



***MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO
CETOROLACO COMO ESTRATÉGIA TECNOLÓGICA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA INTRA-OCULAR.***

Doutorando: Gustavo Rossanezi

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

**ARARAQUARA - SP
- 2012-**



***MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO
CETOROLACO COMO ESTRATÉGIA TECNOLÓGICA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA INTRA-OCULAR.***

GUSTAVO ROSSANEZI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

**ARARAQUARA - SP
- 2012-**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Rossanezi, Gustavo

R823m Micropartículas poliméricas biodegradáveis contendo cetorolaco
como estratégia tecnológica para liberação controlada intraocular /
Gustavo Rossanezi. – Araraquara, 2012
115 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

1. Micropartículas. 2. PLGA. 3. Cetorolaco. 4. Spray drying. I.
Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS acima de tudo, por me proporcionar estes anos de aprendizado, por me dar força para vencer os obstáculos, por me guiar pelos caminhos certos e por sempre me amparar nos momentos difíceis.

Aos meus pais Toninho e Sônia pela criação e modelo exemplares que me deram durante toda vida, por fazerem o possível e impossível para me proporcionar as melhores condições para o meu desenvolvimento como profissional e como ser humano. AMO VOCÊS DEMAIS!!!!

A minha namorada Marina por escolher estar ao meu lado especialmente durante esse período, por ter paciência nos finais de semana de stress pré-relatórios, qualificação e defesa, por ser alegre e divertida, e pelo carinho comigo. AMO VOCÊ CORAÇÃO!!!!

A toda minha família pela participação marcante em muitos momentos especiais durante o meu crescimento e desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira por sua orientação, ensinamentos, amizade, incentivo e principalmente paciência durante esta etapa. MUITO OBRIGADO!!

Ao Prof. Dr. Arnóbio Antonio da Silva Junior pela amizade, companheirismo e ensinamentos, que contribuíram de forma ímpar para a minha formação específica. VALEU MEU BROTHER!!

Aos professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos em especial aos Professores Ana Dóris de Castro, Maria Palmira D. Gremião, Raul

C. Evangelista e Marlus Chorilli pela convivência diária, conversas e ensinamentos de todos esses anos.

Aos mestrandos, doutorandos e estagiários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFAR, em especial a Priscileila, Ana Luiza, Flávio, Flávia, Kelly, Marcia, Andreia, Beatriz, Fabíola, Jéssica, Roberta, Liliam, Karissa, Cristiane, Vanessa, Cristina, Gisela, Fer Carbinato, Fer Kolenyak, Charlene, Juliana pelo convívio diário, encontros, churrascos, barzinhos e todos o momentos de trabalho e descontração que passamos juntos!! VALEU GALERA!!

A Abdal, Gustavinho, Diego, Deivide, Léo, PC, Pateta, Yuri, Niltão, Rodolfinho, Puim, Peludo e Orégano, moradores, ex-moradores e agregados da Rep-Sal, pessoas com quem eu convivo há vários anos, e que são extremamente importantes para mim!! Caaaaaarrrrrrrlooooouuuuuusssss

Aos técnicos do Departamento de Fármacos e Medicamentos em especial a Margareth, Fátima e Natália, pelos inúmeros auxílios, socorros e bate-papos na minha jornada.

Aos funcionários da sessão de Pós-graduação, bem como a todos os funcionários da FCFAR, pelo ótimo tratamento que recebi em todos o setores onde passei.

Agradeço especialmente a FAPESP e CNPq pela concessão das bolsas de estudo durante a realização deste trabalho.

A CAPES, FAPESP E CNPq pelo suporte financeiro de todas as etapas do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xiv
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
I-INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
II- JUSTIFICATIVA.....	16
III-OBJETIVOS.....	17
IV-MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 – Material.....	18
4.1.1. Matérias Primas e Reagentes.....	18
4.1.2. Equipamentos e Acessórios.....	18
4.2- Métodos.....	18
4.2.1. Obtenção das micropartículas de PLGA contendo CT.....	18
4.2.2- Caracterização físico-química das micropartículas.....	19
4.2.2.1. Morfologia.....	19
4.2.2.2. Análise da distribuição do diâmetro das micropartícula.....	19
4.2.2.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	20
4.2.2.4. Análise Térmica.....	20
4.2.2.5. Difração de Raios X (DRX)	21
4.2.2.6. Análise quantitativa do fármaco nas micropartículas.....	21
4.2.3. Estudo da liberação in vitro do CETO a partir das micropartículas.....	21

4.2.4. Exposição das micropartículas ao processo de esterilização por radiação gama.....	22
4.2.5. Estudo de biodisponibilidade do CETO a partir das micropartículas usando coelhos albinos.....	22
4.2.5.1. Considerações éticas em relação aos animais experimentais...	23
4.2.6. Análise estatística.....	23
V- RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1- Obtenção das micropartículas de PLGA contendo CT.....	25
5.2- Caracterização das micropartículas de PLGA contendo CT	25
5.2.1- Morfologia.....	25
5.2.2- Análise de distribuição do diâmetro das micropartículas.....	29
5.2.3-Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IR)..	33
5.2.4 – Análise térmica.....	38
5.2.5- Difração de raios-X (DRX).....	54
5.3 – Análise quantitativa do CT nas micropartículas.....	59
5.4- Estudo de liberação in vitro do CT a partir das micropartículas.	60
5.5-Exposição das micropartículas ao processo de esterilização por radiação gama.....	77
5.6- Estabilidade das micropartículas de PLGA contendo CT pós-irradiação.....	78
5.6.1- Morfologia	78
5.6.2- Análise de distribuição do diâmetro das micropartículas.....	80
5.6.3- Espectroscopia na região do infravermelho (IR).....	83
5.6.4- Análise térmica.....	85
5.6.5- Difração de raios-X (DRX).....	91

5.6.6- Determinação da eficiência de encapsulação do CT nas micropartículas de PLGA após a irradiação por raios gama.....	93
5.6.7- Estudo de liberação in vitro do CT a partir das micropartículas.....	94
5.7. Estudo de biodisponibilidade do CT a partir das micropartículas usando coelhos albinos.....	97
VI-CONCLUSÕES.....	104
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO CT.....	08
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO PLGA.	12
FIGURA 3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO PÓ DO CETOROLACO SOB AUMENTO DE 500X.....	26
FIGURA 4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO PÓ DO CETOROLACO SOB AUMENTO DE 5000X.	26
FIGURA 5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO SOB AUMENTO DE 5000X.....	27
FIGURA 6 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO SOB AUMENTO DE 5000X.....	27
FIGURA 7 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE CETOROLACO SOB AUMENTO DE 5000X.....	28
FIGURA 8 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE CETOROLACO SOB AUMENTO DE 1000X.....	29
FIGURA 9 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO.....	30
FIGURA 10 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO.	31
FIGURA 11 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE CETOROLACO.	31
FIGURA 12 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE CETOROLACO.	32

FIGURA 13 - EFEITO DA RAZÃO CETOROLACO/PLGA SOBRE O DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROPARTÍCULAS.	33
FIGURA 14 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO CETOROLACO. ..	34
FIGURA 15 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PLGA 85:15.	35
FIGURA 16 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MF15) E MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MP15).....	35
FIGURA 17 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MF25) E MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MP25).....	36
FIGURA 18 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MF35) E MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MP35).....	36
FIGURA 19 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MF50) E MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MP50).....	37
FIGURA 20 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO CETOROLACO, PLGA, MISTURA FÍSICA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MF25) E MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MP25) SOBREPOSTAS.	38
FIGURA 21 - CURVA DE DSC DO CETOROLACO OBTIDA EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1.....	39
FIGURA 22 - CURVA DE DSC DO PLGA OBTIDA EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1.....	39
FIGURA 23 - CURVAS DE DSC DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MF15) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MP15)	

OBTIDAS EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1.	40
FIGURA 24 - CURVAS DE DSC DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MF25) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MP25) OBTIDAS EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1.	41
FIGURA 25 - CURVAS DE DSC DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MF35) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MP35) OBTIDAS EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1.	42
FIGURA 26 - CURVAS DE DSC DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MF50) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MP50) OBTIDAS EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1.	43
FIGURA 27 - CORRELAÇÃO ENTRE VALORES DE ENTALPIA E AS RAZÕES DE CONCENTRAÇÃO DE CETOROLACO/PLGA NOS EVENTOS DE TRANSIÇÃO VÍTREA DO PLGA (A), FUSÃO DO CETOROLACO (B) E DEGRADAÇÃO DO CETOROLACO-PLGA (C) PARA AS AMOSTRAS DE MISTURAS FÍSICAS (●) E MICROPARTÍCULAS (○).	43
FIGURA 28 - CURVAS DE DSC DO CETOROLACO, DO PLGA, DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MF35) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MP35), OBTIDAS EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1.	45
FIGURA 29 - CURVAS DE TG E DTG DO CETOROLACO OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	46

FIGURA 30 - CURVAS DE TG E DTG DO PLGA OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	47
FIGURA 31 - CURVAS DE TG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MF15) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MP15) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	48
FIGURA 32 - CURVAS DE DTG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MF15) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO (MP15) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	48
FIGURA 33 - CURVAS DE TG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MF25) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MP25) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	49
FIGURA 34 - CURVAS DE DTG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MF25) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MP25) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	49
FIGURA 35 - CURVAS DE TG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MF35) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MP35) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	50
FIGURA 36 - CURVAS DE DTG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MF35) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE CETOROLACO (MP35)	

OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	50
FIGURA 37 - CURVAS DE TG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MF50) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MP50) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	51
FIGURA 38 - CURVAS DE DTG DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MF50) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE CETOROLACO (MP50) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN-1).	52
FIGURA 39 - CURVAS DE TG DO CETOROLACO, DO PLGA, DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MF25) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MP25) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1).	53
FIGURA 40 - CURVAS DE DTG DO CETOROLACO, DO PLGA, DA MISTURA FÍSICA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MF25) E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO (MP25) OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN-1).	54
FIGURA 41 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DAS FORMAS I(A), II(B), III(C) E IV(D) DO CETOROLACO OBTIDOS EM 2θ 5-30° (SOHN; SEO, 2004).....	55
FIGURA 42 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DO CETOROLACO OBTIDO EM 2θ 4-50°.....	56
FIGURA 43 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DO PLGA 85:15 OBTIDO EM 2θ 4-50°.....	57
FIGURA 44 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DAS AMOSTRAS CETOROLACO, PLGA, MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) E 50% (MP50) DE CETOROLACO SOBREPOSTOS, OBTIDOS EM 2θ 4-50°.....	58

FIGURA 45 - CURVA ANALÍTICA DO CETOROLACO EM ÁCIDO ACÉTICO 0,1 MOL.L-1...	59
FIGURA 46 - CURVA ANALÍTICA DO CETOROLACO EM TAMPÃO TRIS-HCL 10 MM PH=7,2.	61
FIGURA 47 - PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE FÁRMACO (MP15) EM TAMPÃO TRIS 10MM PH 7,2.	61
FIGURA 48 - PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE FÁRMACO (MP25) EM TAMPÃO TRIS 10MM PH 7,2.	62
FIGURA 49 - PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE FÁRMACO (MP35) EM TAMPÃO TRIS 10MM PH 7,2.	63
FIGURA 50 - PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE FÁRMACO (MP50) EM TAMPÃO TRIS 10MM PH 7,2.	63
FIGURA 51 - LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO LIVRE E DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) E 50% (MP50) DE FÁRMACO EM TAMPÃO TRIS 10MM PH7,2 SOBREPOSTOS. ..	64
FIGURA 52 - PLOT DE HIGUCHI PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) E 50% (MP50) DE FÁRMACO EM TAMPÃO TRIS 10MM PH7,2 SOBREPOSTOS.	66
FIGURA 53 - PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE FÁRMACO (MP15) EM TAMPÃO FOSFATO 10MM PH7,2.	70

FIGURA 54 - PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE FÁRMACO (MP25) EM TAMPÃO FOSFATO 10MM PH7,2.	70
FIGURA 55 - PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 35% DE FÁRMACO (MP35) EM TAMPÃO FOSFATO 10MM PH7,2.	71
FIGURA 56 - PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 50% DE FÁRMACO (MP50) EM TAMPÃO FOSFATO 10MM PH7,2.	72
FIGURA 57 - GRÁFICO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CETOROLACO LIVRE E DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) E 50% (MP50) DE FÁRMACO EM TAMPÃO FOSFATO 10MM PH7,2 SOBREPOSTOS.	73
FIGURA 58 - PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA UTILIZANDO COMO MEIO RECEPTOR TAMPÃO TRIS (A) E TAMPÃO FOSFATO (B).	73
FIGURA 59 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO DE CETOROLACO/PLGA NA LIBERAÇÃO DO CETOROLACO NOS TEMPOS DE 4, 24, 72 E 168 HORAS DE EXPERIMENTO.	74
FIGURA 60 - PLOT DE HIGUCHI PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) E 50% (MP50) DE FÁRMACO EM TAMPÃO FOSFATO 10MM PH 7,2.	75
FIGURA 61 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 10KGY SOB AUMENTO DE 1000X.	78

FIGURA 62 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 25KGY SOB AUMENTO DE 1000X.	79
FIGURA 63 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 10KGY SOB AUMENTO DE 1500X.	79
FIGURA 64 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 25KGY SOB AUMENTO DE 3000X.	80
FIGURA 65 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 10KGY (MP15-10KGY).	81
FIGURA 66 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 25KGY (MP15-25KGY).	81
FIGURA 67 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 10KGY (MP25-10KGY).	82
FIGURA 68 - FREQUÊNCIA E FREQUÊNCIA ACUMULADA DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NA DOSE DE 25KGY (MP25-25KGY).	83
FIGURA 69 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRATERMELHO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP15), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP15-10KGY) E 25KGY (MP15-25KGY) SOBREPOSTOS.	84

FIGURA 70 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP25), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP25-10KGY) E 25KGY (MP25-25KGY) SOBREPOSTOS.	84
FIGURA 71 - CURVAS DE DSC DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP15), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP15-10KGY) E 25KGY (MP15-25KGY) SOBREPOSTOS OBTIDAS EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE AQUECIMENTO 10 °C.MIN ⁻¹ ..	86
FIGURA 72 - CURVAS DE DSC DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP25), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP25-10KGY) E 25KGY (MP25-25KGY) SOBREPOSTOS OBTIDAS EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂ A 50ML/MIN E RAZÃO DE A AQUECIMENTO 10 °C.MIN ⁻¹	86
FIGURA 73 - CURVAS DE TG DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP15), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP15-10KGY) E 25KGY (MP15-25KGY) SOBREPOSTOS OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN ⁻¹ E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN ⁻¹).	88
FIGURA 74 - CURVAS DE DTG DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP15), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP15-10KGY) E 25KGY (MP15-25KGY) SOBREPOSTOS OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN ⁻¹ E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN ⁻¹).	89
FIGURA 75 - CURVAS DE TG DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP25), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS	

DOSES DE 10KGY (MP25-10KGY) E 25KGY (MP25-25KGY) SOBREPOSTOS OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN⁻¹).

..... 89

FIGURA 76 - CURVAS DE DTG DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP25), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP25-10KGY) E 25KGY (MP25-25KGY) SOBREPOSTOS OBTIDAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO (50ML.MIN-1 E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C.MIN⁻¹).

