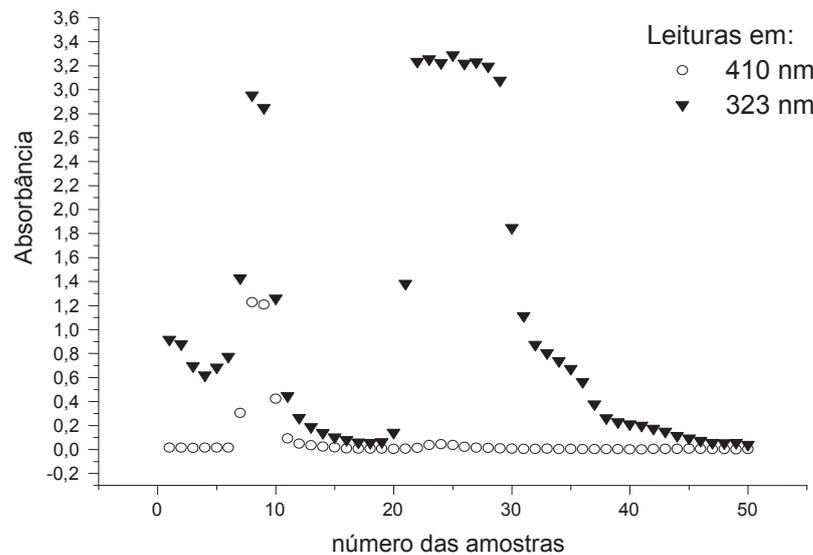


Figura 13. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 26,57 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.



Nas figuras 14 e 15, onde o fármaco encontra-se nas concentrações de 33,21 mM e 39,85mM, respectivamente, o número de amostras que continham apenas o cetorolaco de trometamina em solução foi maior, evidenciando que nessas concentrações o limite máximo de fármaco que consegue ser incorporado ao sistema lipossomal já havia sido atingido.

Figura 14. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 33,21 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.

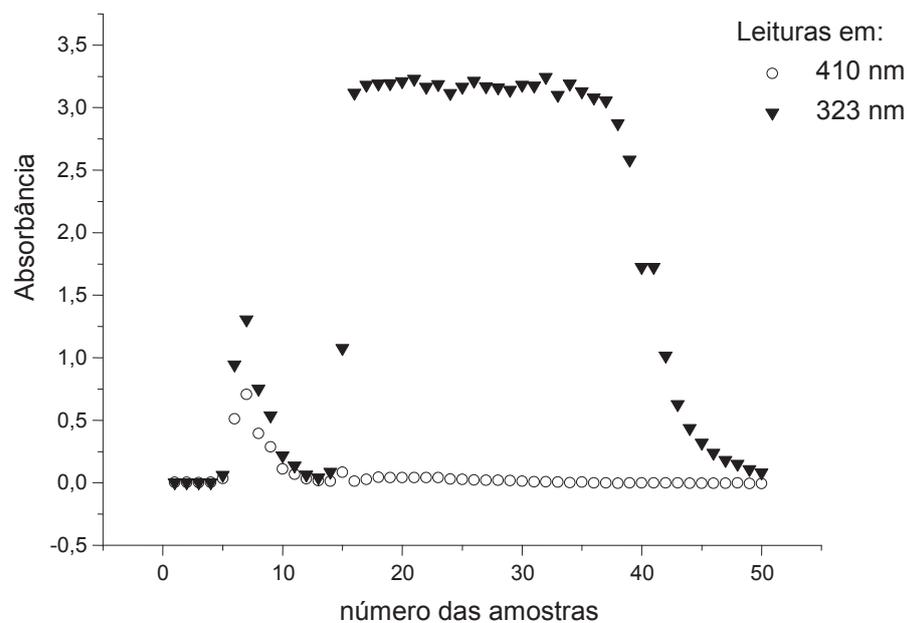
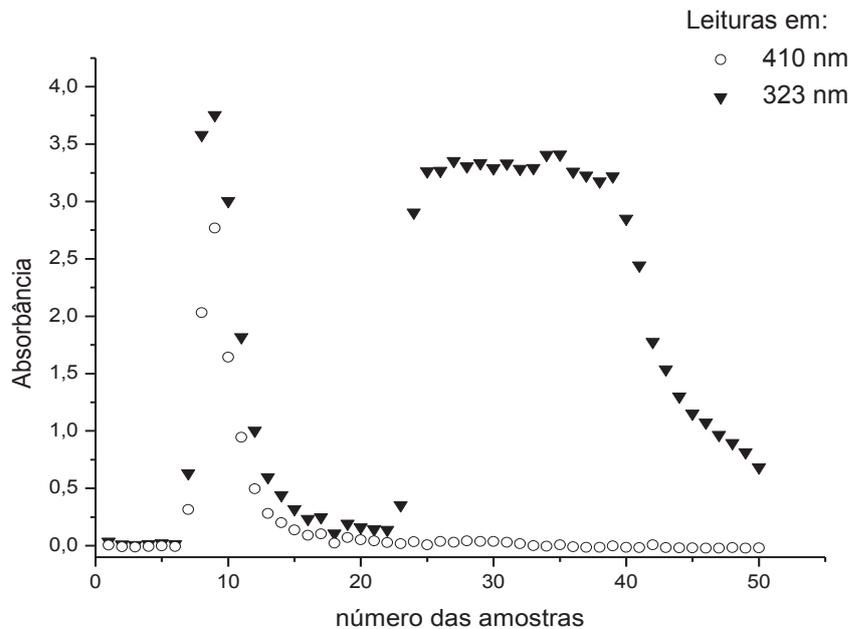


Figura 15. Perfil de eluição dos lipossomas carregados e do cetorolaco de trometamina a 39,85 mM. Lipossomas em 410nm e cetorolaco de trometamina em 323nm.



Pela análise do perfil de eluição das amostras, as frações contendo lipossomas carregados com fármaco foram reunidas e liofilizadas para determinação da eficiência de encapsulação. A cromatografia de exclusão em gel utilizando Sephadex- G50 mostrou-se eficiente na separação do fármaco não encapsulado e lipossomas com fármaco.

Para a determinação da eficiência de encapsulação foram realizados os seguintes procedimentos:

- liofilização das frações contendo lipossomas com fármaco, eluídas da coluna de cromatografia;
- determinação da massa total do liofilizado;
- dissolução quantitativa da massa liofilizada para determinação do fármaco encapsulado;

- determinação da absorbância das amostras contendo fármaco; utilizando-se como branco os lipossomas isentos de fármaco submetidos ao mesmo tratamento;

- determinação da concentração de cetorolaco de trometamina ($\mu\text{g/mL}$) através da equação obtida na curva analítica do fármaco em metanol (Figura 7);

Uma vez determinada a massa de fármaco encapsulado pelos lipossomas (W), calculou-se a eficiência de encapsulação (EE) segundo Imura et al. (2002) como mostrado na Equação 3.

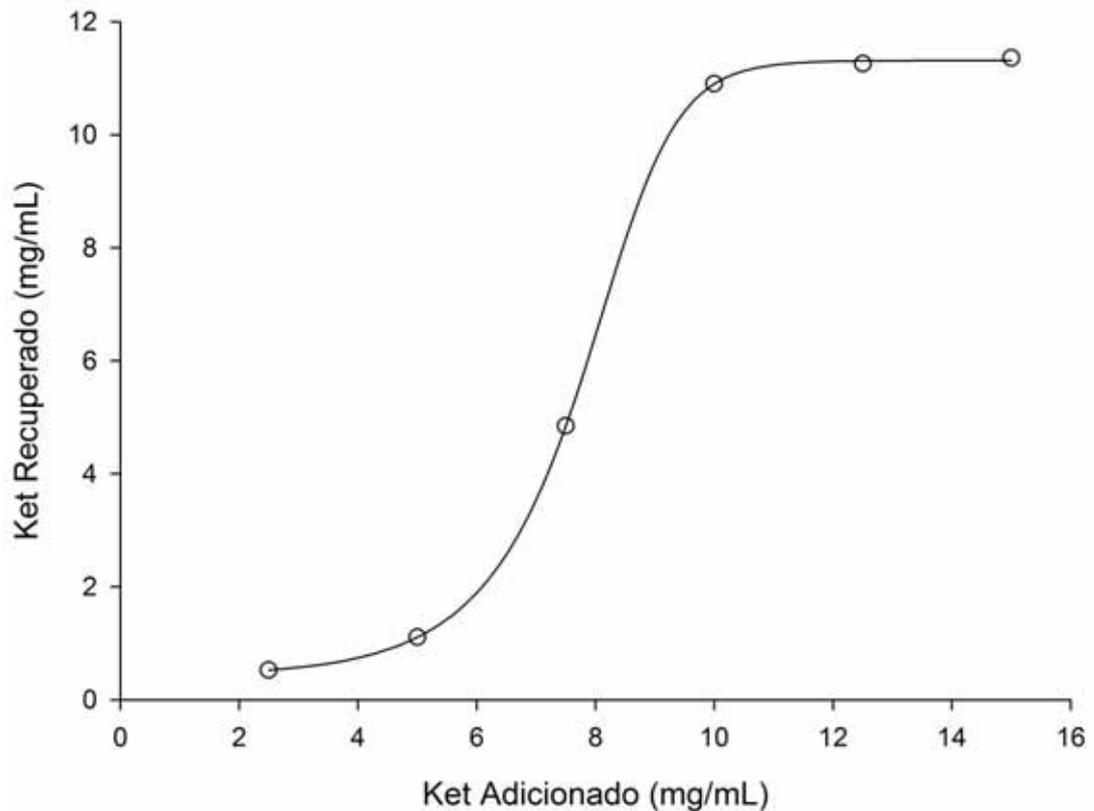
$$EE(\%) = \frac{\text{Massa de fármaco encapsulado nos lipossomas (W)}}{\text{Massa total de fármaco adicionada à dispersão}} \times 100 \quad (3)$$

Tabela 1. Eficiência de encapsulação de lipossomas contendo 20 mM de FSH e diferentes concentrações de cetorolaco de trometamina.

Composição da Preparação de Lipossomas	Massa Adicionada (mg)	Massa Recuperada (mg)	Eficiência de Encapsulação (%)
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	10,0	0,53	5,3
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	20,0	1,11	5,52
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	30,0	4,85	16,15
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	40,0	10,9	27,25
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	50,0	11,26	22,52
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	60,0	11,36	18,93

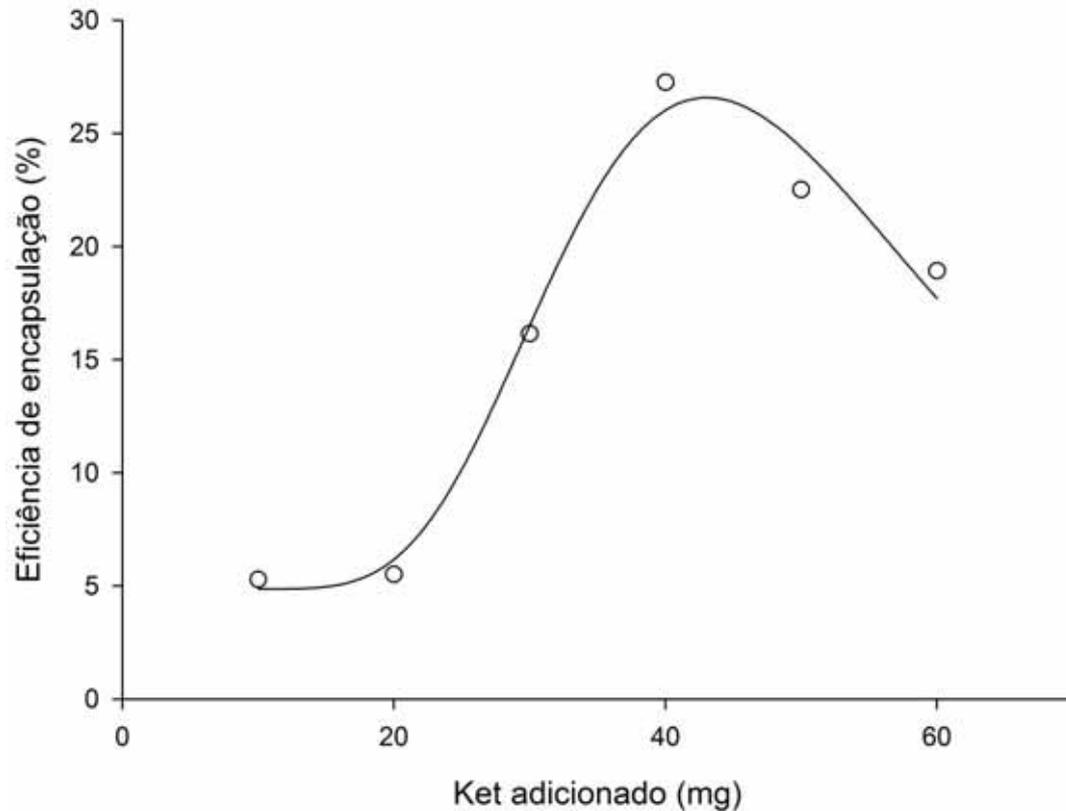
Na figura 16 é possível verificar a correlação entre a concentração de fármaco adicionado e a concentração recuperada. Ficou evidente que a relação molar que produz a melhor eficiência de encapsulação foi da ordem de 20:26 mM (Tabela 1), aproximadamente 1:1.

Figura 16. Correlação entre a concentração de fármaco adicionada e a concentração recuperada em lipossomas de 20mM de FSH e diferentes concentrações de cetorolaco de trometamina.



A figura 17 mostra que em quantidades superiores a 40 mg (26, 57 mM) de cetorolaco de trometamina adicionado a preparação, a eficiência de encapsulação torna-se cada vez menor, já que a quantidade máxima de fármaco que o sistema consegue encapsular já foi alcançada, e portanto, quanto mais fármaco se adiciona após a saturação do sistema, mais fármaco livre será recuperado e menor será a eficiência de encapsulação.

Figura 17. Relação entre eficiência de encapsulação (%) e Ket adicionado (mg).