..... 90

FIGURA 77 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP15), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES 10KGY(MP15-10KGY) E 25KGY(MP15-25KGY) SOBREPOSTOS..... 92

FIGURA 78 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE CETOROLACO NÃO IRRADIADAS (MP25), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES 10KGY (MP25-10KGY) E 25KGY (MP25-25KGY) SOBREPOSTOS..... 92

FIGURA 79 - PERFIS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 15% DE FÁRMACO NÃO IRRADIADAS (MP15), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP15-10KGY) E 25KG(MP15-25KGY) SOBREPOSTOS.....94

FIGURA 80 - PERFIS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 25% DE FÁRMACO NÃO IRRADIADAS (MP25), E IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA NAS DOSES DE 10KGY (MP25-10KGY) E 25KGY (MP25-25KGY) SOBREPOSTOS. 95

FIGURA 81 - CURVA ANALÍTICA DO CETOROLACO EM ACETONITRILA: SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 2% PH 4,3 (3:7).	97
FIGURA 82 - FARMACOCINÉTICA OCULAR DO CETOROLACO EM SOLUÇÃO AQUOSA ADMINISTRADO EM DOSE ÚNICA POR VIA INTRAVITREAL.....	98
FIGURA 83 - FARMACOCINÉTICA OCULAR DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA ADMINISTRADAS EM DOSE ÚNICA POR VIA INTRAVITREAL.	99
FIGURA 84 - SOBREPOSIÇÃO DOS PERFIS FARMACOCINÉTICOS DO CETOROLACO EM SOLUÇÃO AQUOSA E DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO CETOROLACO (*P<0,05 MANN-WHITNEY).....	99
FIGURA 85 - REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE ELIMINAÇÃO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA.	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS E RAZÃO DA PROPORÇÃO DE CETOROLACO/PLGA.	25
TABELA 2 - VALORES DE ENTALPIA ANALISADOS POR DSC DURANTE OS EVENTOS TÉRMICOS DAS MISTURAS FÍSICAS E MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO CETOROLACO.	45
TABELA 3 - VALORES DE PERDA DE MASSA DURANTE OS EVENTOS DESCRITOS NAS ANALISES DE TG.....	52
TABELA 4 - PICOS DE CRISTALINIDADE COM MAIORES INTENSIDADES DOS POLIMORFOS DO CETOROLACO.....	56
TABELA 5 - DADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA DO CETOROLACO CONTIDO NAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA.....	60
TABELA 6 - PARÂMETROS DE AJUSTE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS DOS MODELOS TEÓRICOS DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CT A PARTIR DAS MPS.	68
TABELA 7 - PARÂMETROS DE AJUSTE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS DOS MODELOS TEÓRICOS DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS UTILIZANDO TAMPÃO FOSFATO 10MM PH 7,2 COMO MEIO RECEPTOR.....	76
TABELA 8 - VALORES DE ENTALPIA RELACIONADOS AOS EVENTOS TÉRMICOS DAS MICROPARTÍCULAS ANALISADOS POR DSC.	87
TABELA 9 - VALORES DE PERDA DE MASSA RELACIONADOS AOS EVENTOS DESCRITOS NAS ANALISES DE TG.....	91
TABELA 10 - RESULTADOS DO DOSEAMENTO DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO CETOROLACO.	93

TABELA 11 - PARÂMETROS DE AJUSTE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS DOS MODELOS TEÓRICOS DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO CETOROLACO A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS DE PLGA UTILIZANDO TAMPÃO FOSFATO 10MM PH 7,2 COMO MEIO RECEPTOR.....	96
TABELA 12 - PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DO CETOROLACO APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVITREAL DA FORMULAÇÃO CONTROLE (SOLUÇÃO AQUOSA DE CETOROLACO) E MICROPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO CETOROLACO.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

AIES - Antiinflamatório esteróides

AINES - Antiinflamatório não esteróides

ASC₀₋₃₆₀ - Área sob a curva em 360 horas

ASC_{0-∞} - Área sob a curva no tempo infinito

Cl - Clearance local

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

C_{max} - Concentração Máxima Atingida

COX -Cicloxigenase

CT - Cetorolaco

DP - Desvio Padrão da Média

DRX - Difração de Raios –X

DSC - Calorimetria Diferencial Exploratória

DTG - Termogravimetria Derivada

FDA - Foods and Drugs Administration

IV - Infravermelho

k_{el} - Constante de eliminação

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MF15 - Mistura física contendo 15% de cetorolaco

MF25 - Mistura física contendo 25% de cetorolaco

MF35 - Mistura física contendo 35% de cetorolaco

MF50 - Mistura física contendo 50% de cetorolaco

MP15 - Micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco

MP25 - Micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco

MP35 - Micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco

MP50 - Micropartículas de PLGA contendo 50% de cetorolaco

PCS - Espectroscopia de Correlação de Prótons

PIO - Pressão intra-ocular

PLGA - Ácido polilático-co-glicólico

$t_{1/2}$ - Tempo de meia vida

TG - Termogravimetria

Tmax - Tempo em que ocorreu a Concentração Máxima

VD - Volume de Distribuição

VEGf - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

RESUMO

Neste projeto, em continuidade a projetos anteriores, temos como objetivo desenvolver micropartículas biodegradáveis contendo o anti-inflamatório não esteróide ceterolaco (CT) para administração intra-ocular. As micropartículas foram baseadas na estrutura matricial, na qual o fármaco está homoganeamente distribuído na matriz polimérica seca. A técnica de obtenção utilizada no estudo foi a secagem por o *Spray drying*, a qual pode proporcionar partículas homogêneas e com dimensões apropriadas para a utilização pretendida. Foram obtidas micropartículas com várias proporções fármaco:polímero para evidenciar possíveis interações entre esses componentes. Estudos anteriores permitiram-nos definir que o polímero PLGA 85:15, é o polímero mais apropriado ao tempo de liberação necessário ao uso oftalmológico do ceterolaco. As condições iniciais de operação do Spray drier foram estabelecidas em estudos anteriores em nosso grupo. As micropartículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, pela determinação dos diâmetros médios, por Espectroscopia de Infravermelho (IV), por Análise Térmica (DSC, TG/DTG, DTA) e por Difração de Raios X (DRX). A análise quantitativa do fármaco microencapsulado ou não foi realizada por Espectroscopia UV-Vis. Finalmente, a eficiência terapêutica será verificada *in vivo* através de estudos de biodisponibilidade em coelhos albinos, conforme protocolos estabelecidos juntamente com as equipes de oftalmologia do Hospital de Olhos de Araraquara e do Departamento de oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo-Unifesp.

A metodologia proposta mostrou-se eficiente na preparação de micropartículas de PLGA contendo CT nas concentrações de 15%, 25%, 35% e 50%, entretanto a partir da concentração de 35% as partículas não assumem forma definida, enquanto em concentrações menores a forma predominante é esférica com tendência à aglomeração.

O diâmetro médio das partículas cresce conforme a proporção de CT na amostra é aumentada. As análises de IR, análise térmica das micropartículas apresentam picos e eventos característicos dos constituintes que variam de acordo com quantidade destes em cada amostra. As análises de DRX mostram que a o CT utilizado como matéria-prima apresenta forma cristalina I do CT e nas micropartículas ocorre a transformação de parte do CT para a forma cristalina II. No ensaio de doseamento todas as amostras apresentaram eficiência de encapsulação acima de 90%, confirmando a eficácia da metodologia de produção. Todas as amostras apresentaram aumento no tempo de liberação do CT encapsulado quando comparadas ao fármaco livre, entretanto todas elas liberam mais de 60% de CT nas primeiras 24 horas e essa liberação ocorre predominantemente pelo mecanismo de difusão baseado na lei de Fick. O perfil de biodisponibilidade in vivo apresentado pelas micropartículas confirmou a capacidade do sistema microparticulado de aumentar o tempo de liberação do CT quando comparado com uma solução aquosa na mesma concentração. Também devido à ligação do CT com a matriz polimérica o valor da constante de eliminação e outros parâmetros farmacocinéticos foram consideravelmente melhores no grupo tratado com micropartículas.

ABSTRACT

In this project, continuing the previous projects, we aim to develop biodegradable microparticles containing the NSAID ketorolac (CT) for intraocular administration. The microparticles were based on the matrix structure, in which the drug is homogeneously distributed in the dried polymer matrix. The technique of obtaining used in this study was dried by the spray drying, which can provide the particles with homogeneous dimensions appropriate for the intended use. Microparticles were obtained with various ratios drug: polymer for evidence of possible interactions between these components. Previous studies have enabled us to establish that the PLGA 85:15 polymer, the polymer is more appropriate to the release time necessary for the ophthalmic use of ketorolac. The initial conditions of operation of the spray drier were established in previous studies in our group. The microparticles were characterized by scanning electron microscopy, by determining the average diameter by infrared spectroscopy (IR) for Thermal Analysis (DSC, TG / DTG, DTA) and X-Ray Diffraction (XRD). Quantitative analysis or microencapsulated drug has not been performed by UV-Vis spectroscopy. Finally, the therapeutic effectiveness is verified through in vivo bioavailability studies in rabbits, according to established protocols with the teams of Ophthalmology, Hospital de Olhos de Araraquara and Department of Ophthalmology, Federal University of São Paulo-UNIFESP.

The proposed method was effective in the preparation of PLGA microparticles containing CT in concentrations of 15%, 25%, 35% and 50%, but at concentrations of 35% particles do not assume a defined shape, while at lower concentrations than the predominant form is spherical with a tendency to agglomerate. The average particle diameter increases as the proportion of CT in the sample is increased. The IR analyses, thermal analysis of the microparticles have peaks and events characteristic of the

constituents vary with the amount of each sample. The XRD showed that the CT used to produce presents a crystalline form I and microparticles presents part of the CT in crystalline form II. In the assay of test samples were all encapsulation efficiency above 90%, confirming the efficacy of the method of production. All samples showed an increase in the time of release of encapsulated CT compared to the free drug, but all they release more than 60% of CT in the first 24 hours and this release occurs predominantly by the mechanism of diffusion based on Fick's law. The bioavailability profiles presented by the microparticles *in vivo* confirm the capacity of the microparticulate system to increase the release time CT in comparison with an aqueous solution at the same concentration. Also due to binding of the polymer matrix CT with the constant value for disposal and other pharmacokinetic parameters were significantly better in the group treated with the microparticles.

I-INTRODUÇÃO

Desde 1997 o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira vem desenvolvendo sistemas de liberação controlada destinados à aplicação em oftalmologia. A partir do ano de 2002 uma sub-linha de pesquisa foi iniciada, o desenvolvimento de sistemas microparticulados baseados em copolímeros biodegradáveis derivados de ácido láctico e ácido glicólico, obtidos pela técnica de Spray drying. Durante os últimos anos foram desenvolvidos sistemas microparticulados para veiculação de diversos tipos de fármacos, especialmente anti-inflamatórios e antibióticos para administração intraocular no período pós-operatório de cirurgias oftálmicas, com o objetivo de substituir a utilização de colírios de seis a oito vezes por dia, por uma única administração intraocular ou subconjuntival de micropartículas.

Dentre os fármacos anti-inflamatórios utilizados no desenvolvimento destes sistemas os anti-inflamatórios esteroidais foram os primeiros a ser testados em função da grande aplicação na área. Entretanto, estudos posteriores revelaram a que a presença destes fármacos no globo ocular durante períodos de tempo estendidos promoviam aumento da pressão intraocular, além de acarretarem problemas relacionados com a cicatrização.

Com base na experiência adquirida nestes anos de pesquisa iniciou-se o desenvolvimento de sistemas microparticulados contendo anti-inflamatórios não esteroidais como o ceterolaco, também utilizado na terapia convencional na forma de sal de trometamina (Acular[®]) no tratamento e prevenção de inflamações nos segmentos anterior e posterior do olho e também no tratamento de conjuntivite alérgica.

Em trabalhos anteriores verificou-se que a dispersão de ceterolaco de trometamina em matrizes poliméricas hidrofóbicas não ocorria de forma homogênea, e conseqüentemente não alterava de forma significativa o perfil de liberação in vitro, ou seja, não promovendo liberação controlada.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A magnitude da resposta terapêutica relaciona-se com a concentração do fármaco que atinge o local de ação farmacológica. Essa concentração é dependente da dose administrada, da via de administração, da fração absorvida, da distribuição e da velocidade de eliminação pelo organismo (ANSEL; POPOVICH; ALEN, 2000).

A biodisponibilidade e a solubilidade de fármacos são fatores que freqüentemente implicam em dificuldades no desenvolvimento de formas farmacêuticas. Nas formas farmacêuticas convencionais, muitas vezes, são administradas altas concentrações do fármaco, o qual é rapidamente metabolizado e eliminado, exercendo efeito durante um curto espaço de tempo (SILER-MARINKOVIC et al, 1997; LIMA, 2006). Essas condições são extremamente adversas ao tratamento de doenças oculares, principalmente as do segmento posterior dos olhos.

O olho humano pode ser dividido anatomicamente em segmento anterior e segmento posterior. O segmento anterior inclui a córnea, câmara anterior, íris, pupila, lente, cristalino e corpo ciliar. O segmento posterior inclui o corpo vítreo, retina, coróide e esclerótica (OGURA, 2001). A córnea é um tecido não vascularizado constituído por cinco camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio, todas elas formando uma barreira protetora contra partículas estranhas, incluindo fármacos (HARDMAN, GILMAN & LIMBIRD, 2003).

Devido à dinâmica do sistema lacrimal, o tempo de retenção de um fármaco em solução na superfície do olho é curto, sendo que a fração absorvida é muito pequena em relação à dose administrada (cerca de 5%) e em relação às necessidades terapêuticas da maioria dos fármacos. Isso implica numa grande freqüência de administração, o que é inconveniente para o paciente, e muitas vezes provoca a não cooperação do mesmo, com falhas nas administrações, provocando grande flutuação dos níveis terapêuticos do fármaco

no tecido alvo (NADKARNI; YALKOWSKI, 1993; MITRA, 2003; RANADE; HOLLIGER, 2004; SILVA-JUNIOR, 2005, MILES; NEUMANN, HILL, 2005).

A dificuldade em atingir concentrações terapêuticas nos tecidos do segmento posterior do olho, através de aplicações tópicas de medicamentos, dificulta também o tratamento de doenças nesses tecidos (OGURA, 2001; MITRA, 2003). Mesmo através da administração por vias de distribuição sistêmicas, são necessárias altas doses para atingir níveis terapêuticos nessa região, o que exalta os efeitos adversos e toxicidade do fármaco (GEROSKI; EDELHAUSER, 2001; OGURA, 2001; SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JUNIOR, 2008). Esse fato é devido à baixa permeação dos fármacos frente à barreira hematorretinal, a qual consiste em um estreito complexo juncional de pigmentos epitélio retinais e de epitélio dos capilares retinais (MYLES; NEUMANN; HILL, 2005; Del AMO; URTTI, 2008).

Uma alternativa para se conseguir atingir níveis terapêuticos de fármaco no segmento posterior dos olhos é o emprego de preparações injetáveis, normalmente aplicados por via intravítreal ou subconjuntival (PAGANELLI *et al*, 2004; BONINI FILHO *et al*, 2007; THIRMAWITHANA *et al*, 2011). Porém, a eliminação rápida do fármaco do local de ação leva à necessidade de administrações repetidas para manter concentração adequada durante um período de tempo (OGURA, 2001), que além de serem incomodas podem trazer sérios problemas como endofitalmite e aumento da pressão intra-ocular (PIO) (THIRMAWITHANA *et al*, 2011).

A ocorrência de inflamações e dores nos olhos é um problema comum aos pacientes no pós-operatório em oftalmologia. Esse desconforto pode ser aliviado com o uso de colírios contendo antiinflamatórios esteróides (AIEs) ou não-esteróides (AINEs). Na maioria dos casos, os AIEs apresentam melhor desempenho no tratamento das inflamações, mas resultam na alta incidência de glaucoma (aumento da PIO), causando

outro desconforto, e em alguns casos, acarretando problemas relacionados à cicatrização. Porém, os AINEs têm ação maior sobre a dor pelo efeito analgésico, além de evitar uma série de complicações, como surgimento de herpes, glaucoma secundário, catarata e dificuldade na cicatrização (MEIRELES-TEIXEIRA et al, 2003).

O cetorolaco (CT) (figura 1) é um AINE, inibidor da biossíntese de prostaglandinas, com atividade analgésica, antipirética e, principalmente, antiinflamatória (HARDMAN, GILMAN & LIMBIRD, 2003). Aprovado pelo FDA em 1989 pode ser administrado por via oral, oftálmica, parenteral ou retal (ANTHONY; JASINSKI, 2002). Especificamente para uso oftálmico é recomendado pelo FDA para tratamento de conjuntivite alérgica, inflamações pós-cirurgia de catarata e desconfortos após cirurgias corretivas (KIM; FLACH; JAMPOL, 2010). O cetorolaco é apresentado como pó cristalino de coloração amarelo claro até marrom claro dependendo do solvente empregado na purificação, pouco solúvel em água e etanol, solúvel em acetona, clorofórmio, éter e diclorometano. Possui absorção máxima na região de UV-Vis de 312 a 323, ponto de fusão de 154-161°C e pka de 3,49 (The Merck Index, 2011)

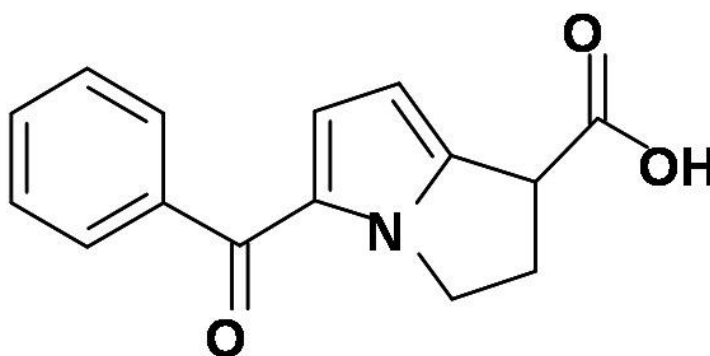


Figura 1- Representação da estrutura molecular do CT.

Apesar de não ser um agonista opióide, o CT possui propriedades analgésicas semelhantes dos opióides. Além disso, não apresenta efeitos adversos característicos dos

mesmos, tais como náusea, vômito e depressão respiratória. Sua aplicação terapêutica estende-se às inflamações e dores pós-operatórias e tratamento de dores agudas e crônicas, uma vez que sua utilização por longos períodos não causa tolerância ou dependência (HARDMAN, GILMAN & LIMBIRD, 2003).

Estudos mostram menor incidência de glaucoma quando se utiliza o CT no tratamento pós-operatório preventivo de inflamações e dores, mantendo uma eficácia semelhante a dos AIEs (MEIRELES-TEIXEIRA *et al*, 2003)

O emprego do CT no período pré-operatório de cirurgias oftálmicas reflete-se de forma positiva no pós-operatório, diminuindo significativamente as dores e o desconforto, bem como as inflamações e a ocorrência de edema macular cistóide (DONNENFELD *et al*, 2006). Um estudo comparativo com nepafenaco mostrou menor incidência de inflamações no segmento posterior do olho nos pacientes tratados com CT, bem como um controle mais eficiente da dor (DUONG; WESTFIELD; CHALKLEY, 2007).

Estudos recentes demonstram através de angiografia por fluorescência que administrações intravitrealis de CT inibem significativamente a neovascularização da coróide, principal causa de perda de visão em pacientes com degeneração macular relacionada à idade. Embora os resultados indiquem que a triancinolona apresenta inibição mais eficiente das cicloxigenases (COX), catalisadora da biossíntese do fator de crescimento endotelial vascular (VEGf), apresenta os efeitos adversos dos AIEs descritos anteriormente (KIM; TOMA, 2010)

Assim como os demais fármacos em formulações convencionais, o CT administrado no olho por via tópica apresenta dificuldade em manter a atividade terapêutica por tempo prolongado. Isso ocorre devido à sua baixa permeabilidade frente às membranas oculares, devido à sua rápida eliminação do globo ocular e pela ação das lágrimas, que atuam imediatamente após a administração, diluindo e eliminando a forma

farmacêutica da superfície da córnea (DILLOW; LOWMAN, 2002; HARDMAN, GILMAN & LIMBIRD, 2003). Desta forma, o desenvolvimento de sistemas que possibilitem a liberação do CT diretamente no segmento posterior dos olhos, durante um período de tempo suficiente para produzir efeito antiinflamatório e reduzir a frequência das aplicações, representa um avanço extremamente benéfico no tratamento pré e pós-operatório das afecções do segmento posterior dos olhos.

De acordo com a dose necessária, a origem da doença ou com as características do fármaco a ser administrado, diferentes sistemas para administração oftálmica podem ser empregados, desde uma simples formulação de aplicação tópica até sistemas complexos que exigem varias etapas de pesquisa e desenvolvimento (THIMAWITHANA *et al*, 2011)

Os caminhos para o estabelecimento de sistemas que tornem os fármacos mais eficientes num determinado local, onde devem exercer seu efeito terapêutico, têm sido amplamente estudados e fundamentados principalmente na liberação controlada (SILER-MARINKOVIC *et al*, 1997; LIMA, 2006).

A principal dificuldade encontrada no combate a doenças que exigem tratamentos longos (maiores que um mês), é que a administração de formas farmacêuticas convencionais resultam em picos de concentração de fármaco no local de ação seguidos de diminuições muitas vezes exponenciais nessa quantidade de fármaco, ocasionando respostas fisiológicas indesejáveis (DILLOW; LOWMAN, 2002)

Sistemas de liberação intra-ocular de fármacos têm sido estudados para utilização com diversos objetivos. Alguns são sistemas de liberação transescléricos (YASUKAWA *et al* 2000); sistemas coloidais de liberação, tais como lipossomas (JORGE *et al.*, 2004; WANCZINSKI, 2005), micropartículas (SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JUNIOR *et al*, 2008a; ROSSANEZI, 2008; SILVA-JUNIOR *et al*, 2008b), nanopartículas (CAMPOS;

SANCHEZ; ALONSO, 2001; PIGNATELLO et *al.*, 2002; KOMPELLA; BANDI; AYALASOMAYAJULA, 2003) e implantes poliméricos biodegradáveis (KIMURA et *al.*, 1994; SILVA, 2004; CARDILLO et *al.*, 2004).

Vários sistemas de liberação controlada têm sido estudados utilizando polímeros biodegradáveis como carreadores para liberação de vários tipos de fármacos, incluindo antibióticos (SILVA-JUNIOR et *al.*, 2008a), agentes antineoplásicos, antiinflamatórios esteróides (McCARRON; WOOLFSON; KEATING, 2000; SILVA-JUNIOR et *al.*, 2008b), peptídeos e proteínas (TAN; CHOONG; DASS, 2010) entre outros. Entre estes polímeros pode-se destacar o ácido poli-lático co-glicólico (PLGA) (COLTHURST et *al.*, 2000; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; OGURA, 2001; UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2006; SILVA-JUNIOR, 2008; SILVA-JUNIOR et *al.*, 2008b).

Polímeros biodegradáveis são aqueles que sofrem metabolismo dando origem a substâncias fisiologicamente inertes, que são eliminadas pelo organismo. Além de serem biodegradáveis os polímeros também podem ser biocompatíveis, ou seja, não iniciam processos imunes ou inflamatórios, são estáveis durante o seu tempo de ação no corpo e completamente metabolizados pelo organismo (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

O ácido poli-lático-co-glicólico ou PLGA (figura 2) é um copolímero sintético biodegradável do grupo dos poliésteres alifáticos, obtido através da co-polimerização do ácido lático e do ácido glicólico (UHRICH et *al.*, 1998, DILLOW; LOWMAN, 2002). As diferentes proporções de ácido lático e ácido glicólico (50:50, 75:25 e 85:15) inseridas na cadeia polimérica dão origem ao PLGA com diferentes propriedades físico-químicas, pois o ácido lático é mais hidrofóbico que o glicólico (UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2006).

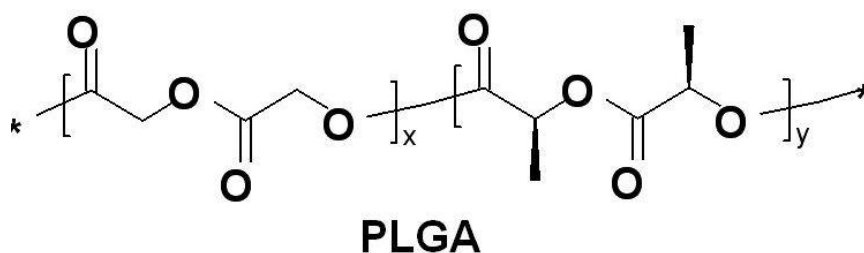


Figura 2- Representação da estrutura molecular do PLGA

No organismo, o metabolismo do PLGA inicia-se pela hidrólise química gerando os ácidos glicólico e lático, os quais são metabolizados via ciclo de Krebs como gás carbônico e água (JAIN et al., 1998; KUNOU et al., 2000, DILLOW; LOWMAN, 2002).

O PLGA tem sido um dos polímeros mais empregados em sistemas de liberação controlada de fármacos, devido à sua alta biocompatibilidade, atoxicidade e pelo fato de que sua biodegradabilidade evita a intervenção cirúrgica para retirada de resíduos após o esgotamento do fármaco (JAIN et al., 1998; KUNOU et al., 2000; SHALABI; BURG, 2004; UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2006).

Entre os sistemas destinados a veiculação de fármacos no olho, as micropartículas biodegradáveis têm sido bastante investigadas objetivando a liberação de fármacos no vítreo por tempo prolongado, tanto por administração intravitreal como subconjuntival (HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; KOMPELLA; BANDI; AYALASOMAYAJULA, 2003; SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JUNIOR et al, 2008 a; SILVA-JUNIOR et al, 2008b; TAN; CHOONG; DASS, 2010), pois partículas com essa escala de tamanho diminuem as irritações no local da administração (THASSU;DELEERS;PATHAK, 2007).

As micropartículas são sistemas sólidos, geralmente esféricos, com dimensões que vão desde 1 a 1000 µm até alguns milímetros. Podem ser constituídas por matrizes poliméricas (microesferas) nas quais o fármaco pode estar adsorvido, incorporado ou

ligado covalentemente à rede tridimensional formada pelo polímero, ou por sistemas reservatórios (microcápsulas) nas quais o fármaco representa um núcleo sólido, líquido ou gasoso, separado do meio externo por uma membrana polimérica (OLIVEIRA et al. 1992; ANDREO-FILHO; OLIVEIRA, 1999; UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2006; SILVA-JUNIOR, 2008; ROSSANEZI, 2008).

Existem aspectos muito importantes das micropartículas que as tornam aplicáveis no tratamento de patologias oculares, entre as quais pode-se citar a biodegradação, bioadesão, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, o tipo de polímero utilizado determina o mecanismo de liberação do fármaco envolvido. Em matrizes biodegradáveis, a liberação ocorre pela entrada do solvente através de poros formados na matriz polimérica, dissolvendo e difundindo o fármaco para o meio de liberação, ou através da degradação ou erosão do polímero, expondo o fármaco ao meio de dissolução, sendo que a difusão ocorre no início da liberação e a erosão tende a ocorrer numa fase mais tardia, com a liberação do fármaco disperso na matriz (ANDREO FILHO e OLIVEIRA, 1999; BENITA, 2006; ROSSANEZI, 2008).

As micropartículas de polímeros biodegradáveis como o PLGA tem mostrado eficiência na liberação de fármacos no vítreo e podem ser tolerados pelo tecido óptico (MORITERA et al, 1991; MORITERA et al, 1992; AKULA et al, 1994; VELOSO et al., 1997; DING, 1998; YASUKAWA et al 2000; OGURA, 2001; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; KOMPELLA; BANDI; AYALASOMAYAJULA, 2003; SILVA-JUNIOR, 2008b).

Várias metodologias têm sido propostas para a obtenção de micropartículas, entre as quais a atomização com secagem “spray drying” vem se destacando devido à eficiência de encapsulação, rapidez do processo de obtenção, número de etapas de produção reduzida, possibilidade de uso em escala industrial, possibilidade de encapsular fármacos e

polímeros com diversos graus de hidrofília-lipofília (MASTERS, 1991; FU *et al*, 2002; SILVA-JUNIOR, 2005; BENITA, 2006; ROSSANEZI, 2008; SILVA-JUNIOR *et al*, 2008b).

O método de obtenção de micropartículas por spray drying tem sido intensamente aplicado na produção de alimentos, produtos farmacêuticos, polímeros e também na indústria química. Na indústria farmacêutica é usado para produzir pós destinados à aplicação parenteral, nasal e pulmonar e são administrados na forma de suspensões, soluções e aerossóis (MASTERS, 1991; BENITA, 2006; VEHRING; FOSS; LECHUCA-BALLESTEROS, 2007; SANSONE *et al*, 2009; NANDIYANTO; OKUYAMA, 2011). Exemplos de produtos farmacêuticos produzidos pela técnica de spray drying incluem antibióticos (sulfatiazol, streptomicina, penicilina e tetraciclina), proteínas e peptídeos (amilase, protease, lipase e tripsina) além de outras substâncias como vitaminas (C e B₁₂), excipientes para compressão direta (lactose, manitol e celulose microcristalina) e produtos estéreis (PARIKH, 2005).

Spray drying é por definição o processo de transformação de uma solução em uma forma sólida particulada através da atomização ou nebulização da solução para dentro de um ambiente aquecido. A técnica consiste em dissolver, dispersar ou emulsionar o fármaco e/ou polímero e atomizar, originando gotículas que são secas rapidamente (MASTERS, 1991). A secagem ocorre quando as microgotas passam juntamente com o ar através de uma câmara de secagem a uma temperatura superior ao ponto de ebulição do solvente utilizado, fazendo com que este evapore. A secagem ocorre de forma muito rápida devido à grande área de superfície das gotículas resultante do processo de atomização, uma vez que um metro cúbico de líquido atomizado dá origem à ordem de grandeza de 10¹² gotículas e uma área de superfície de mais de 60.000 m². Esta etapa pode ser modulada com a variação de parâmetros como o fluxo de ar circulante na câmara de secagem, e a eficiência do

aspirador, que pode aumentar ou diminuir o tempo de exposição das gotículas ao ar aquecido (MASTERS, 1991). No caso de polímeros como o PLGA é extremamente importante que a temperatura na região do ciclone seja inferior à temperatura de transição vítrea do polímero, para que após serem formadas as partículas não se deformem ou fundam-se (UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2006; FU *et al*, 2011). O produto seco resultante pode compreender pós, grânulos ou aglomerados de partículas de diversos tamanhos. Utilizando este método de obtenção as propriedades físicas do produto final (tamanho, forma, teor de umidade e propriedades de fluxo) podem ser controladas com a escolha do equipamento adequado e manipulação dos parâmetros do processo (FU *et al*, 2002; PARIKH, 2005; BENITA, 2006; SANSONE, *et al*, 2009). Também a obtenção de micropartículas esféricas e com tamanho uniforme na ordem de micrometros, são características extremamente importantes para a liberação homogênea e reprodutível do fármaco (SILVA-JÚNIOR, 2005; NAGARWAL *et al*, 2009, FU *et al*, 2011; NANDIYANTO; OKUYAMA, 2011), além de facilitar sua administração evitando o entupimento da agulha no momento da administração parenteral (DING, 1998, SILVA-JÚNIOR *et al*, 2008a).

Para garantir segurança na aplicação intraocular é necessária a esterilização das micropartículas após o processo de produção (HERRERO-VANRREL; REFOJO, 2001). Uma técnica muito utilizada para esterilizar sistemas de liberação microparticulados é a de radiação gama (MONTANARI *et al*, 1998; SILVA-JUNIOR *et al*, 2005).

Alguns estudos revelam que a radiação gama pode alterar certos parâmetros das micropartículas como tamanho, forma e velocidade de degradação (HERRERO-VANRREL *et al*, 2000; MONTANARI *et al*, 2003; UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2006; SILVA-JUNIOR, 2008). Para tanto, as caracterizações destes sistemas devem ser

realizadas antes e depois da exposição à radiação gama como método esterilizante terminal (SILVA-JUNIOR et al, 2008a).

II- JUSTIFICATIVA

Inflamações pós-operatórias promovem grande desconforto ao paciente por se tratar de uma região muito sensível e submetida a grandes esforços involuntários. O uso do antiinflamatório cetorolaco de trometamina tem apresentado resultados satisfatórios no tratamento e prevenção dessas inflamações, atuando também como analgésico e promovendo maior conforto ao paciente. Porém, as soluções de uso tópico necessitam de repetidas aplicações, em função da baixa penetração através da córnea e rápida metabolização e eliminação. Administrações intravitreais ou subconjuntivais atingem concentrações eficazes no segmento posterior do olho, mas a manutenção dos níveis eficientes de fármaco implica em administrações repetidas, que são desconfortáveis e podem levar a traumatismos. Dessa forma, o desenvolvimento de micropartículas para liberação prolongada intraocular de CT, para serem administradas logo após a cirurgia, que atinjam e mantenham níveis efetivos de fármaco no segmento posterior do olho, promoveriam maior conforto aos pacientes, maior uniformidade nas concentrações de CT no local de ação e não necessitariam de intervenções cirúrgicas para sua retirada, além de diminuir muito a incidência de glaucoma, comum nos tratamentos com antiinflamatórios esteróides. Estudos anteriores em nosso grupo revelaram que o uso de cetorolaco de trometamina em micropartículas de PLGA, não promove liberação uniforme, pois na forma de sal de trometamina a molécula apresenta-se mais hidrofílica, formando uma mistura heterogênea com o PLGA, que não promove liberação uniforme. Portanto, não utilizaremos o sal da trometamina, mas sim o cetorolaco em sua forma ácida, esperando obter uma mistura mais homogênea de CT e PLGA nas micropartículas, promovendo liberação prolongada e uniforme.

III-OBJETIVOS

Objetivo geral

-Estudo dos parâmetros tecnológicos de obtenção de micropartículas biodegradáveis estruturadas com o copolímero PLGA, contendo diferentes proporções de CT: Polímero utilizando a técnica de *Spray drying*;

Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química das micropartículas obtidas;
- Validar o método de análise quantitativa do CT nas micropartículas;
- Obter o perfil de liberação *in vitro* e *in vivo* do CT a partir das micropartículas;
- Estudar o efeito da radiação gama sobre as características físico-químicas e perfil de liberação das micropartículas.

IV-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

4.1.1. Matérias Primas e Reagentes

PLGA 85:15 (inherent viscosity 0.63 dl/g at 30 °C) adquirido de Birmingham Polymer Inc. (U.S.A.); Ceterolaco (CT) padrão secundário de referência, Deg-Ativando Princípios, Brasil; Acetona e Ácido Acético Glacial da Merck S/A, Brasil; Acetonitrila grau HPLC da J.T. Baker, México; Água destilada e deionizada foi preparada pelo sistema de purificação Milli-Q Plus.

4.1.2. Equipamentos e Acessórios

Spray dryer de laboratório marca BUCHI® modelo B191; Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance mod 2695; Liofilizador modelo EDWARDS MODULYO®; Espectrofotômetro UV-Vis HEWLETT PACKARD®; Microscópio eletrônico de varredura - JEOL® modelo JSM T330A; Analisador de partículas *Light Scattering* – Brookhaven, mod. EMI 9863 – fonte de laser He-Ne 10mW, 514 e 532nm – HUGHES; espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300; difratômetro Rikugu®, modelo Dmax 2500PC (limite superior 10 µm).

4.2- Métodos

4.2.1. Obtenção das micropartículas de PLGA contendo CT.

O CT foi dissolvido em 10 mL de ácido acético glacial e adicionado à solução de PLGA previamente dissolvida em acetona sob agitação a fim de obter soluções finais de proporção fármaco-polímero 15:85, 25:75, 35:65 e 50:50(m/m). Por fim as soluções foram atomizadas em aparelho de “Spray dryer”, utilizando aspensor padrão de duplo fluído de 0,7 mm de diâmetro, temperatura de entrada de ar concorrente 75 °C, temperatura de saída

de ar 48-52 °C, fluxo do ar de atomização de 450 L/h; fluxo da bomba de alimentação de 4-5 mL por minuto; eficiência do aspirador de 80%.

As partículas foram coletadas do aparelho com auxílio de uma espátula e armazenadas em frascos de vidro envoltos em papel alumínio e guardados em dessecador.

4.2.2- Caracterização físico-química das micropartículas

4.2.2.1. Morfologia

A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em diferentes aumentos utilizando Microscópio eletrônico de varredura - JEOL[®] modelo JSM T330A .

4.2.2.2. Análise de distribuição de diâmetro das micropartículas

A análise da distribuição do diâmetro das micropartículas foi realizada através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dinamic Ligth Scattering*), também denominada espectroscopia de correlação de prótons (PCS), utilizando Analisador de partículas Brookhaven, mod. EMI 9863 – fonte de laser He-Ne 10mW, 514 e 532nm – HUGHES.

A técnica consiste em preparar uma suspensão diluída com as micropartículas, colocá-las em banho de ultrasson por alguns minutos e atravessar a amostra com um feixe de laser, geralmente He-Ne 532 nm, de modo que as partículas presentes no meio espalhem a luz. As análises foram realizadas a $25 \pm 0,2$ °C, em ângulo de 90° , com correlator operando em modo paralelo e método cumulativo de análise, para calcular o diâmetro das amostras de acordo com a intensidade da luz espalhada.