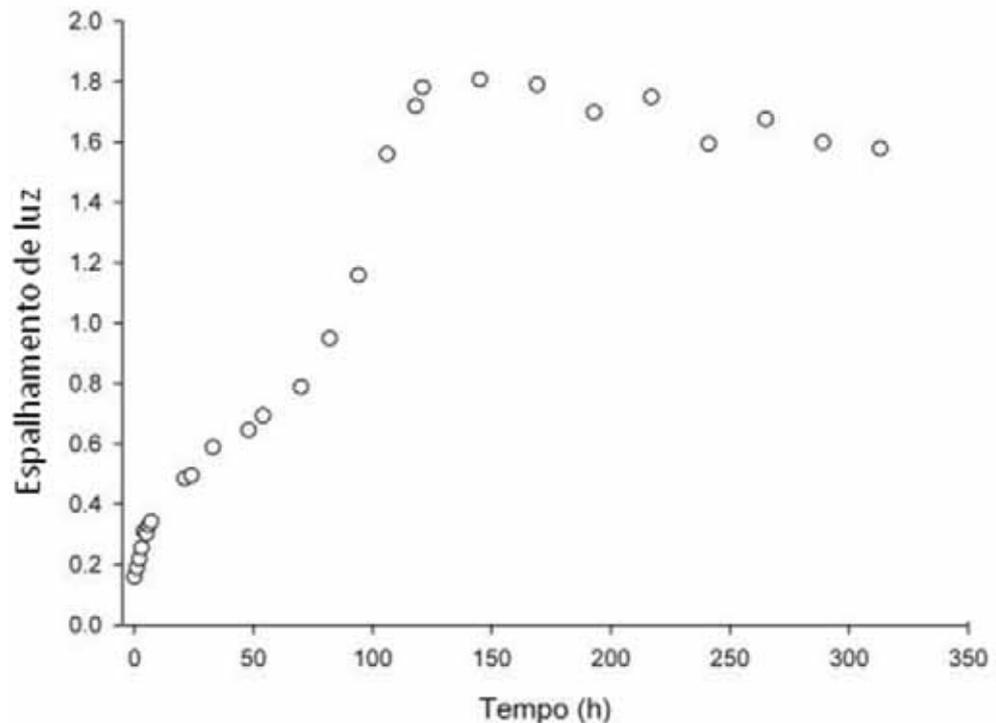
3.6. CONTROLE DA VARIAÇÃO DE pH

Os valores de pH medidos durante todo esse estudo mantiveram-se constantes em 7,0 nas formulações com concentrações de cetorolaco de trometamina de: 0; 6,64; 39,85 mM, ou com variações mínimas, não superiores a 1, nas concentrações de: 13,28; 19,92, 26,57; 33,21 mM. Não pode-se evidenciar o pH de 7,4 já que utilizou-se fitas e não um pHmetro para essa análise. Desse modo, pode-se dizer que o tampão utilizado mostrou-se adequado, pois garantiu que o pH das formulações com diferentes concentrações do fármaco não se alterasse.

3.7. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE

Este estudo baseia-se na capacidade de espalhamento de luz provocado pela variação dos diâmetros dos lipossomas. Considerando que a estabilidade pode ser relacionada com o aumento do diâmetro (maior absorbância), neste estudo a estabilidade prévia dos lipossomas foi realizada monitorando-se a turbidez do meio em 410nm. A concentração de 20mM de FSH foi escolhida pois ela confere a preparação lipossomal uma turbidez adequada para essa análise. A figura 18 mostra a variação da absorbância derivada do espalhamento de luz provocado pelas estruturas dos lipossomas em função do tempo.

Figura 18. Monitoramento da absorbância derivada do espalhamento de luz dos lipossomas contendo 20mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e 39,85 mM de cetorolaco de trometamina.



A figura 18 mostra um perfil com aumento acentuado da absorbância derivada do espalhamento de luz das estruturas nos tempos iniciais do monitoramento atingindo um patamar em aproximadamente 121 horas. Este aumento inicial da absorbância pode estar relacionado com o aumento inicial dos diâmetros dos lipossomas, o qual atinge um estado de equilíbrio a partir dos 121 horas do monitoramento. Essas informações são importantes no estabelecimento do protocolo da determinação direta dos diâmetros por *light scattering*, a qual foi conduzida na próxima etapa dos estudos. Além disso, um estudo equivalente deverá ser realizado na ausência do fármaco, para que seja possível comparar a influência deste sobre a estabilidade do sistema.

3.8. ESTUDO DE ESTABILIDADE

3.8.1. Estabilidade da estrutura física dos lipossomas

3.8.1.1. Índice de refração

O índice de refração das preparações de lipossomas foi determinado antes das amostras serem submetidas à análise por espalhamento de luz. Foram realizadas três medidas de índice de refração para cada tipo de formulação e das medidas foi obtida a média.

A tabela 2 mostra as médias das medidas dos índices de refração.

Tabela 2. Valores dos índices de refração das formulações lipossomais

Composição das Formulações	Índice de Refração
FSH 20 Mm	1,336 ± 0,001
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	1,336 ± 0,001
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	1,335 ± 0,001
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	1,336 ± 0,001
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	1,335 ± 0,001
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	1,337 ± 0,001
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	1,336 ± 0,001

3.8.1.2. Diâmetro médio dos lipossomas

Diâmetro e distribuição do diâmetro são parâmetros essenciais para avaliar a integridade de um sistema lipossomal, por isso é importante desenvolver um sistema que tenha diâmetro de partícula conhecido, estreita distribuição de diâmetro e que se mantenha estável com o tempo. O Espalhamento Dinâmico de Luz é uma das técnicas mais utilizadas para fornecer o raio hidrodinâmico e a distribuição de diâmetro das vesículas (índice de polidispersidade) de dispersões lipossomais com diâmetro menor que 1 μm (HELDT et al., 2001; MULLER et al., 2004).

A tabela 3 mostra o resultado da análise do diâmetro da preparação lipossomal vazia e nas concentrações do fármaco de 6,64, 13,28, 19,92, 26,57, 33,21, 39,85 mM no tempo zero.

Tabela 3. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 0h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.

Amostra	Diâmetro (nm) Média (n =10)	Polidispersidade
FSH 20 mM	146,8	0,079
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	145,3	0,096
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	125,6	0,190
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	137,9	0,019
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	155,2	0,020
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	231,8	0,048
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	196,7	0,166

A tabela 4 mostra o resultado da análise do diâmetro da preparação lipossomal vazia e nas concentrações do fármaco de 6,64, 13,28, 19,92, 26,57, 33,21, 39,85 mM após 18h.

Tabela 4. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 18h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.

Amostra	Diâmetro (nm) Média (n =10)	Polidispersidade
FSH 20 mM	186,0	0,089
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	154,6	0,038
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	146,3	0,071
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	175,2	0,030
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	164,1	0,058
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	247,3	0,041
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	199,7	0,039

A tabela 5 mostra o resultado da análise do diâmetro da preparação lipossomal vazia e nas concentrações do fármaco de 6,64, 13,28, 19,92, 26,57, 33,21, 39,85 mM após 25h.

Tabela 5. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 25h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.

Amostra	Diâmetro (nm) Média (n =10)	Polidispersidade
FSH 20 mM	232,6	0,150
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	203,7	0,039
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	192,7	0,041
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	223,2	0,049
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	174,6	0,054
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	257,6	0,012
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	213,9	0,044

A tabela 6 mostra o resultado da análise do diâmetro da preparação lipossomal vazia e nas concentrações do fármaco de 6,64, 13,28, 19,92, 26,57, 33,21, 39,85 mM após 45h.

Tabela 6. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 45h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.

Amostra	Diâmetro (nm) Média (n =10)	Polidispersidade
FSH 20 mM	188,1	0,045
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	191,4	0,005
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	176,1	0,022
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	197,5	0,018
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	173,3	0,09
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	219,6	0,08
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	176,5	0,011

A tabela 7 mostra o resultado da análise do diâmetro da preparação lipossomal vazia e nas concentrações do fármaco de 6,64, 13,28, 19,92, 26,57, 33,21, 39,85 mM após 70h.

Tabela 7. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 70h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.