4.2.2.3. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A fim de estudar a ocorrência de possíveis interações fármaco-polímero ou possíveis alterações químicas dos componentes das micropartículas após o processo de produção foram obtidos os espectros de infravermelho do fármaco, do PLGA, das micropartículas de PLGA contendo o fármaco e das misturas físicas de fármaco-polímero correspondentes. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas da amostra com KBr em espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300 (SILVA-JUNIOR et al, 2008b).

4.2.2.4. Análise Térmica

4.2.2.4.1 Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/DTG).

A fim de verificar possíveis alterações na estabilidade térmica dos componentes após o processo de obtenção das micropartículas, as curvas TG/DTG foram obtidas na faixa de 25 a 600 $^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de N_2 (50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando cadinho de platina contendo em torno de 5mg de amostra.

4.2.2.4.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Após o processo de obtenção das micropartículas, foram obtidas as curvas DSC do fármaco puro, do PLGA, das micropartículas de PLGA contendo o fármaco e das respectivas misturas físicas de mesmas proporções fármaco-polímero, na faixa de 25-600 $^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de N_2 (100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando cadinhos de alumínio fechados contendo aproximadamente 1mg de amostra. A célula de DSC foi calibrada antes dos experimentos utilizando padrão de Índio.

4.2.2.5. Difração de Raios X de pó (DRX)

A análise por difração de raios X das micropartículas de PLGA contendo o fármaco foi realizada usando o difratômetro Rikugu®, modelo Dmax 2500PC. Todas as análises foram realizadas com a difração em ângulo 2θ , variando de 5° a 50°, usando radiação CuK α de $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$.

4.2.2.6. Análise quantitativa do fármaco nas micropartículas

Foram dissolvidos 5 mg de micropartículas contendo CT em balão volumétrico de 10mL com ácido acético glacial. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado com ácido acético 0,1 mol.L⁻¹. A amostra obtida foi analisada por espectroscopia de UV-Vis. O teor de fármaco encapsulado foi calculado utilizando a equação da curva padrão obtida nas mesmas condições de análise, previamente validada (ROSSANEZI, 2008) e as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3. Estudo da liberação *in vitro* do CETO a partir das micropartículas

A liberação *in vitro* do CT foi realizada a partir do fármaco não microencapsulado e encapsulado, utilizando modelo estático de célula de dissolução, na qual as amostras de CETO foram colocadas em tubos com 4mL de tampão Tris HCl 0,01 mol.L⁻¹, pH 7,2 e incubadas a 37°C $\pm$ 0,2 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados (15', 30', 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 7dias, 10 dias e 14 dias) os tubos foram centrifugados a 5000 rpm, durante 5 minutos e o sobrenadante analisado por espectroscopia de UV-vis (BLANCO-PRIETO et al., 1999; RAHMAN; MATHIOWITZ, 2004; SILVA-JÚNIOR, 2008; ROSSANEZI, 2008). Novos volumes de solução tampão foram adicionados aos

tubos, os quais foram incubados até o próximo tempo de coleta. Todas as análises foram realizadas em quadruplicata.

4.2.4. Exposição das micropartículas ao processo de esterilização por radiação gama

O processo de exposição das micropartículas foi realizado pela Empresa Brasileira de Radiações-EMBRAD. Depois de produzidas, as micropartículas de PLGA contendo CT foram devidamente acondicionadas em frasco-ampola e lacradas. As amostras foram submetidas à radiação gama à temperatura ambiente, a uma velocidade média de cerca de 3,5kGy/h. Como fonte de radiação gama será utilizado o cobalto 60 e foram investigadas diferentes doses de 10 e 25 kGy (SILVA-JUNIOR, 2008).

4.2.5. Estudo de biodisponibilidade do CETO a partir das micropartículas usando coelhos albinos.

O ensaio de liberação in vivo ou biodisponibilidade do CT foi realizado utilizando 52 coelhos albinos da raça Nova Zelândia com massa corporal entre 2,0-2,5Kg, fornecidos pelo biotério da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Botucatu. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFar, e foram mantidos em condições de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo de 12/12h) e terão alimento e água à vontade. Antes da administração, todos os coelhos foram anestesiados por administração de injeções de cloridrato de ketamina (50mg/kg) associadas à cloridrato de xilazina (5mg/kg). Os animais receberam uma única administração de 0,1mL de formulação pela via intravitreal, e foram divididos em grupos de 5 animais, referentes aos intervalos de coleta (1, 2, 4, 24, 72h e 5, 7, 10, 14 dias), sendo que no olho direito foi administrada uma solução aquosa de CT $5,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ e no olho

esquerdo uma das formulações de micropartículas contendo CT e na mesma concentração (SILVA-JUNIOR, 2008). Nos intervalos de coletas os animais foram sacrificados através asfixia em camara de CO₂ precedida de anestesia e sedação, e foram retiradas amostras de humor aquoso e humor vítreo que foram congeladas a -40°C, para posteriormente proceder as análises por CLAE com o método previamente validado.

4.2.5.1. Considerações éticas em relação aos animais experimentais.

O projeto desenvolvido na FCFar-UNESP, foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição e foi devidamente aprovado. Os animais utilizados neste estudo foram procedentes de biotério devidamente qualificado, e foram transportados até o biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFar, que conta com controles adequados de temperatura, umidade, sanitização e iluminação. Durante a permanência no biotério, os animais tiveram acesso livre a alimento (ração padrão) e água potável. Os experimentos foram realizados em laboratório com infra-estrutura adequada e exclusivo para experimentação animal. Após o final dos experimentos, os animais sacrificados foram acondicionados em saco plásticos apropriados e depositados num freezer específico para aguardar o recolhimento semanal pelo Serviço de Coleta Especial da Prefeitura Municipal de Araraquara, para incineração.

4.2.6. Análise estatística

Os dados farmacocinéticos foram apresentados como as médias dos valores experimentais obtidos e seus respectivos desvios padrão. Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade, seguido da análise de variância (ANOVA).

Para confronto dos valores médios estatisticamente diferentes foi utilizado quando apropriado, o teste de Mann-Whitney para comparações dos pares, sendo considerados significativamente diferentes os valores de $p < 0,05$.

V- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Obtenção das micropartículas de PLGA contendo CT

Através da metodologia proposta foi possível obter micropartículas de PLGA contendo CT nas proporções (CT:PLGA) de 15:85, 25:75, 35:65 e 50:50. As micropartículas apresentam-se como um pó fino, de cor branca à levemente amarelada, higroscópico e com tendência à aglomeração. No caso específico das Mp50 estas se apresentam como um pó mais grosso com coloração amarelada e bastante aglomerado.

Tabela 1- Composição das amostras obtidas e razão da proporção de cetorolaco/PLGA.

	MP15	MP25	MP35	MP50
CT (%)	15	25	35	50
PLGA (%)	85	75	65	50
CT /PLGA	0,1764	0,3333	0,5384	1

5.2- Caracterização das micropartículas de PLGA contendo CT

5.2.1- Morfologia

Para verificar a morfologia das MPs obtidas foi utilizada a MEV, com intuito de avaliar a forma e o tipo de superfície apresentado. Para isso foram fotografados o fármaco e as MPs com diferentes proporções de CT:PLGA, em varias condições de aumentos.

O CT (Figura 3 e 4) apresentou-se na forma de placas laminares, com diâmetros variando entre 10 e 50µm e alguns fragmentos com diâmetros inferiores. Também é possível perceber certa aglomeração entre os placas, acompanhando o comportamento do pó, facilmente observável a olho nu.

A Figura 5 apresenta a microscopia eletrônica de varredura das MP15. Apesar da baixa nitidez desta imagem é possível ter uma idéia da forma apresentada pelas partículas e também o seu tamanho médio. Elas apresentam diâmetro médio de 1 a 2µm e com formas

esféricas e ovaladas, e esta característica prevalece por toda amostra. Assim como o CT, as micropartículas mostram uma tendência à aglomeração. Foram obtidas imagens em aumentos maiores porém o foco do equipamento acima dessas condições foi muito ruim.

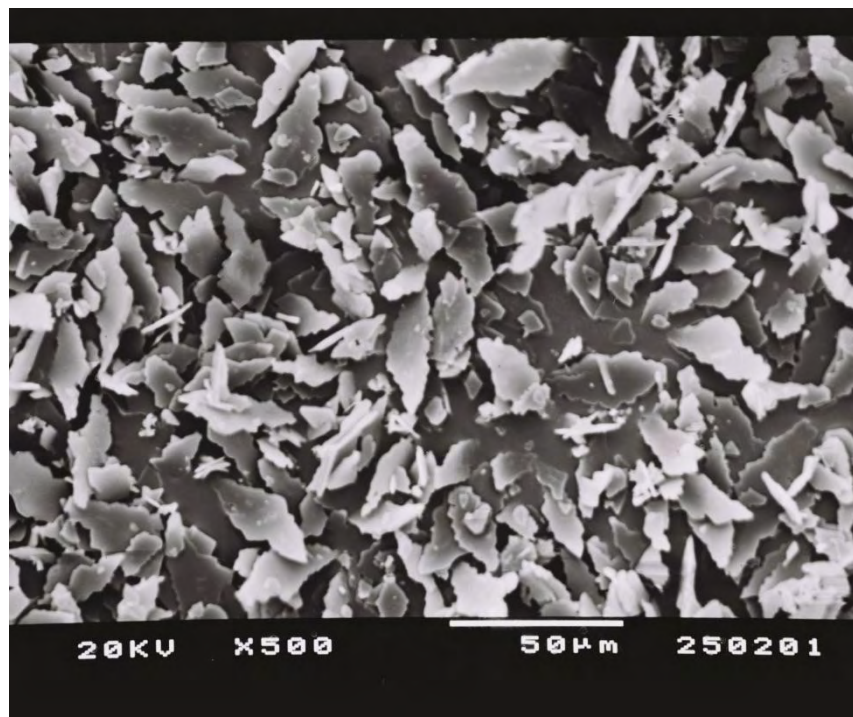


Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura do cetorolaco padrão secundário sob aumento de 500X.

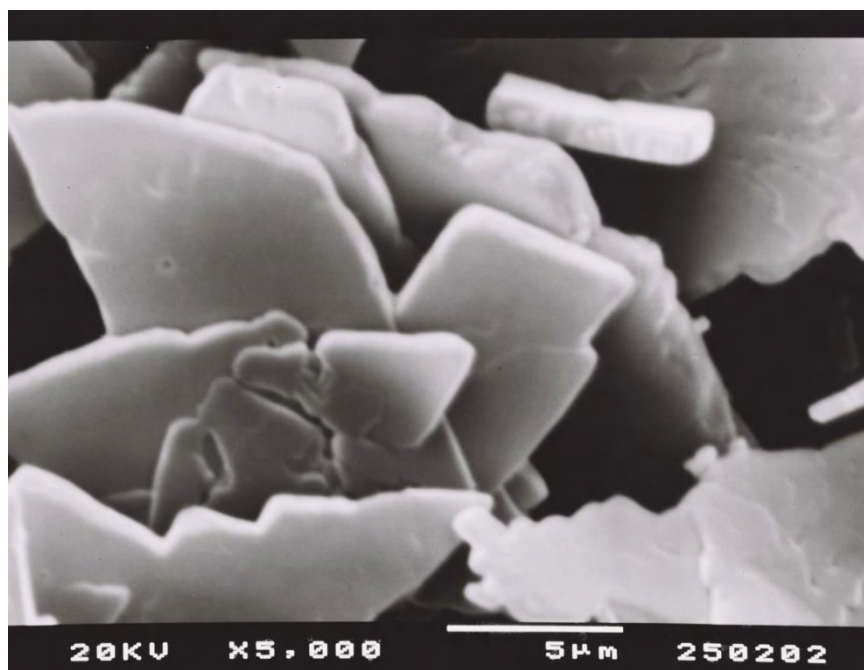


Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura do cetorolaco padrão secundário sob aumento de 5000X.

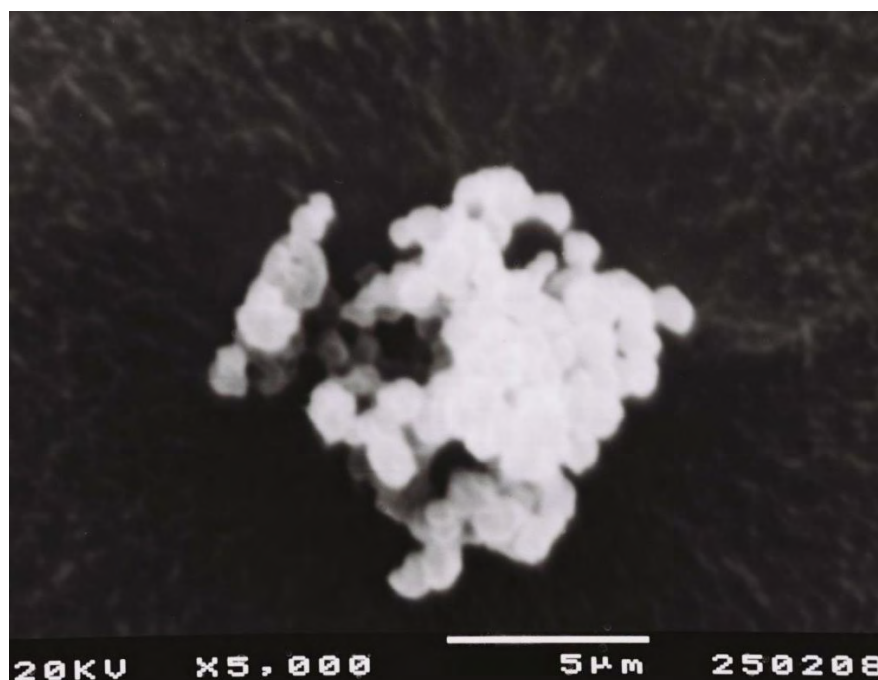


Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco sob aumento de 5000X.

Da mesma forma que as MP15, as MP25 (Figura 6) apresentam diâmetro entre 1 e 2µm, formas prevalentes esféricas e ovaladas, porém aparecem algumas partículas disformes. Novamente a nitidez da imagem atrapalha a avaliação do tipo de superfície.

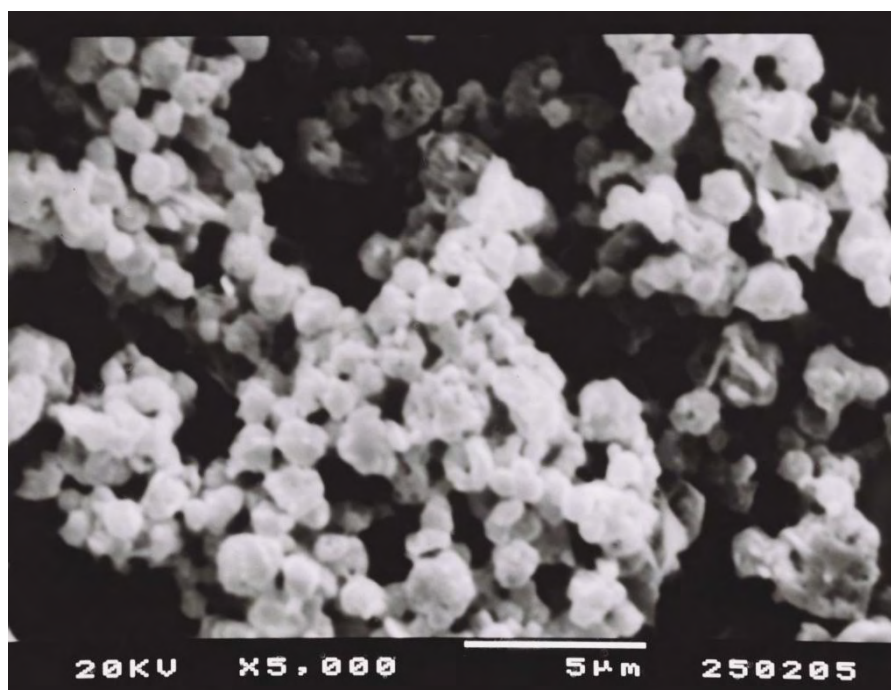


Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco sob aumento de 5000X.

As MP35 (Figura 7) mostraram um perfil um pouco diferente. Embora o diâmetro médio permaneça o mesmo, a forma da maior parte da amostra aparece alterada. Apresenta algum tipo de erosão na superfície, o que altera o formato, e também desfavorece a liberação controlada uniforme. Duas explicações são possíveis para esse fenômeno: as condições de secagem do equipamento não foram eficientes, ou as MPs entraram em contato com algum tipo de umidade durante a estocagem.

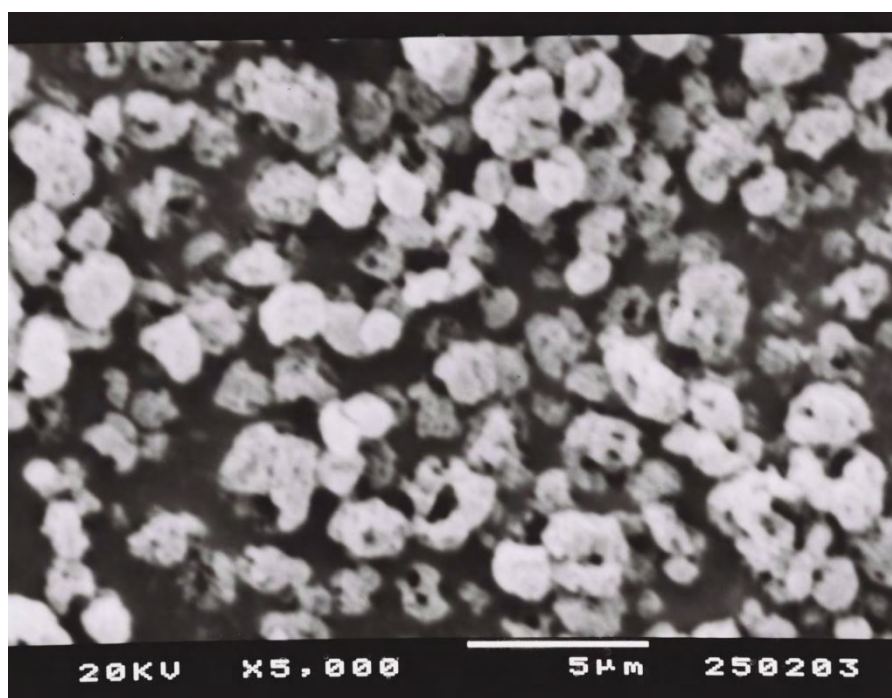


Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco sob aumento de 5000X.

A Figura 8 apresenta a microscopia eletrônica de varredura das MP50 em aumento de 1000X. É possível observar nesta imagem algumas partículas esféricas, mas a maioria não apresenta formas definidas, apenas pontas características dos cristais de fármaco. Provavelmente, na região entre 35 e 50% de CT na amostra encontra-se uma concentração crítica de fármaco, a partir da qual os placas do CT se sobrepõem ao polímero.

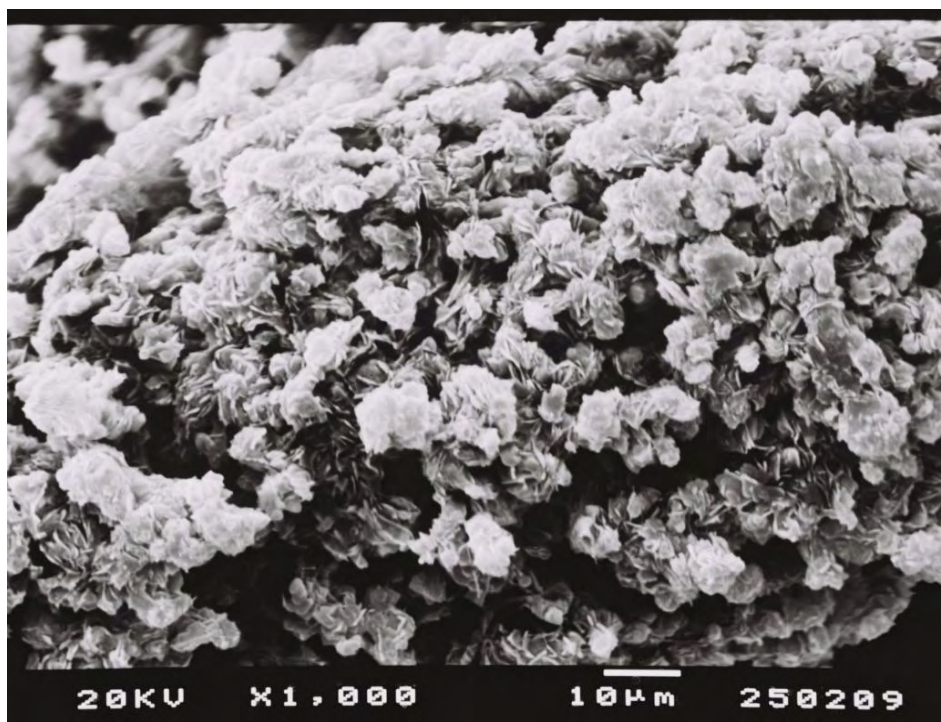


Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 50% de cetorolaco sob aumento de 1000X.

De forma geral, pode-se observar uma evolução na morfologia das MPs, de uma forma esférica nas MP15 até as partículas sem forma definida e com presença folículos ou agulhas de CT na MP50. Esse fenômeno provavelmente é resultado da saturação da matriz polimérica pelo fármaco nas amostras MP35 e MP50, ou seja, a partir destas concentrações o CT tende a se concentrar nas regiões de superfície das partículas, e por sua característica morfológica confere às partículas o aspecto de agulhas emergindo do polímero, visualizado nas MP50.

5.2.2- Análise de distribuição de diâmetro das micropartículas

Para determinação da distribuição do diâmetro das micropartículas foram preparadas suspensões com aproximadamente 3mg de MPs em 20mL solução diluente preparada com tampão fosfato 50 mM pH7,2 . As suspensões foram colocadas em banho

de ultrasson por alguns instantes e imediatamente foram procedidas as análises. O software utilizados fornece tanto os dados de distribuição quanto o diâmetro médio.

As MP15 apresentaram distribuição Gaussiana do diâmetro das micropartículas na região entre 900 e 1800 nm, onde se concentram praticamente 90% da amostra (Figura 9). Parte da amostra apresentou diâmetro na região de 500 nm e foram atribuídos a fragmentos de partículas dispersos. As análises também mostraram uma pequena porção na região acima de 8µm, porem devido a observação prévia da MEV chegamos a conclusão que se tratam de aglomerados que não se dispersaram no diluente. O diâmetro médio calculado foi de 1277 nm.

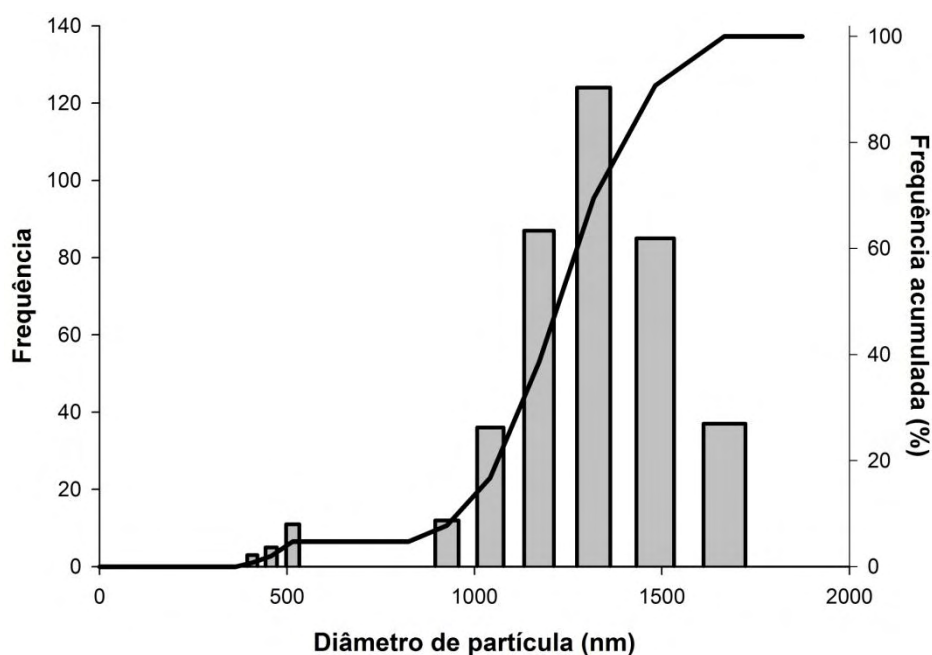


Figura 9- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco.

A Figura 10 apresenta os resultados das análises de distribuição de diâmetro das MP25. Da mesma maneira que a amostra anterior, a distribuição de diâmetro foi típica da curva de Gauss na região entre 1200 nm e 2200 nm. Os fragmentos de partículas descritos Na MP15 também aparecem nesta análise, assim como a pequena porção de aglomerados com diâmetro acima de 10µm. O diâmetro médio calculado foi de 1542 nm.

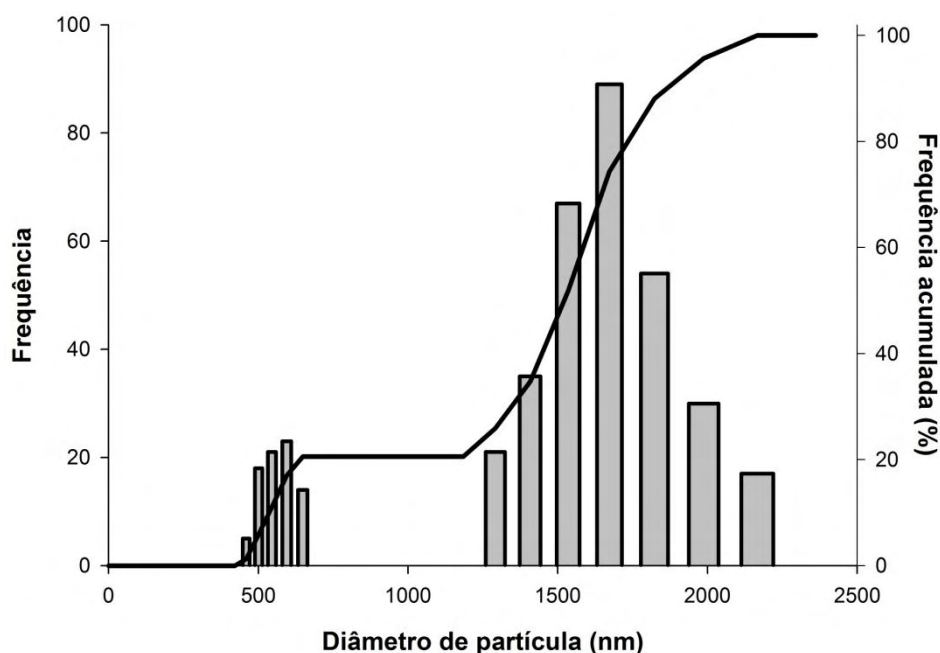


Figura 10- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco.

A Figura 11 apresenta os resultados das análises de distribuição de diâmetro da MP35.

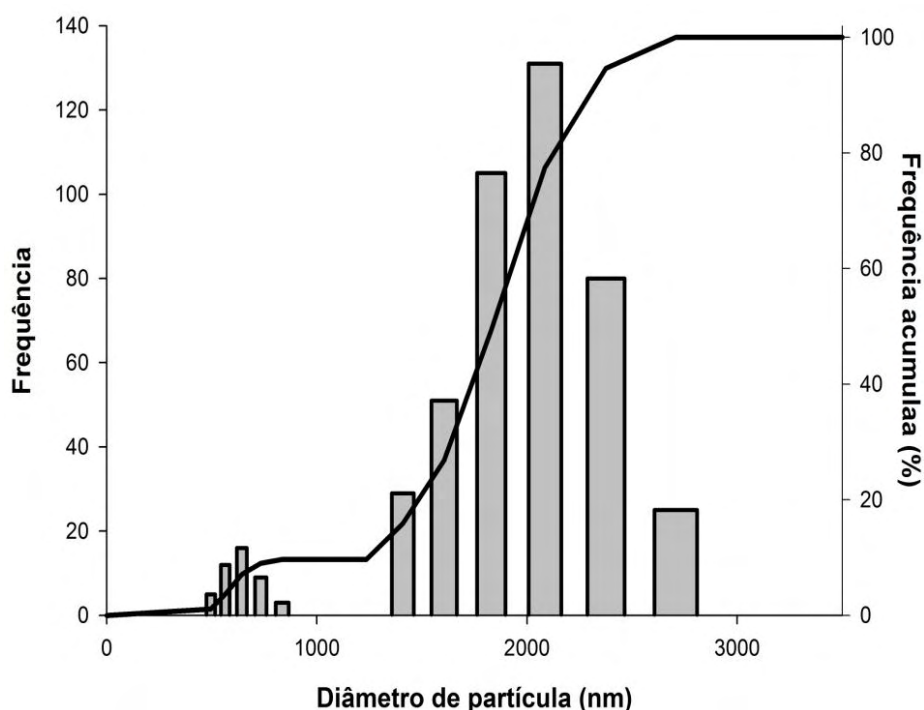


Figura 11- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco.

As MP35 mostraram o mesmo tipo de distribuição das amostras anteriores, diferindo apenas quanto à região de diâmetro abrangida. O diâmetro médio calculado foi de 1876 nm.

A Figura 12 apresenta os resultados das análises de distribuição de diâmetro da MP50. A distribuição de tamanho desta amostra abrangeu regiões de maiores valores, entretanto também apresenta uma porção de fragmentos com diâmetro inferior a 1000 nm. O diâmetro médio calculado foi de 3251 nm.

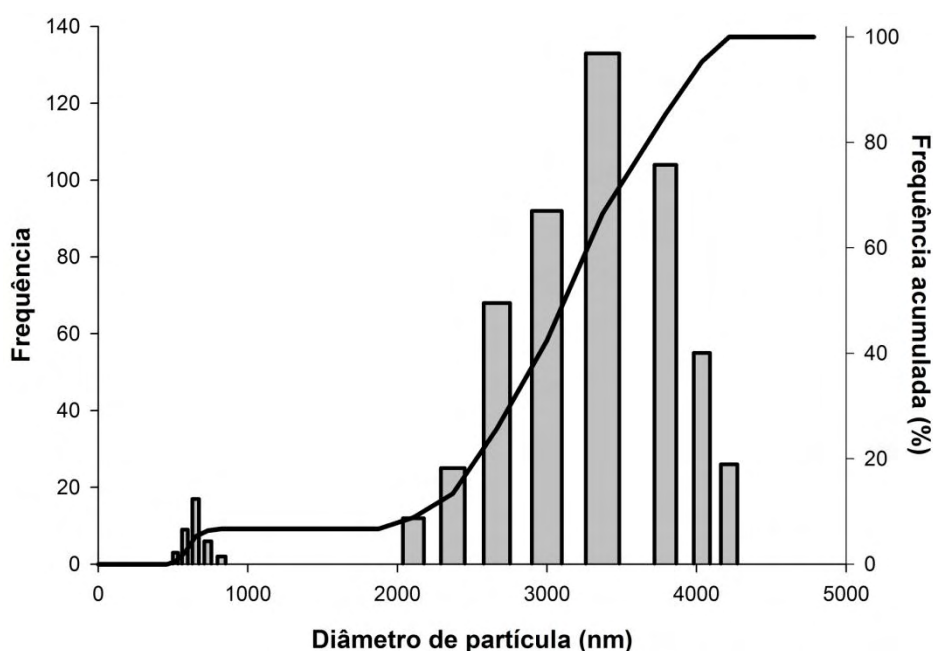


Figura 12- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 50% de cetorolaco.

As distribuições das MPs em relação ao diâmetro em todos os casos apresentaram perfis de curva de Gauss, com uma frequência maior em um valor central, e os valores adjacentes com frequências gradativamente menores. A medida em que os valores da razão entre proporção de CT e proporção de PLGA crescem aumenta também o diâmetro médio da amostra, como mostra a Figura 13.

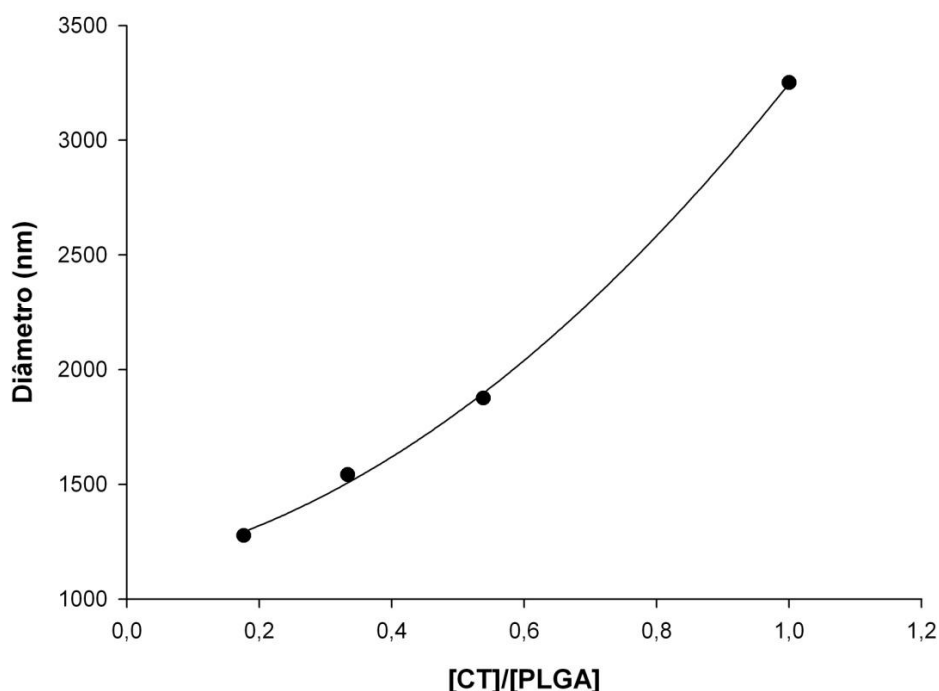


Figura 13- Efeito da razão cetorolaco/PLGA sobre o diâmetro médio das micropartículas.

Embora todos os gráficos de frequência acumulada tenham o mesmo perfil, eles são deslocados para regiões de maiores valores de diâmetro quando a concentração de fármaco é aumentada.

5.2.3-Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV).