Amostra	Diâmetro (nm) Média (n =10)	Polidispersidade
FSH 20 mM	239,10	0,005
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	251,6	0,007
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	232,4	0,005
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	257,6	0,005
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	185,9	0,008
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	244,0	0,005
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	237,0	0,005

A tabela 8 mostra o resultado da análise do diâmetro da preparação lipossomal vazia e nas concentrações do fármaco de 6,64, 13,28, 19,92, 26,57, 33,21, 39,85 mM após 169h.

Tabela 8. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz no tempo 169h. A preparação foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em Tris- HCl 10 mM pH 7,4.

Amostra	Diâmetro (nm) Média (n =10)	Polidispersidade
FSH 20 mM	246,5	0,069
FSH: Ket (20: 6,64 mM)	298,8	0,005
FSH: Ket (20: 13,28 mM)	221,2	0,005
FSH: Ket (20: 19,92 mM)	251,1	0,034
FSH: Ket (20: 26,57 mM)	287,9	0,061
FSH: Ket (20: 33,21 mM)	381,9	0,005
FSH: Ket (20: 39,85 mM)	341,8	0,005

O índice de polidispersidade é a medida para a faixa de distribuição de diâmetro de partículas (MULLER et al., 2004). Um índice de até 0,35 indica que a população de lipossomas possui homogeneidade de tamanhos adequada.

Na figura 19 é possível observar a evolução dos diâmetros das partículas lipossomais na presença, em diferentes concentrações, e na ausência de fármaco.

Figura 19. Diâmetro dos lipossomas em função do tempo.

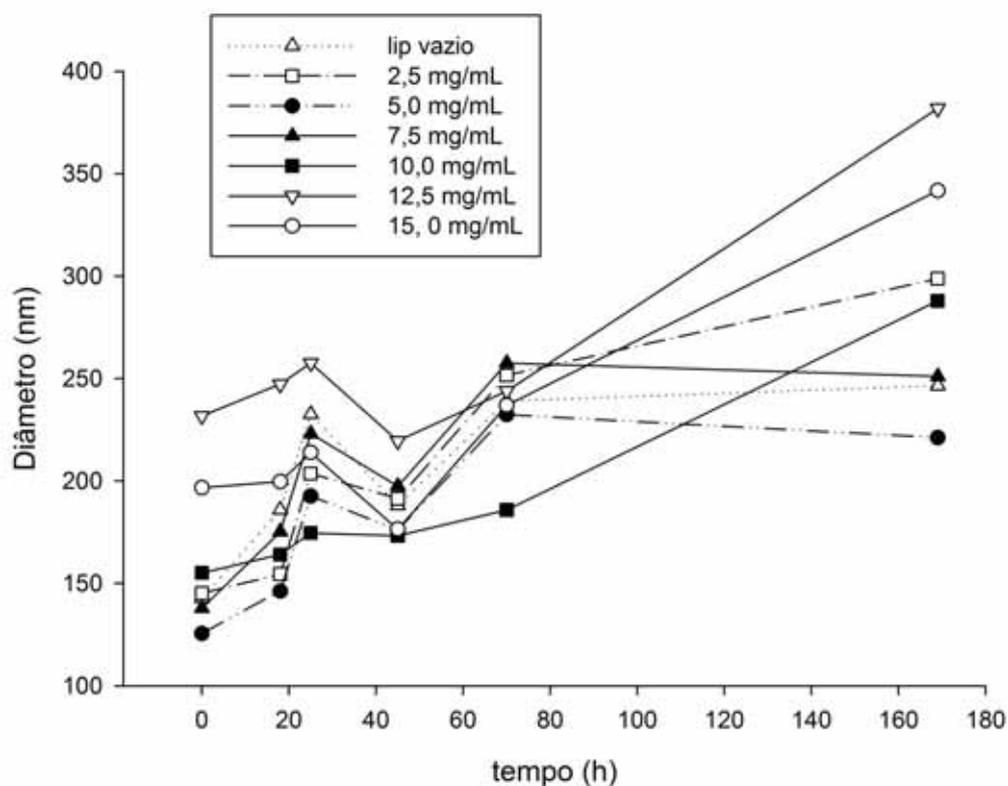
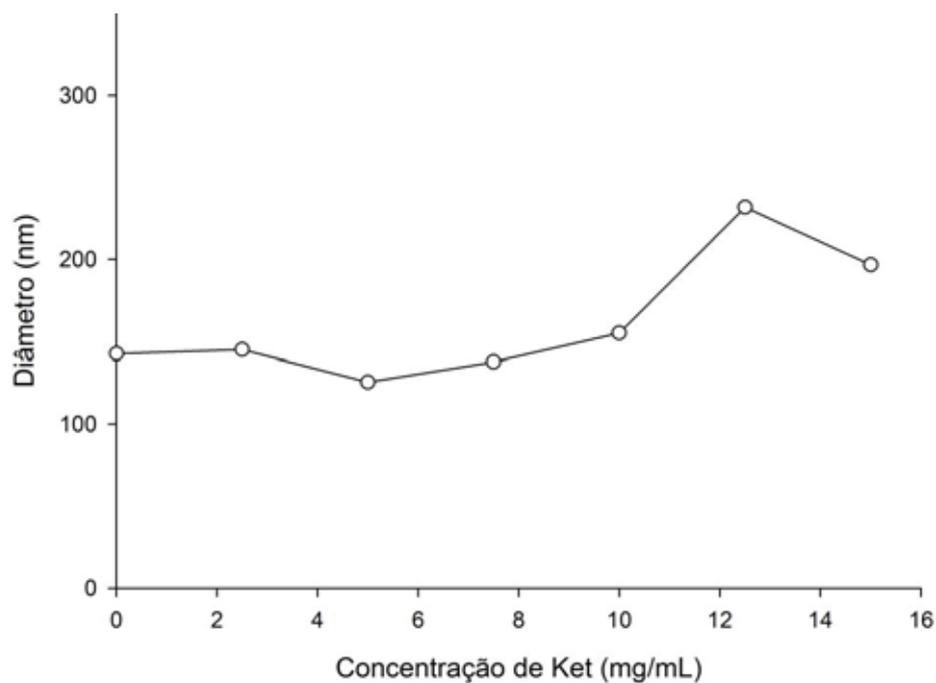


Figura 20. Diâmetro dos lipossomas nas diferentes concentrações do Ket no tempo zero.



Foi possível verificar que no tempo zero a encapsulação de diferentes concentrações de cetorolaco de trometamina aumenta o diâmetro das estruturas (Figura 20), demonstrando claramente que a presença do fármaco influencia a organização da bicamada de fosfolipídios. Esse fenômeno pode ser o resultado da encapsulação de uma fração do cetorolaco na região da interface bicamada lipídica-fase aquosa.

Dentro dos limites de até 7,5 mg/mL de Ket, ocorreu um aumento no diâmetro das estruturas em até aproximadamente 60 horas, com tendência a um valor máximo nos tempos finais da avaliação, revelando a estabilização hidrodinâmica das estruturas. Em contraposição, nas preparações contendo concentrações maiores de fármaco observou-se um aumento crescente dos diâmetros, indicando que nessas condições o fármaco interfere significativamente na estabilidade da estrutura física dos lipossomas. Entretanto, os limites de estabilidade física dos lipossomas com relação ao fármaco incorporado, é suficiente para a obtenção de efeito antiinflamatório local nos tecidos oculares.