A Figura 14 apresenta o espectro de IR do CT: banda larga na região de 2700 a 3300 cm^{-1} atribuídas ao estiramento de grupamentos O-H e ligações C-H sp^3 e sp^2 ; banda de 1500 a 1650 cm^{-1} atribuída ao estiramento da C=O conjugada; de 1650 a 1780 cm^{-1} banda atribuída a C=O da carboxila; de 1350 a 1500 cm^{-1} bandas provenientes de C=C do anel aromático e CH_2 ; de 1210 a 1320 cm^{-1} , banda referente à amina aromática terciária; de 1350 a 1420, banda atribuídas a estiramento C-O-H da carboxila; de 1050 a 1150 cm^{-1} , proveniente de ligações C=C e de 700 a 900 cm^{-1} , atribuídas à monosubstituições no anel aromático (X) (SILVERSTEIN, 1979).

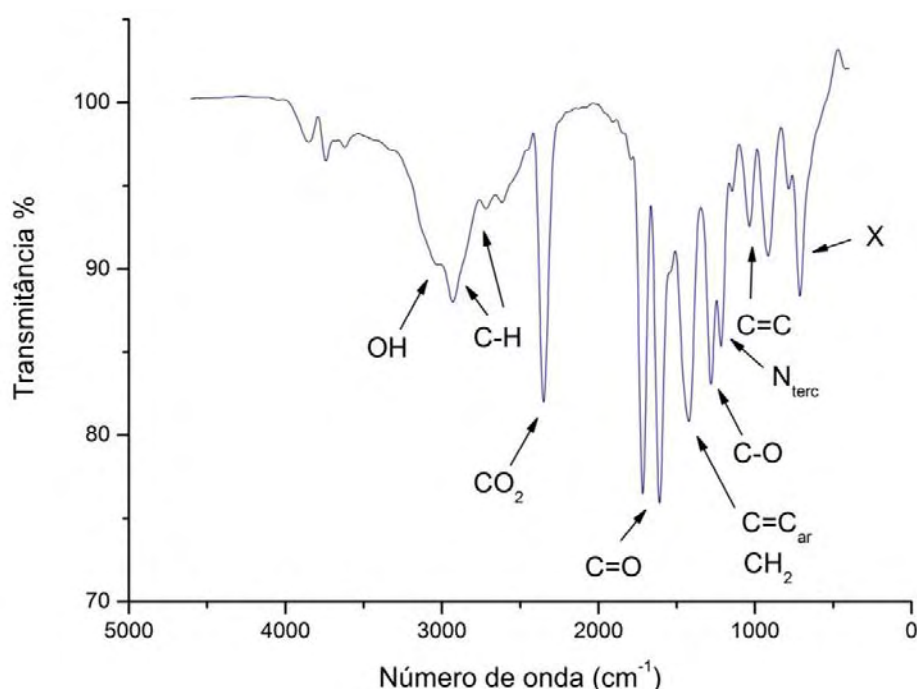


Figura 14 – Espectroscopia na região do infravermelho do cetorolaco.

A Figura 15 apresenta o espectro de IR do PLGA: a banda próxima a 3000 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-H sp^2 e sp^3 , além da do estiramento da O-H, de 1760 a 1735 cm^{-1} , banda proveniente do estiramento grupo C=O de funções éster, bandas de 1460 a 1000 cm^{-1} , correspondem ao estiramento das ligações C-O alifática e presentes na carboxila terminal.

Os espectros das Figuras 14 e 15 apresentam picos na região de 2400 cm^{-1} , resultado da contaminação KBr por CO_2 , devido à manipulação constante do reagente.

É possível observar a presença de picos referentes a C=O em ambas as amostras, porem a C=O presente na molécula do CT é classificada como conjugada, ou seja, está diretamente ligada a um átomo que faz dupla ligação com um outro átomo, por essa razão ocorre um deslocamento do pico dessa C=O para a região de 1500 a 1600 cm^{-1} , além da C=O referente à carboxila. Diferente da C=O presente no PLGA, que consiste em uma ligação C=O presente na função éster. Sendo assim, esses picos servirão como identificação de seus respectivos componentes, nas amostras analisadas a seguir.

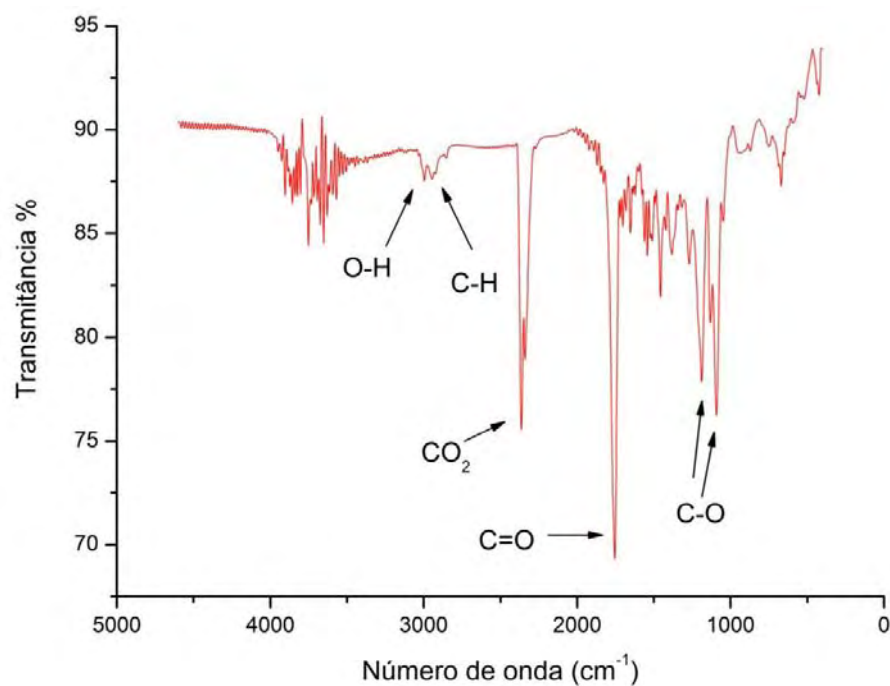


Figura 15- Espectroscopia na região do infravermelho do PLGA 85:15.

A Figura 16 apresenta a sobreposição dos espectros de IR da mistura física contendo 15% de CT (MF15) e da MP15.

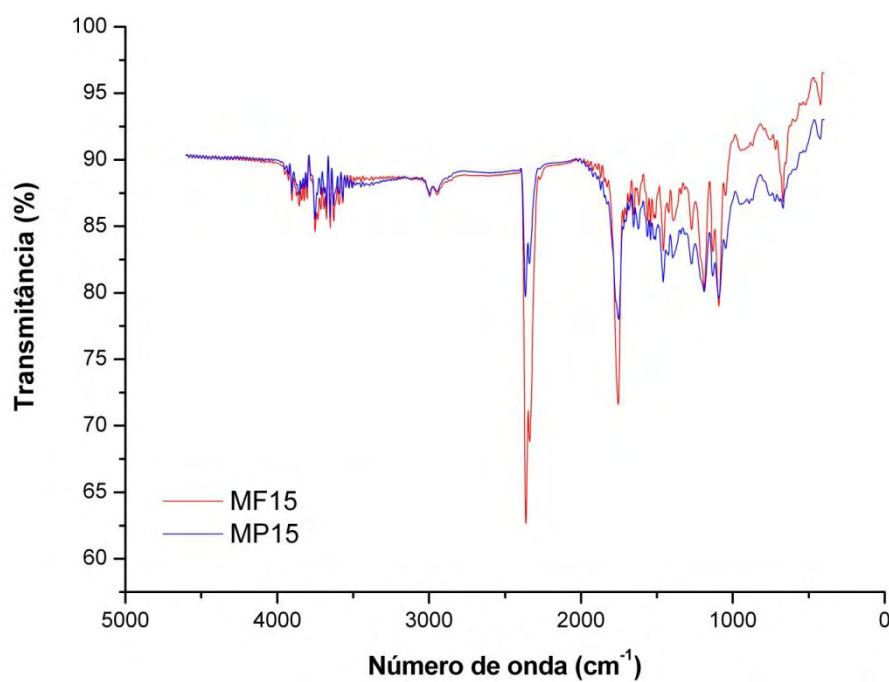


Figura 16- Espectroscopia na região do infravermelho da mistura física contendo 15% de cetorolaco (MF15) e micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco (MP15).

A Figura 17 apresenta a sobreposição dos espectros de IR da mistura física contendo 25% de CT (MF25) e da MP25.

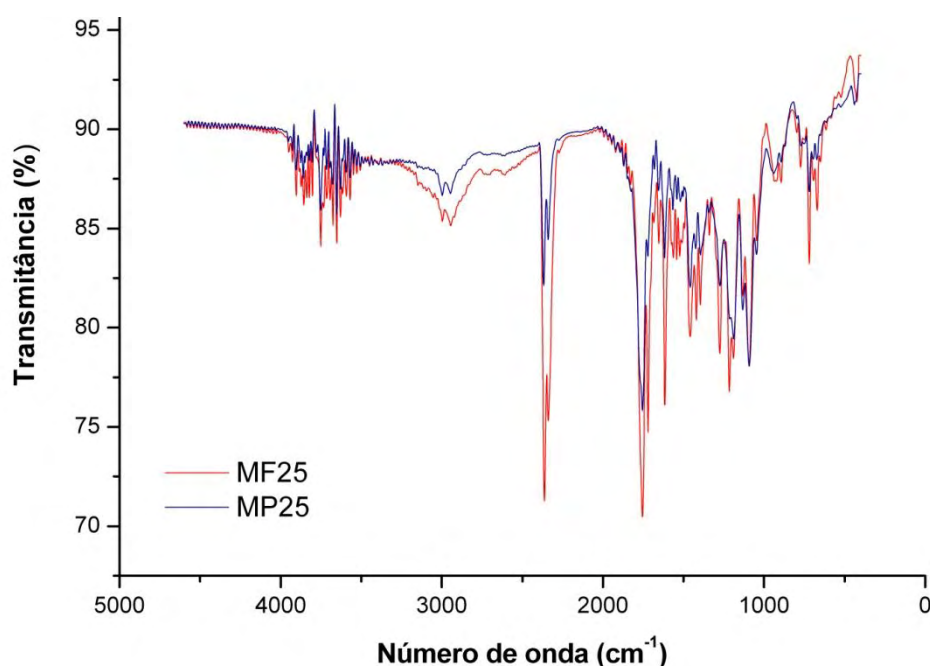


Figura 17- Espectroscopia na região do infravermelho da mistura física contendo 25% de cetorolaco (MF25) e micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco (MP25).

A Figura 18 apresenta a sobreposição dos espectros de IR da mistura física contendo 35% de CT (MF35) e da MP35.

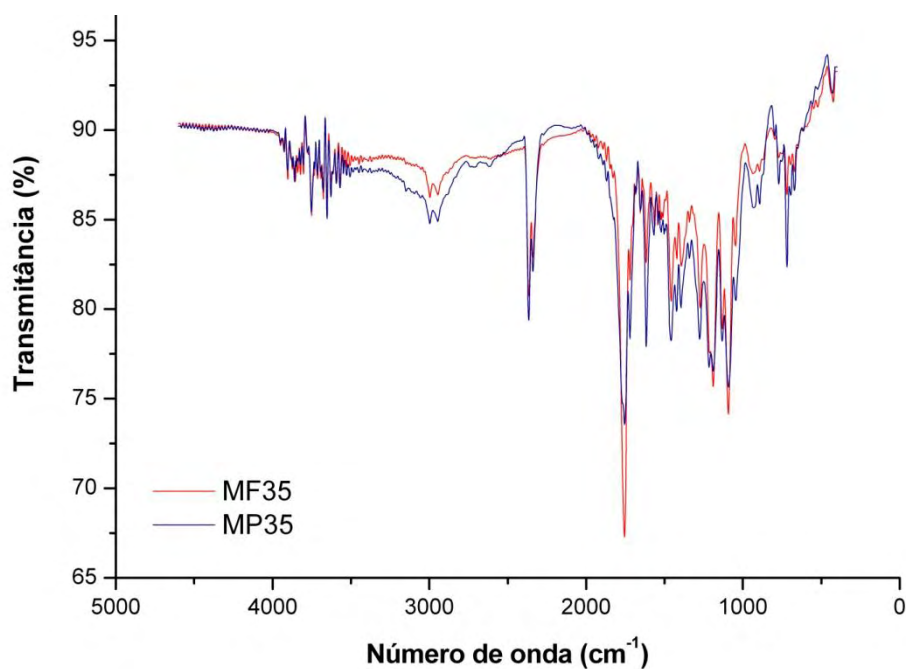


Figura 18- Espectroscopia na região do infravermelho da mistura física contendo 35% de cetorolaco (MF35) e micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco (MP35).

A Figura 19 apresenta a sobreposição dos espectros de IR da mistura física contendo 50% de CT (MF50) e da MP50.

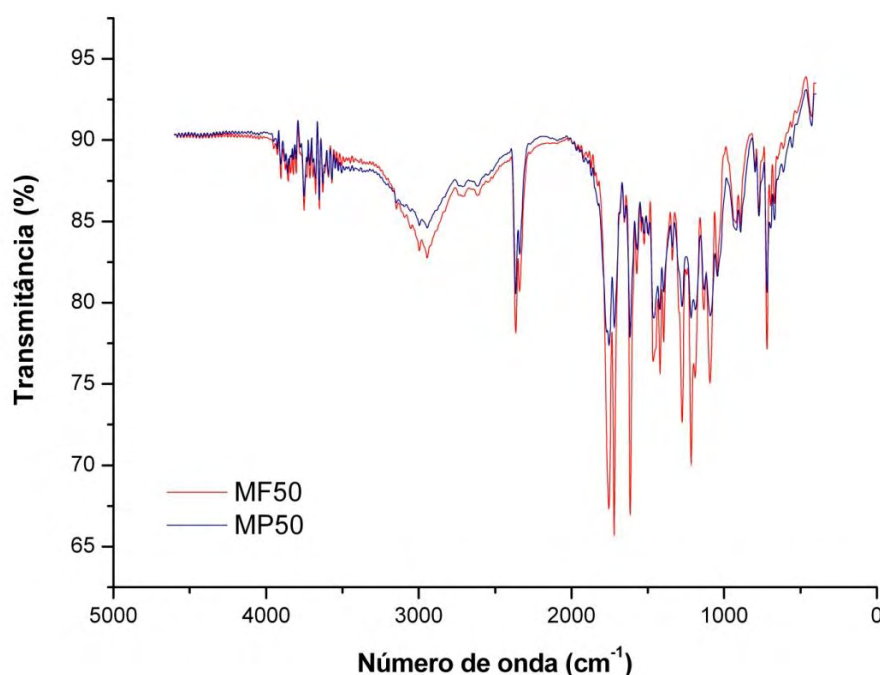


Figura 19- Espectroscopia na região do infravermelho da mistura física contendo 50% de cetorolaco (MF50) e micropartículas de PLGA contendo 50% de cetorolaco (MP50).

Todas as amostras apresentaram os picos característicos de seus constituintes, inclusive variando quanto à intensidade relativa entre eles de acordo com a proporção fármaco:polímero da amostra. Também é evidente a semelhança entre os espectros das MPs e suas respectivas MFs, que diferem apenas nas intensidades de transmitância de seus picos. Isto demonstra que a técnica de Spray drying, embora utilize temperatura e pressão durante o procedimento, não promoveu o aparecimento de bandas adicionais, além das provenientes dos constituintes.

Com intuito de facilitar a visualização da semelhança existente entre os picos dos constituintes e os da MF e MP, a Figura 20 apresenta a sobreposição dos espectros de IR do CT, PLGA, MF25 e MP25.

Observando a Figura 20, verifica-se a presença não só dos picos das C=O do CT e PLGA, mas praticamente uma fusão dos picos de cada constituinte nas MFs e MPs. Nota-

se que a C=O conjugada aparece distinta na região de 1600 cm^{-1} , enquanto as C=O das carboxilas de ambos os constituintes praticamente fundem-se em um pico mais largo na região de 1750 cm^{-1} .

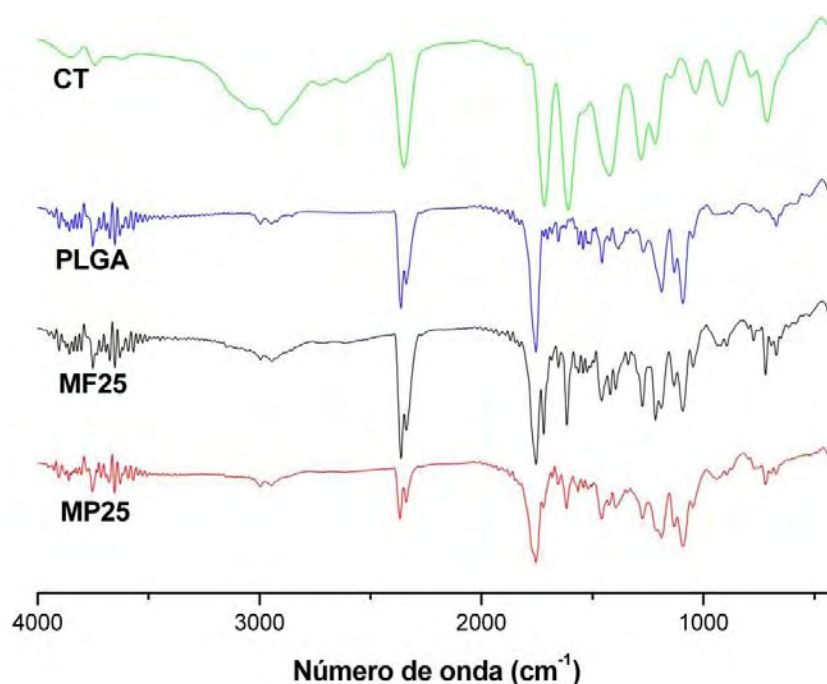


Figura 20- Espectroscopia na região do infravermelho do cetorolaco, PLGA, mistura física contendo 25% de cetorolaco (MF25) e micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco (MP25) sobrepostas.

Os resultados mostram que as condições de stress provenientes do método de obtenção não promoveram o aparecimento de novos picos nem o desaparecimento dos picos presentes no CT e no PLGA isolados.

5.2.4 – Análise térmica

5.2.4.1- Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A Figura 21 apresenta a curva de DSC do CT. Na região entre 160 e 170°C ocorre o ponto de fusão do fármaco assim com descrito pela literatura (The Merck Index, 2011). O principal evento referente à degradação é endotérmico e ocorre na região entre 250 e

320°C, seguido por um pequeno evento exotérmico com final antes dos 400°C. Acima dessa temperatura aparecem apenas eventos atribuídos à calcinação do CT.

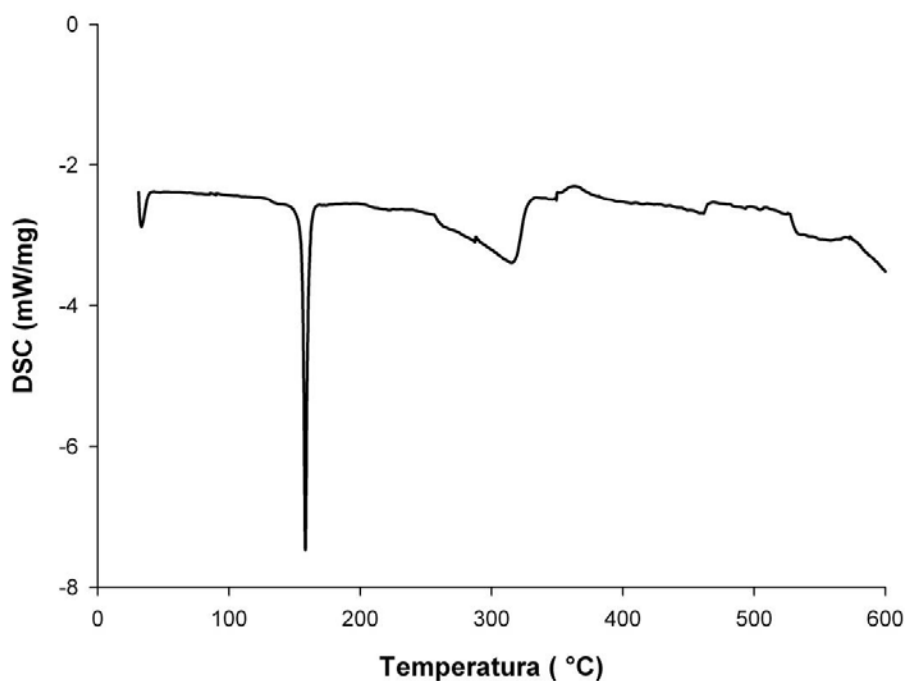


Figura 21 – Curva de DSC do cetorolaco obtida em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

A Figura 22 apresenta a curva de DSC do PLGA.

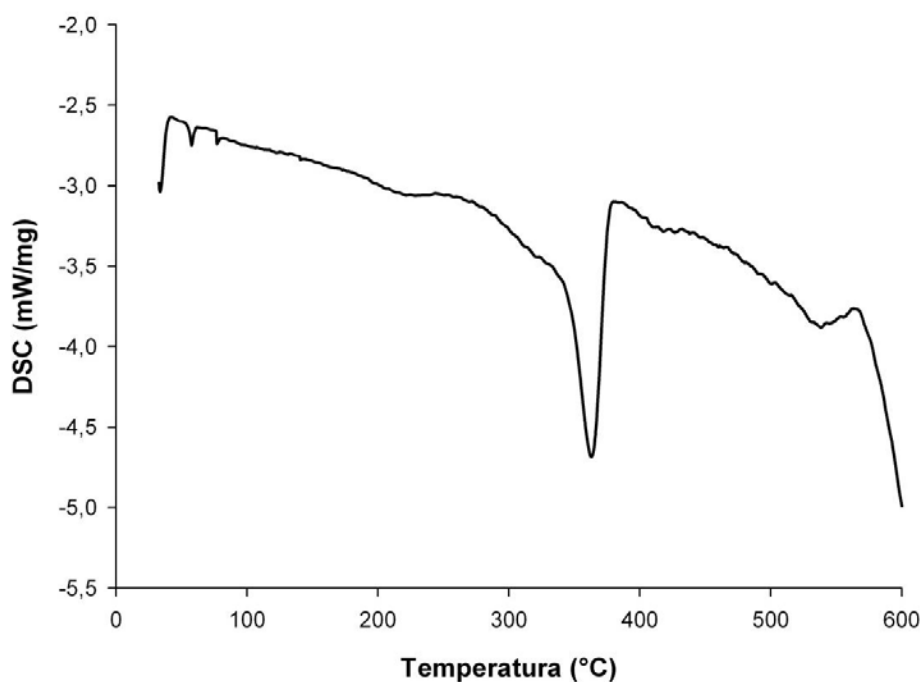


Figura 22 – Curva de DSC do PLGA obtida em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

A curva de DSC do PLGA apresenta dois pequenos eventos antes dos 100°C. O primeiro, na região de 55 a 65°C representa a transição vítrea do polímero, enquanto o segundo acima de 70°C pode ser atribuído a perda de umidade. O evento de degradação se inicia aproximadamente em 250°C e termina pouco antes dos 400°C. Na região entre 400 e 600°C ocorrem os eventos de degradação do ácido lático e ácido glicólico residuais.

É importante ressaltar, que diferentemente do PLGA 50:50 utilizado em nossos trabalhos anteriores (SILVA-JUNIOR et al, 2008a; ROSSANEZI, 2008), o PLGA 85:15 apresenta o evento de transição vítrea em temperaturas mais altas. Tais diferenças indicam uma maior estabilidade térmica do polímero empregado (CRAIG; READING, 2007).

A Figura 23 apresenta as curvas de DSC das amostras MF15 e MP15.

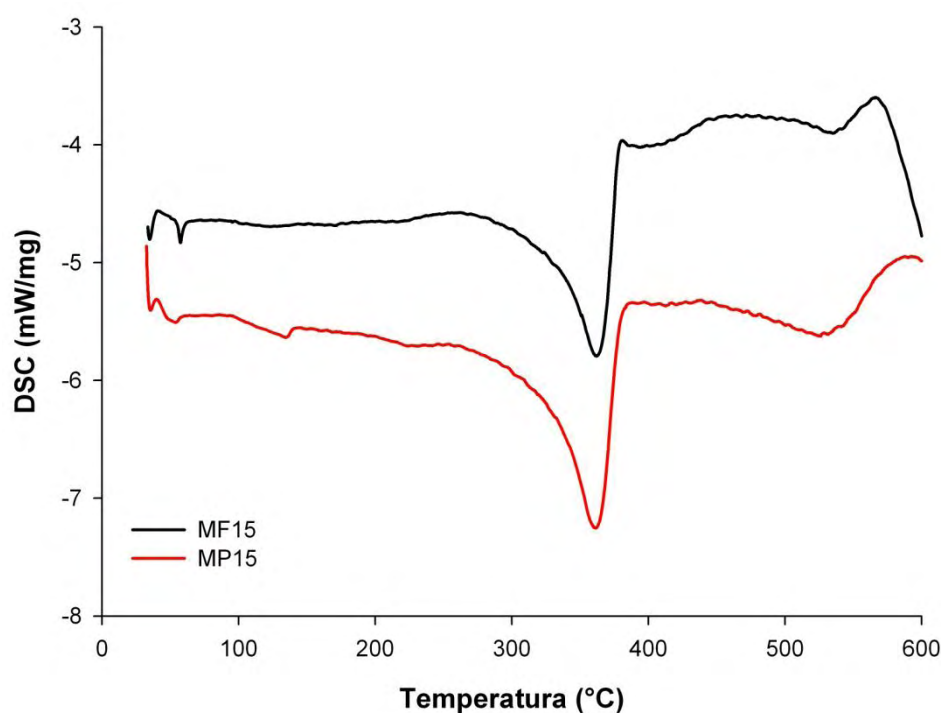


Figura 23 – Curvas de DSC da mistura física contendo 15% de cetorolaco (MF15) e das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco (MP15) obtidas em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

Na figura acima observa-se que os eventos de degradação do PLGA das duas amostras estão bastante semelhantes, entretanto devido à baixa concentração de CT nas amostras, os eventos de degradação e fusão referentes a ele são bastante discretos, principalmente na MF, porém eles existem e os valores de energia consumidos nesses eventos estão discriminados na Tabela 2. Também pode-se observar que os perfis apresentados nas curvas são semelhantes, mas os eventos da MP15 ocorrem em regiões de maiores consumos de energia.

A Figura 24 apresenta as curvas DSC das amostras MF25 e MP25. Nesta figura os picos característicos da fusão do CT aparecem mais definidos devido à maior concentração do mesmo nas amostras, com um deslocamento do pico para região de menor temperatura na amostra MP25. Os eventos de degradação do fármaco também estão mais intensos e ocorrem simultaneamente com o evento de degradação do polímero.

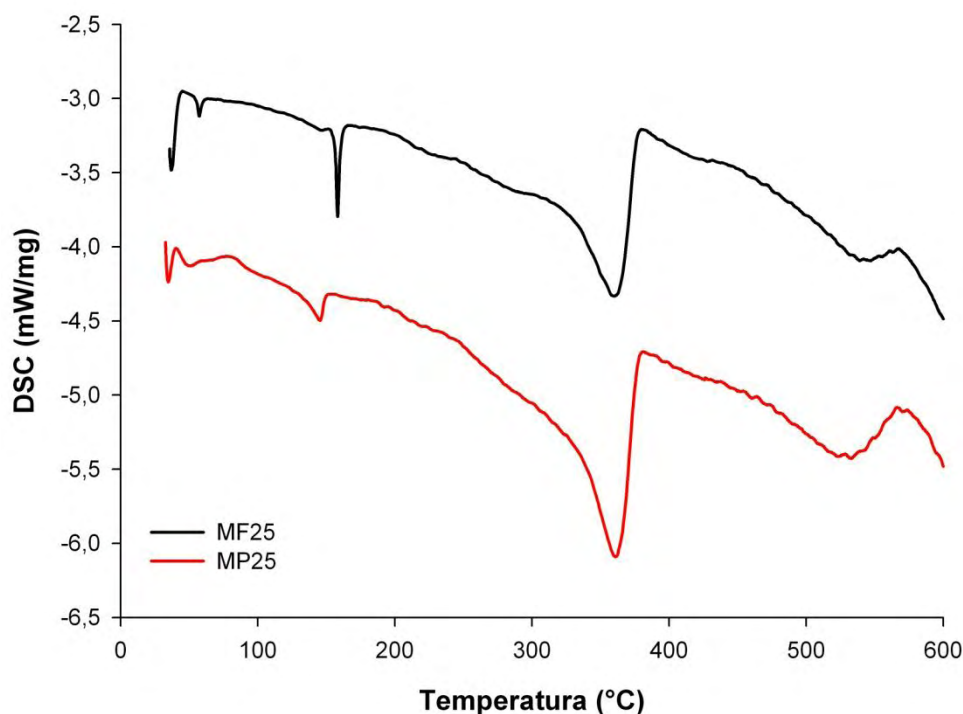


Figura 24 – Curvas de DSC da mistura física contendo 25% de cetorolaco (MF25) e das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco (MP25) obtidas em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

A Figura 25 apresenta curvas de DSC das amostras MF35 e MP35.

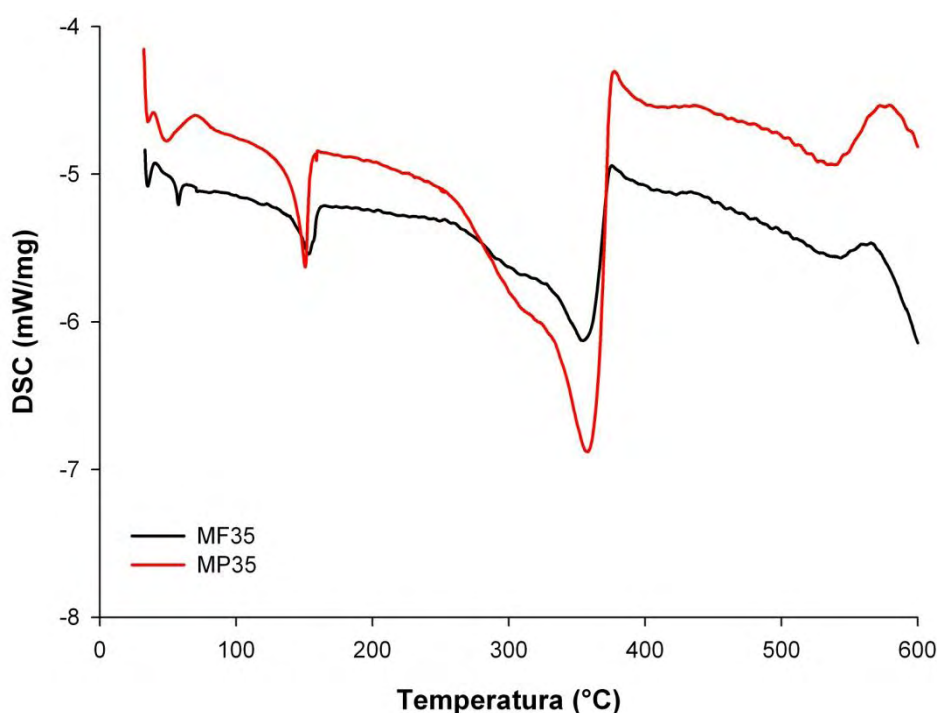


Figura 25 – Curvas de DSC da mistura física contendo 35% de cetorolaco (MF35) e das micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco (MP35) obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 a 50mL/min e razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

Assim como na Figura 24, esta apresenta os eventos mais definidos, refletindo o aumento da concentração de CT. Nestas amostras torna-se um pouco mais evidente a diferença entre os picos atribuídos à transição vítrea do polímero, com o evento de fusão em temperaturas semelhantes e os eventos de degradação dos constituintes sobrepostos.

A Figura 26 apresenta as curvas de DSC das amostras MF50 e MP50. Nestas amostras se observa os mesmos deslocamentos nos picos dos eventos apresentados nas amostras anteriores. Contudo na amostra MF50 a equivalência em massa de fármaco e polímero faz com que os eventos de degradação apareçam bastante distintos em duas etapas, enquanto a amostra MP50 apresenta um único evento de degradação bastante intenso, indicativo da sobreposição dos eventos. O evento de degradação do CT deslocado para temperaturas maiores junto ao do polímero indicam algum tipo de interação entre eles, e também uma melhora na estabilidade térmica do fármaco.

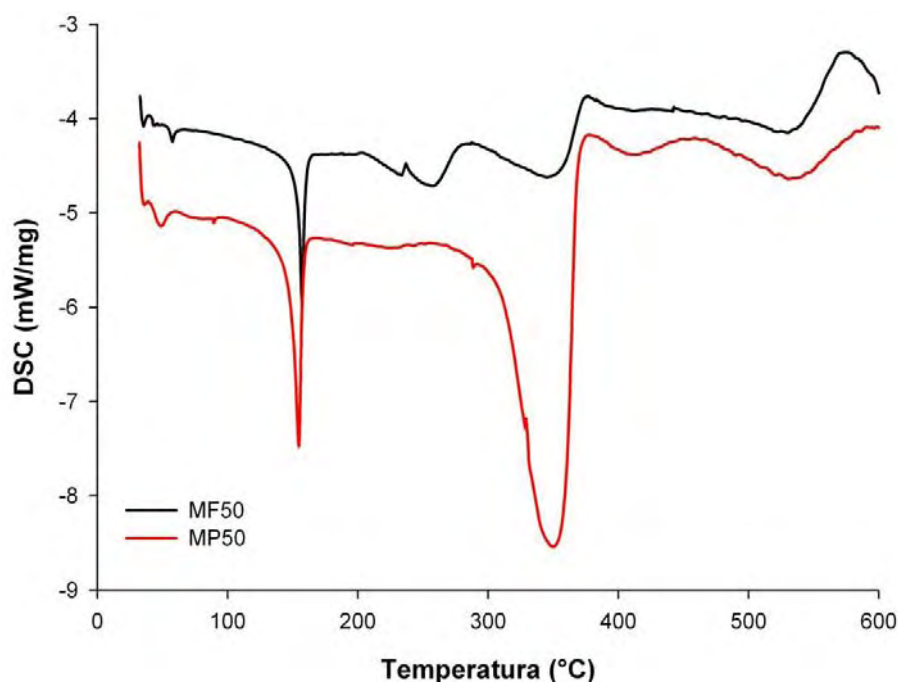


Figura 26 – Curvas de DSC da mistura física contendo 50% de cetorolaco (MF50) e das micropartículas de PLGA contendo 50% de cetorolaco (MP50) obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 a 50mL/min e razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

Como eram esperados, os eventos referentes à fusão do fármaco tiveram sua intensidade aumentada conforme sua proporção dentro das amostras aumentava. A variação dos valores de entalpias dos eventos de transição vítrea do PLGA, fusão do CT e degradação do CT-PLGA de acordo com suas respectivas concentrações nas formulações podem ser observados através da figura 27.