3.8.2. Estudo de fotoestabilidade do cetorolaco de trometamina

As figuras 21 e 22 mostram o comportamento do cetorolaco de trometamina lipossomal e em Tris- HCl 10 mM pH 7,4 na ausência e presença de luz, respectivamente.

Figura 21. Leituras em espectrofotômetro na região UV-Vis para preparações do cetorolaco de trometamina em lipossomas (320 nm) e solução de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (323 nm) na ausência de luz.

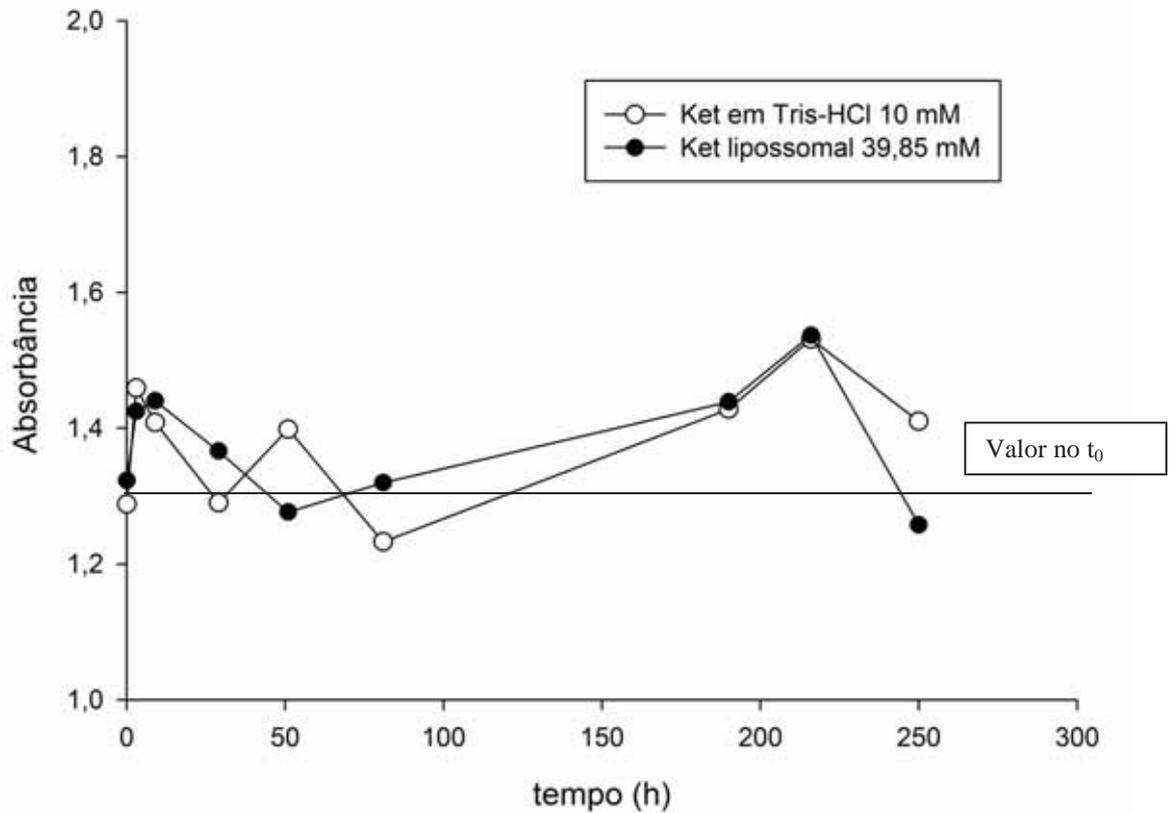
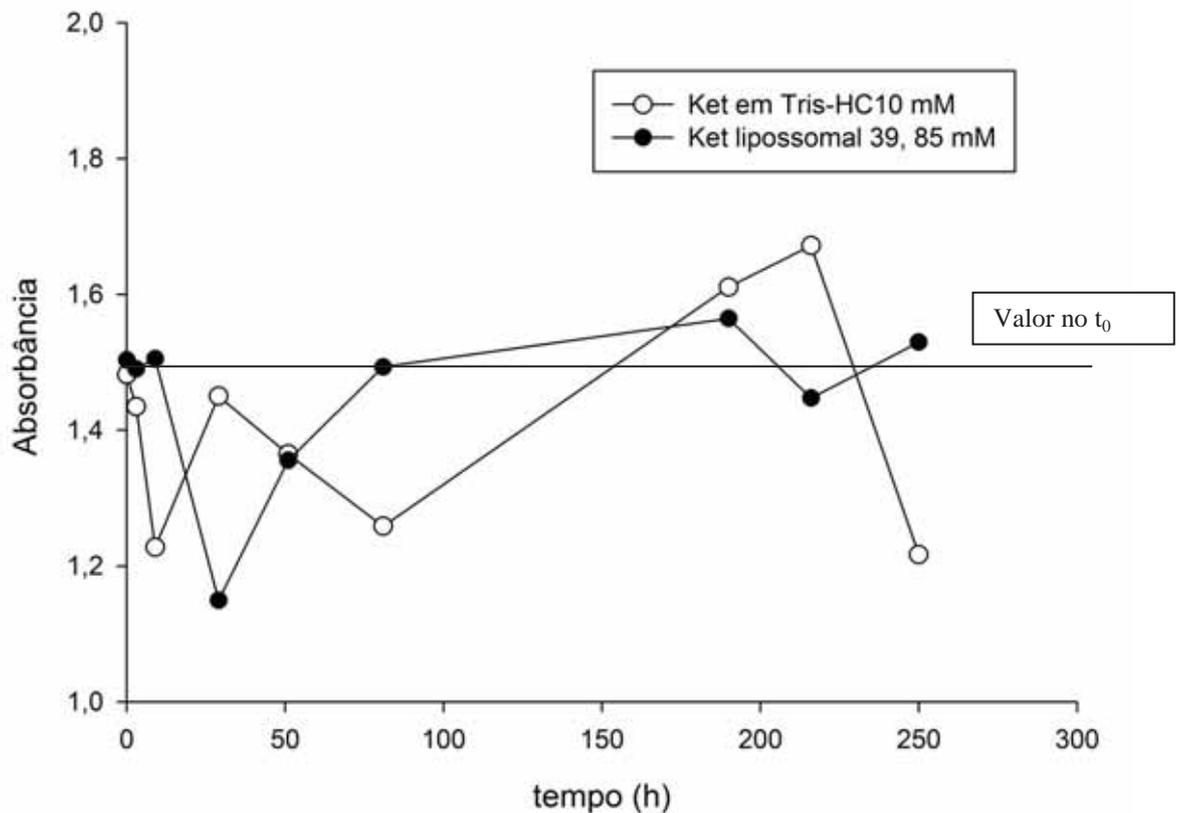


Figura 22. Leituras em espectrofotômetro na região UV-Vis para preparações do cetorolaco de trometamina em lipossomas (320 nm) e solução de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (323 nm) na presença de luz.



A variação da absorbância relativa ao conteúdo de cetorolaco contra o tempo de exposição mostrou-se muito pouco alterada nas amostras na ausência de luz, tanto para o fármaco em solução como para o lipossomal. Verificou-se uma tendência dos valores acima do quadrante relativo ao valor obtido antes da exposição (tempo zero).

Nas amostras que foram expostas a luz ultravioleta pode-se notar uma maior variação nas leituras estabelecidas. Junto a isso, os valores das absorbâncias apresentam a tendência de se localizar abaixo do quadrante relativo ao tempo zero, indicando uma possível alteração do cetorolaco em nossas condições

experimentais. Essa variação sugere uma pequena fotossensibilidade do fármaco, como descrito na farmacopéia americana (USP 32, 2009), entretanto não é possível inferir qualquer efeito protetor das estruturas dos lipossomas como um fotoprotetor do fármaco já que ambas as curvas apresentam o mesmo tipo padrão com relação à variação das absorbâncias.

4. CONCLUSÕES

- ✓ A formulação de lipossomas desenvolvida para a encapsulação do cetorolaco de trometamina demonstrou ser adequada.
- ✓ As medidas do raio hidrodinâmico mostraram que as preparações são de boa qualidade e homogêneas.
- ✓ As análises de SAXS mostraram que a encapsulação do cetorolaco de trometamina promoveu uma melhor estruturação do sistema, o que poderá levar a uma maior retenção do fármaco no interior do lipossoma.
- ✓ As formulações de lipossomas contendo cetorolaco de trometamina não apresentaram alterações relevantes, já que o valor de pH encontra-se dentro da faixa de segurança. Um declínio mais acentuado do pH poderia induzir modificações relativas nas forças eletrostáticas facilitando a aproximação dos lipossomas (pH entre 4,5 – 5,5).
- ✓ Os dados da eficiência de encapsulação mostram que existe uma interdependência entre a concentração de fármaco adicionada e a concentração de fármaco recuperada com melhor valor em torno da relação molar 1:1 entre o fármaco e a fosfatidilcolina.
- ✓ O estudo prévio de estabilidade mostrou que o aumento inicial da

absorbância pode estar relacionado com o aumento inicial dos diâmetros dos lipossomas, e que esse atinge um estado de equilíbrio hidrodinâmico a partir de 121 horas do monitoramento.

- ✓ A estabilidade das estruturas dos lipossomas mostrou-se dependente da concentração de cetorolaco, atingindo equilíbrio hidrodinâmico em até 7,5 mg/mL e desestabilizando as estruturas acima dessa concentração.
- ✓ Também pode-se concluir que o Ket possui estabilidade fotoquímica suficiente para uso clínico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, bioavailability & bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989. 554p.

ALMEIDA, D. R.P.; JOHNSON, D.; HOLLANDS, H.; SMALLMAN, D.; BAXTER, S.; ENG, K. T.; KRATKY, V.; HOVE, M. W.; SHARMA, S.; EL-DEFRAWY, S. Effect of prophylactic nonsteroidal antiinflammatory drugs on cystoid macular edema assessed using optical coherence tomography quantification of total macular volume after cataract surgery **Journal Cataract Refract Surg** ,v. 34, p. 64–69, 2008.

ANTHONY, D.; JASINSKI, D.M. Postoperative pain management: Morphine versus ketorolac. **J. Perianest. Nurs.**, v.17, n.1, p. 30-42, 2002.

ARAÚJO, J.; GONZALEZ, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Nanomedicines of ocular NSAIDs: safety on drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 263, 2009.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v.13, p. 238, 1965.

BANGHAM, A.D. **Preparation of liposomes and methods for measuring their permeabilities**. New York: Plenum Press. In: _____. Techniques in the life sciences.1977, p. B4/11, B420/25.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, M.B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da Arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n.2, 2007.

BEAULIEU, P. Non- opioid strategies for acute pain management. **Can. J. Anesth.**, v. 54, p. 481-485, 2007.

BOCHOT, A.; COUVREUR, P.; FATTAL, E. Intravitreal administration of antisense oligonucleotides: potential of liposomal delivery. **Prog Retin Eye Res.**, v.19, p.131-147, 2000.

BOCHOT, A.; FATTAL, E.; BOUTET, V.; DEVERRE, J.R.; JEANNY, J.C.; CHACUN, H.; COUVREUR. Intravitreal Delivery of Oligonucleotides by Sterically Stabilized Liposomes. **Invest. Ophtha. Vis. Sci.**, v.43, n.1, p. 253-259, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RE Nº 398**, de 12 de novembro de 2004.

CARDILLO, J. A.; PAGANELLI, F.; COSTA, R.A.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; LIMA-FILHO, A.A.S.; FARAH, M.E.; BELFORT-JÚNIOR, R.; KUPPERMMAN, D.B.; OLIVEIRA, A.G. Intravitreal bioerudível sustained-release triamcinolone microspheres systems (RETAAC): Safety and pharmacokinetic in the rabbit eye and a preliminary report of its potential usefulness for the treatment of diabetic macular edema. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 47, p.3886, 2006.

CEREDA, C.M.; BRUNETTO, G.B.; ARAUJO, D.R.; PAULA, E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Can. J. Anesth.**, v. 53, p. 1092-1097, 2006.

CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potencial. **Journal of controlled release**. v. 142, p. 299-311, 2010.

CHETONI, P.; ROSSI, S.; BURGALASSI, S.; MONTI, D.; MARIOTTI, S.;

SAETTONE, M.F. Comparison of liposome-encapsulated Acyclovir with Acyclovir ointment: ocular pharmacokinetics in rabbits. **Journal Of Ocular Pharmacology And Therapeutics**, v. 20, p. 169-177, 2004.

CHO, H.; WOLF, K.J.; WOLF, E.J. Management of ocular inflammation and pain following cataract surgery: focus on bromfenac ophthalmic solution. **Clinical Ophthalmology**. v.3, p. 199-210, 2009.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T. C.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M. V. Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, p.31-37, 2007.

COLTHURST, M.J.; WILLIAMS, R.L.; HISCOTT, P.S.; GRIERSON, I. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**, v. 21, p. 649-65, 2000.

CONSTABLE, I., S.; RAKOCZY, E. Emerging biological therapies for age-related macula degeneration. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 5, n.10, p 1373-1385, 2005.

COSTA, C.A.M.; MORAES, A.M. Encapsulation of 5-fluorouracil in liposomes for topical administration. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 25, n. 1, p. 53-61, 2003.

DEAMER, D.W.; BANGHAM, A.D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. **Biochim Biophys Acta**. v. 443, p. 629-634, 1976.

DEMIRCAN, S.; SAYIN, F.; BASCI, N. E.; ÜNLÜ, N.; KIR, S. Determination of Ketorolac Tromethamine in human eye samples by HPLC with photo Diode-Array detection. **Chromatographia Supplement**, v. 66, p. 135, 2007.

FARINELLI, J. **Avaliação, modificação e validação de metodologia para estudo de estabilidade de hidroquinona em creme.** 2008. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2008.

FATTAL, E.; BOCHOT, A. Antisense oligonucleotides, aptamer and SiRNA: promises for the treatment of ocular diseases. **Arch. Soc. Esp. Ophthalmol.**, v. 81, p.3-6, 2006.

FATTAL, E.; DE ROSA, G.; BOCHOT, A. Gel and solid matrix systems for the controlled delivery of drug carrier-associated nucleic acids. **Int. J. Pharm.** v.11, n. 277(1-2), p.25-30, 2004.

FAVERO, G.M.; BYDLOWSKI, S.P. Receptores de LDL: Alvo para drogas anti-neoplásicas. **Publ. UEPG Ci. Biol.** v.14, n.1, p. 53-58, 2008.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral.** 2 ed. Juiz de Fora, 2002.

FORMARIZ, T.P.; TERRUGGI, C.H.B.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G. Estratégias biotecnológicas para a liberação controlada de antígenos e adjuvantes em vacinas através de lipossomas. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, p. 619-626, 2006.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A. Lipossomas: propriedades físicos-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GILLIES, M.C.; SUTTER, F.K.P.; SIMPSON, J.M.; LARSSON, J.; ALI, H.; ZHU, M. Intravitreal Triamcinolone for Refractory Diabetic Macular Edema: Two-Year Results of a Double-Masked, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. **Ophthalmol.** v.

113, n.9, p. 1553-1558, 2006.

GLAVAS-DODOV, M.; FREDO- KUNBARADZI, E.; GORACINOVA, K.; SIMONOSKA, M.; CALIS, S.; TRAJKOVIC- JOLEVSKA, S.; HINCAL, A.A. Effects of lyophilization on the stability of lipomes containing 5-FU. **Internacional Journal of Pharmaceutics**. v. 291, p. 79-86, 2005.

GUPTA, S.K.; VELPANDIAN, T.; DHINGRA, N.; JAISWAL, J. Intravitreal pharmacokinetics of plain and liposome-entrapped fluconazole in rabbit eyes. **J. Ocular Pharmacol. Therap.**, v. 16, p.511-518, 2000.

HAISCH, A.; DUDA, G.N.; SCHROEDER, D.; GROGER, A.; GEBERT, C.; LEDER, K.; SITTINGER, M. The morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue-engineered human septal cartilage. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, v. 262, n.12, p. 993-7, 2005.

HAUNG, C. Studies on phosphatidylcholine vesicles, formation and physical characteristics. **Biochemistry**. v. 8, p.344-352, 1969.

HAMILTON, R.L.; GOERKE, J.; GUO, L.; WILLIAMS, M.C.; HAVEL, R.J.J. Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. **Lipids Res**. v. 21, p. 981-982, 1980.

HASHEM, F.M.; EL-GIZAWY, S.A.; OMAR, S.M.; ALI, M.F.; SHAKER, M.A. Effect of lyophilization on the characteristics and stability of melanin loaded liposomes. **Saudi Pharmaceutical Journal**., v.15, p.196-204, 2007.

HELDT, N.; GAUGER, M.; ZHAO, J.; SLACK, G.; PIETRYKA, J.; LI, Y. Characterization of a polymer-stabilized liposome system. **React Funct Polym**. v.48,

p.181- 191, 2001.

HON-VU Q. D.; WESTFIELD, K. C.; CHALKLEY, T. H.F. Ketorolac tromethamine LS 0.4% versus nepafenac 0.1% in patients having cataract surgery prospective randomized double-masked clinical trial **Journal Cataract Refract Surg**, v. 33, p. 1925–1929, 2007.

HOSNY, K. M. Ciprofloxacin as Ocular Liposomal Hydrogel. **AAPS PharmSciTech**. v. 11, n.1, p. 241-246, 2010.

HOSNY, K. M. Preparation and evaluation of thermosensitive liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation of ofloxacin. **AAPS PharmSciTech**. v. 10, n. 4, 2009.

IMURA, T.; OTAKE, K.; HASHIMOTO, S.; GOTOH, T.; YUSA, M.; YOKOYAMA, S.; SAKAI, H.; RATHMAN, J. F.; ABE, M. Preparation and physicochemical properties of various soybean, lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. **Colloids Surf B: Biointerfaces**. v.27, p. 133-144, 2002.

IOELE, G.; CIONE, E.; RISOLI, A.; GENCHI, G.; RAGNO, G. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 293, p. 251-260, 2005.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**., v. 21, n. 23, p.2475-2490, 2000.

JOUSMA, H.; TALSMA, H.; SPIES, F.; JOOSTEN, J.G.H.; JUNGINGER, H.E.; CROMMELIN, D.J.A. Characterization of liposomes. The influence of extrusion of

multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle sizing, particle size distribution and number of bilayers. **Int J Pharm.** v. 35, p. 263-274, 1987.

KAUR, I. P.; GARG, A.; SINGLA, A. K.; AGGARWAL, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269 , p. 1–14, 2004.

KATAYAMA, K.; KATO, Y.; ONISHI, H.; NAGAI, T.; MACHIDA, Y. Preparation of novel double liposomes using the glass-filter method. **Int J Pharm.** v. 248, p. 93-99, 2002.

KENO, K.; NAKAI, R.; MORIMOTO, K.; TAKAGISHI, T. Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1416, p. 239-250, 1999.

KHAN, D. R.; REZLER, E. M.; LAUER-FIELDS, J.; FIELDS, G. B. Effects of drug hydrophobicity on liposomal stability. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v.71, p. 3-7, 2008.

KIM, S.J.; FLACH, A.J.; JAMPOL; L.M. Nonsteroidal Anti-inflammatory drugs in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**. v. 55, n. 2, p. 108-133, 2010.

KUNTSCHE, J.; FREISLEBEN, I.; STEINIGER, F.; FAHR, A. Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 305-315, 2010.

LASIC, D.D. Chemical stability of lipids: hydrolysis. In: **Liposomes: from Physics to Applications**. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 37–38.

LASIC, D.D., **Liposomes in gene delivery**. Boca Raton: CRC Press, 1997. P. 67-

113.

LE BOURLAIS, C.A.; ACAR, L.; ZIA, R.; SADO, P.A.; NEEDHAM, T.; RHODES, L.; LAVERGE, R. Ophthalmic drug delivery systems - Recent advances. **Prog. Retin Eye Res.**, v. 17, p. 33-58, 1998.

LESIEUR, S.; GABRIELLE-MEDELONT, C.; PATERNOSTRE, M.T.; OLLIVON, M. Size analysis and stability study of lipid vesicles by high performance gel exclusion chromatography, turbidity and dynamic light scattering. **Anal Biochem.** v. 192, p. 334-343, 1991.

LIMA, E.M.; OLIVEIRA, A.G. Tissue tolerance of diclofenac sodium encapsulated in liposomes after intramuscular administration. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 28, p. 673-680, 2002.

MACA, S.M.; AMON, M.; FINDL, O.; KAHRAMAN, G.; SENBAUER, T.B. Efficacy and tolerability of preservative-free and preserved diclofenac and preserved ketorolac eyedrops after cataract surgery. **Am J Ophthalmol.** v. 20, n. 10, p. 1-8, 2010.

MEIRELES-TEIXEIRA, J.; MOYA, M.P.; CUPERMAN, J.; MENDONÇA, T.; NAKANAMI, C. Estudo comparativo da eficácia do uso de Prednisolona e Ceterolaco de Trometamina tópicos após cirurgia de estrabismo. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.66, p.427-429, 2003.

MEZEI, M.; MEISNER, D. Liposomes and nanoparticles as ocular drug delivery systems. In: P. Edman (Ed). **Biopharm Ocular Drug Delivery**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 91-104.

MORENO, A. H. **Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis**

contendo ceftazidima. 2007. 207 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2007.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly-(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties **J. Pharm. Sci.**, v. 89, n. 5, p. 614-26, 2000.

MULLER, M.; MACKEBEN, S.; MULLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of liposomes with encapsulated local anaesthetics. **Int J Pharm.** v. 274, p.139-148, 2004.

NANJAWADE, B.K.; MANVI, F.V.; MANJAPPA, A.S. In situ-forming hydrogels for sustained ophtalmic drug delivery. **Jounal of controlled release.** v. 122, p. 119-134, 2007.

NEW, R.R.C. Preparation of sterile liposomes. In:- **Liposomes** - a Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1990, p. 103.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segment of eye. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 52, p. 1-3, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; CARDILLO, J.A.; SCARPA, M.V.; WANCZINSKI, B.; SILVA-JÚNIOR, A.A. Estudos sobre a liberação controlada e vetorização de drogas através de lipossomas **Rev. Bras. Med.**, São Paulo, 62, n. 6, p. 238-244, 2005.

OLIVEIRA, A.G.; JORGE, R.; QUIRINO, L.S.; CARDILO, J.A.; WANCZINSKI, B.; BROCCHI, M. Liposome-encapsulated vancomycin for endophthalmitis treatment

inrabbit eyes. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, p. 515-515, 2004.

OLIVEIRA, A.G.; PAGANELLI, F.; CARDILLO, J.A.; LUCENA, D. R.; MELLO-JUNIOR, L.A.S.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; COSTA, R. A.; LIMA-FILHO, A.A.S.; BELFORT-JÚNIOR, R. A phase II randomized double-masked controlled trial of a single intraoperative Sub-Tenon's capsule triamcinolone acetonide and ciprofloxacin in a micro-particulate controlled release system (DuoCat) injection for cataract surgery. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 47, p. 685-685, 2006.

OLIVEIRA, A.G.; PAGANELLI, F.; CARDILLO, J.A.; MELLO-JÚNIOR, L.A.; SORIANO, E.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; SKAF, M.; COSTA, R.A.; LIMA-FILHO, A.A.S.; BELFORT-JÚNIOR, R. A. Single intraoperative Sub-Tenon's capsule triamcinolone acetonide and ciprofloxacin in a biodegradable micro-particulate controlled release system injection for cataract surgical technique. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, p. 797-797, 2005.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e cosméticas, novas perspectivas. **Infarma**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 20-23, 1992.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; LEITE, C.Q.F. Lipossomas: estratégia biotecnológica para liberação controlada e direcionamento de fármacos antimicrobianos. **Rev. Ciên. Farma.**, v. 18, p. 109-121, 1997.

OLIVEIRA, A.G.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; WANCZINSKI, B.; CARDILLO, J.A.; PAGANELLI, F.; COSTA, R.A.S.; SKAF, M.; SOUZA-FILHO, A.A.; BELFORT-JÚNIOR, R.; KUPPERMMAN, B.D. In vitro and in vivo release profile of a minimally invasive triamcinolone In vitro and in vivo release profile of a minimally invasive triamcinolone biodegradable controlled release microspheres system for intravitreal

use. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, p. 3533-3533, 2005.

OLIVEIRA, L. C. **Ciprofloxacino encapsulado em lipossomas revestidos com ácido poli-láctico co- glicólico ou vesículas em gel de copolímero de bloco PLURONIC® F127**. 2006. 130 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2006.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Adv. Drug. Del.Rev.**, v. 55, p. 329-347, 2003.

PARULEKAR, A.S.M.; DAHANUKAR, T.U.M. A multiple dose comparison of ketorolaco tromethamine with ibuprofen for analgesia activity. **J. Postgrad. Med.** n. 39, p. 74-76, 1993.

PICK, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. **Arch Biochem Biophys.** v. 212, p. 186-194, 1981.

PUISIEUX, F. Les liposomes. **Ann. Pharm. Fr.**, v. 41, n.1, p. 3-13, 1983.

RIBEIRO-DE-ARAÚJO, D.; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A.F.A.; ENEIDA-DE- PAULA, T.S.A. Drug-delivery systems for local anesthetics: therapeutic applications. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 53, n. 5, p. 663-671, 2003.

ROOKS, W.H.; MALONEY, P.J.; SHOTT, L.D.; SCHULER, M.E.; SEVELIUS, H.; STROSBURG, A.M.; TANENBAUM, L.; TOMOLONIS, A.J.; WALLACH, M.B.; WATERBURY, D. The analgesic and anti-inflammatory profile of ketorolac and its tromethamine salt. **Drugs Exp Clin Res.** v.11, n. 8, p. 479-492, 1985.

SAHOO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery **Drug Discovery Today** , v. 13, n. 3/4, p. 144-151, 2008.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M.A. R. B. Liposomes: has the magic bullet hit the target?. **Quím. Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1181-1185, 2002.

SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G.; CUCCOVIA, I.M. Estrutura e propriedades físico-químicas de lipossomas. **Infarma**, v.7, n.1/2, p. 4- 7, 1998.

SCHAEFFER, H.E.; KROHN, D.L. Liposomes in topical drug delivery. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 22, p. 220-227, 1982.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, p. 99-106, 2002.

SCHIEREN, H.; RUDOLPH, S.; FINKELSTEIN, M.; COLEMAN, P.; WEISSMANN, G. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses. **Biochim Biophys Acta.**, v. 542, n. 1, p.137-153, 1978.

SCHÖLER, N.; ZIMMERMANN, E.; KATZFEY, U.; HAHN, H.; MÜLLER, R. H.; LIESENFELD, O. Preserved solid lipid nanoparticles (SLN) at low concentrations do cause neither direct nor indirect cytotoxic effects in peritoneal macrophages. **Int. J. Pharm.** v. 196, p. 235-239, 2000.

SILVA-JÚNIOR, A.A.; CARDILO, J.A.; PAGANELLI, F.; LIMA-FILHO, A.A.S.; BELFORT-JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de liberação de drogas para

administração ocular - Parte I. Arq. Bras.Oftalmol., 2006.

SZOKA, F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposome with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Biochemistry**. v. 75, p. 4194-4198, 1978.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. Drug information for the health care professional. 22 nd ed. Rockville, 2002.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. The United States pharmacopeia. 32 nd ed. Rockville, 2009.

TURSILLI, R.; CASOLARI, A.; IANNUCELLI, V.; SCALIA, S. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation of lipospheres. **Journal of Pharmaceutical an Biomedical Analysis**. v. 40, p. 910-914, 2006.

URBAN, M.C.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea de acetato de dexametasona**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a Review. **Pharm. Acta Helvetica**, v. 70, p. 95-111, 1995.

VERT, M.; SCHWACH, R.; ENGEL, R.; COUDANE, J. Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers? **J. Control. Release**. v. 53, n. 1-3, p. 85-92, 1998.

VIDAL, M. Methodes de caracterization des liposomes. In: DELATRE, J.,

COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPPOT, J.R.; SCHUBER, F. (Eds). **Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques**. Paris: INSERM, 1993. p. 69-86.

WAFAPOOR, H.; MCCLUSKEY, J. Intravitreal Ketorolac as a Treatment of Diabetic and Non-Diabetic Macular Edema, 2006.
http://www.universovisual.com.br/publisher/preview.php?edicao=0706&id_mat=1169.
Acessado em 14/10/2007.

WALTERS, T.; RAIZMAN, M.; ERNEST, P.; GAYTON, J.; LEHMANN, R. In vivo pharmacokinetics and in vitro pharmacodynamics of nepafenac, amfenac, ketorolac, and bromfenac **Journal Cataract Refract Surg**, v. 33, p. 1539–1545, 2007.

WEN, A.; CHOI, M.; KIM, D. Formulation of liposome for topical delivery of Arbutin. **Arch. Pharm. Res.**, v. 29, p.1187-1192, 2006.

WITTPENN, J. R.; SILVERSTEIN, S.; HEIER, J.; KENYON, K. R.; HUNKELER, J. D.; EARL, M. A Randomized, Masked Comparison of Topical Ketorolac 0.4% Plus Steroid vs Steroid Alone in Low-Risk Cataract Surgery Patients **American Journal of Ophthalmology**, v. 146, n. 4, p. 554-560, 2008.

WOODLE, M.C. Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 32, n.1-2, p. 139-152, 1998.