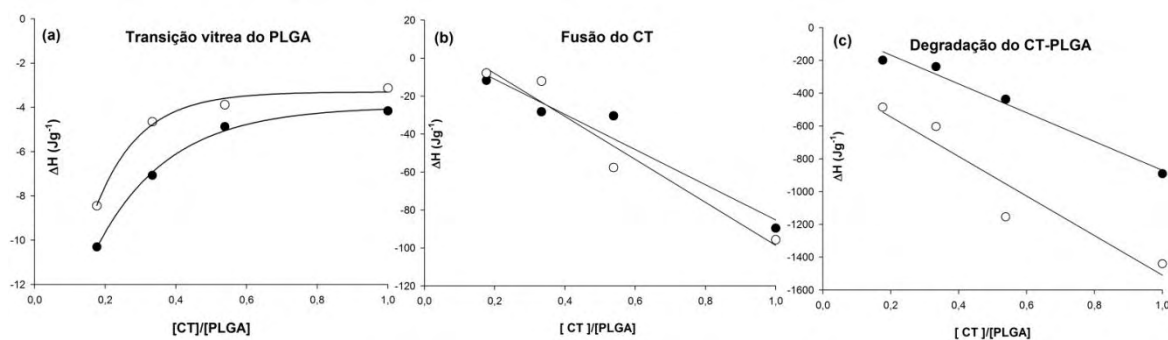


Figura 27- Correlação entre valores de entalpia e as razões de concentração de cetorolaco/PLGA nos eventos de transição vítrea do PLGA (a), fusão do cetorolaco (b) e degradação do cetorolaco-PLGA (c) para as amostras de misturas físicas (●) e micropartículas (○).

A transição vítrea é um parâmetro importante a ser estudado no comportamento mecânico de polímeros, por sua relação com a mobilidade das cadeias poliméricas. Este fator tem importante papel no entendimento das propriedades mecânicas do polímero, podendo, por exemplo, permitir ou não a difusão de pequenas moléculas através da matriz polimérica (KIM et al, 2007; SILVA-JUNIOR et al, 2008b). Na figura 27(a) há tendência de aumento nos valores de entalpia correspondentes aos eventos de transição vítrea com o aumento da razão CT/PLGA com patamar na razão 1:1. Os perfis traçados por curvas de tendência obedecem ao mesmo perfil de curva saturação, indicando que em concentrações menores de PLGA a entalpia de transição vítrea tende a estabilização, e no caso das micropartículas os valores de entalpia são um pouco maiores. As entalpias dos eventos de fusão do CT (figura 27b) aumentam de acordo com a concentração de fármaco na formulação. Quando calculadas as regressões lineares entre os valores de correlação para o evento de fusão do CT observa-se a sobreposição das linhas de tendência, indicando a semelhança entre os comportamentos das MFs ($y = -2,13 + 26,65x$) e MPs ($y = -2,70 + 41,20x$). Especialmente nos eventos de degradação (figura 27c) observam-se diferenças consideráveis entre os valores de entalpia para MPs e MFs, ou seja, foram necessários maiores níveis de energia para degradar os constituintes no caso das MPs, o que pode ser indicativo da melhor estruturação ou organização do sistema (CRAIG; READING, 2007).

Como neste caso os eventos de degradação do CT e PLGA ocorrem simultaneamente, não é possível separar os valores de entalpia de cada evento. O aumento das entalpias nas formulações com maiores concentrações de CT, indicam que a degradação de uma determinada concentração de CT consome mais energia que a mesma concentração de PLGA.

Os principais eventos das curvas de DSC com seus respectivos valores de entalpia e temperaturas de ocorrência estão descritos na tabela 2. Os dados de DSC confirmam

que as intensidades dos picos aumentam e diminuem conforme a proporção do constituinte a que está relacionado na formulação.

Tabela 2 - Valores de entalpia analisados por DSC durante os eventos térmicos das misturas físicas e micropartículas de PLGA contendo cetorolaco.

Formulação	Transição vítrea PLGA	Fusão CT	Degradação CT-PLGA
MF15	54,97-58,33°C [$\Delta H = -10,3 \text{ Jg}^{-1}$]	140,43 -157,90°C [$\Delta H = -11,72 \text{ Jg}^{-1}$]	323.60-385,67°C [$\Delta H = -193,8 \text{ Jg}^{-1}$]
MF25	55,04-59,12°C [$\Delta H = -7,07 \text{ Jg}^{-1}$]	156,31-160,54°C [$\Delta H = -28,27 \text{ Jg}^{-1}$]	329,03-387,45°C [$\Delta H = -238,2 \text{ Jg}^{-1}$]
MF35	55,08-59,24°C [$\Delta H = -4,87 \text{ Jg}^{-1}$]	142,84- 160,12°C [$\Delta H = -30,43 \text{ Jg}^{-1}$]	333,09-375,80°C [$\Delta H = -437,2 \text{ Jg}^{-1}$]
MF50	55,00-60,33°C [$\Delta H = -4,16 \text{ Jg}^{-1}$]	153,60-161,42°C [$\Delta H = -89,57 \text{ Jg}^{-1}$]	297,41-378,45°C [$\Delta H = -891,0 \text{ Jg}^{-1}$]
MP15	41,27-59,66°C [$\Delta H = -8,45 \text{ Jg}^{-1}$]	116,57-148,83°C [$\Delta H = -7,89 \text{ Jg}^{-1}$]	330.50-390,56°C [$\Delta H = -485,30 \text{ Jg}^{-1}$]
MP25	41,67-54,87°C [$\Delta H = -4,15 \text{ Jg}^{-1}$]	134,30-152,90°C [$\Delta H = -12,18 \text{ Jg}^{-1}$]	327,64-379,45°C [$\Delta H = -602,70 \text{ Jg}^{-1}$]
MP35	40,64-61,63°C [$\Delta H = -3,88 \text{ Jg}^{-1}$]	148,31-164,44°C [$\Delta H = -57,65 \text{ Jg}^{-1}$]	316,32-380,55°C [$\Delta H = -1154 \text{ Jg}^{-1}$]
MP50	41,22-62,78°C [$\Delta H = -3,43 \text{ Jg}^{-1}$]	140,69-160,57°C [$\Delta H = -95,67 \text{ Jg}^{-1}$]	322,39-379,88°C [$\Delta H = -1440,3 \text{ Jg}^{-1}$]

Para facilitar a visualização das alterações ocorridas nos eventos térmicos das MP em relação aos dos seus constituintes, a figura 28 apresenta o as curvas de DSC do CT, PLGA, MF35 e MP35.

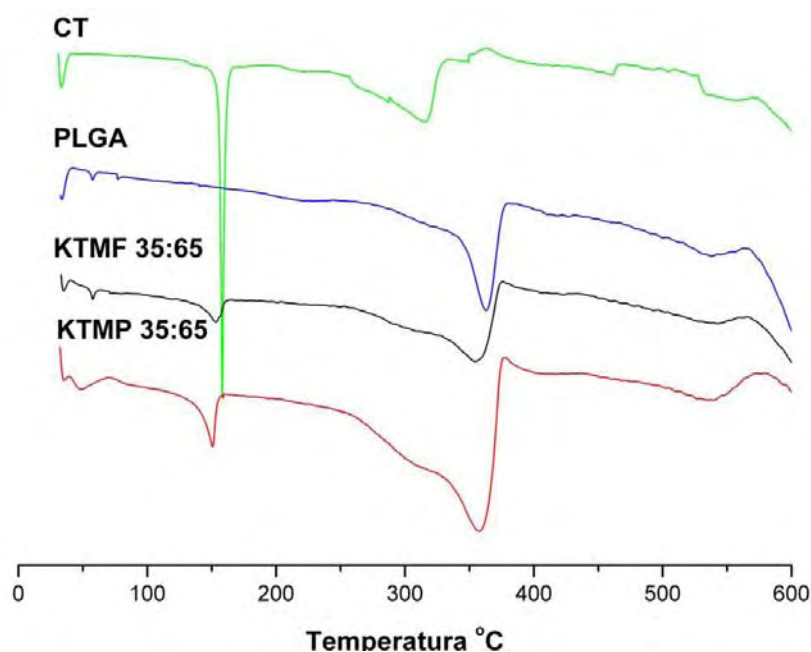


Figura 28 – Curvas de DSC do cetorolaco, do PLGA, da mistura física contendo 35% de cetorolaco (MF35) e das micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco (MP35), obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 a 50mL/min e razão de aquecimento $10 \text{ }^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$.

A visualização conjunta dos resultados permite a melhor percepção dos deslocamentos dos picos de transição vítrea e fusão do fármaco para regiões mais baixas de temperaturas. Da mesma maneira percebe-se que o início do evento de degradação do CT nas MP ocorre em temperaturas um pouco mais altas quando comparado ao CT puro.

5.2.4.2- Termogravimetria e Termogravimetria derivada (TG/DTG)

As análises de TG e DTG foram conduzidas de acordo com a metodologia proposta para as amostras CT, PLGA, MP15, MP25, MP35 e MP50 e as misturas físicas correspondentes.

As curvas de TG e DTG do CT estão apresentadas na figura 29. A curva de TG apresenta somente um evento representando a degradação do fármaco em etapa única na região de 190 a 250°C. Acima desta temperatura apenas ocorre a perda de massa dos resíduos por calcinação. A curva de DTG confirma estes dados.

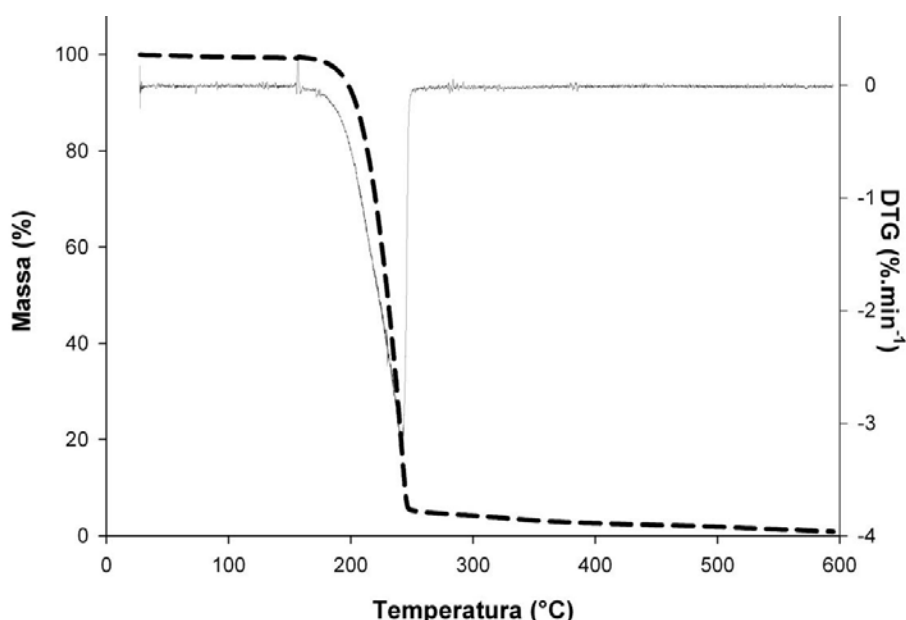


Figura 29- Curvas de TG e DTG do cetorolaco obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

A figura 30 apresenta as curvas de TG e DTG do PLGA.

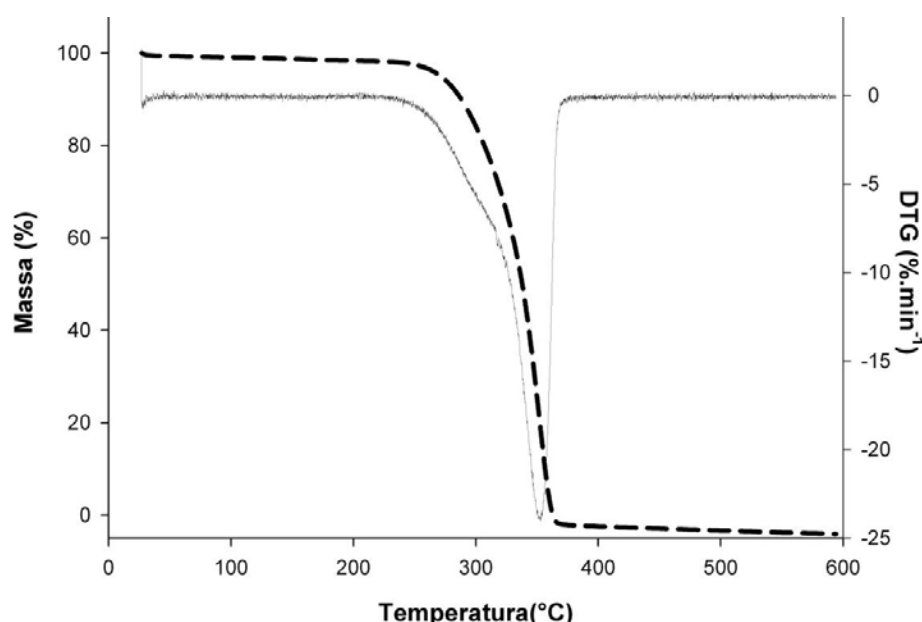


Figura 30- Curvas de TG e DTG do PLGA obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

Assim como a curva de TG do CT, a do PLGA apresenta apenas um evento com perda de massa atribuído a etapa única da degradação na região de 250 a 350°C, e coincidente com os dados da DTG.

As curvas de TG da MF15 e MP15 estão representadas na figura 31. As curvas apresentam perfis semelhantes. Em ambas é possível distinguir dois eventos de perda de massa, um na região de 190°C a 250°C, atribuído ao CT e em seguida o início do evento de degradação do PLGA. Observa-se ainda, que parte final do evento de degradação do CT e o início do evento de degradação do PLGA ocorrem na mesma região de temperatura, como descrito nas análises de DSC. Por essa razão é impossível delimitar um valor específico de temperatura para o término de um evento e início do outro, de forma que a temperatura de 250°C foi citada apenas para dar uma ideia da temperatura em que ocorre a transição entre os dois eventos.

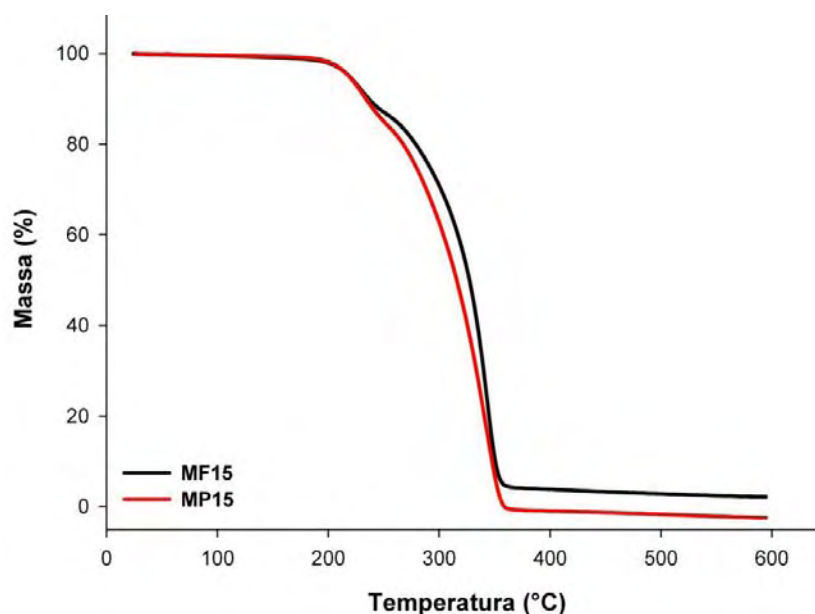


Figura 31- Curvas de TG da mistura física contendo 15% de cetorolaco (MF15) e das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco (MP15) obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

As curvas de DTG das amostras MF15 e MP15 (figura 32) confirmam os eventos observados na figura anterior, com maior facilidade para visualizar os eventos de degradação do CT e do PLGA separados.

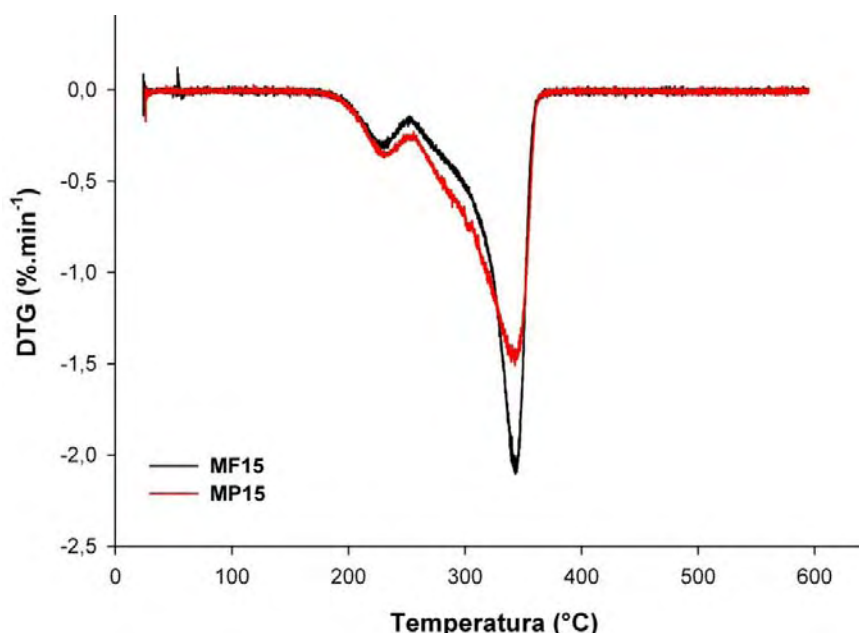


Figura 32- Curvas de DTG da mistura física contendo 15% de cetorolaco (MF15) e das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco (MP15) obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

A figura 33 apresenta as curvas de TG para as amostras MF25 e MP25.

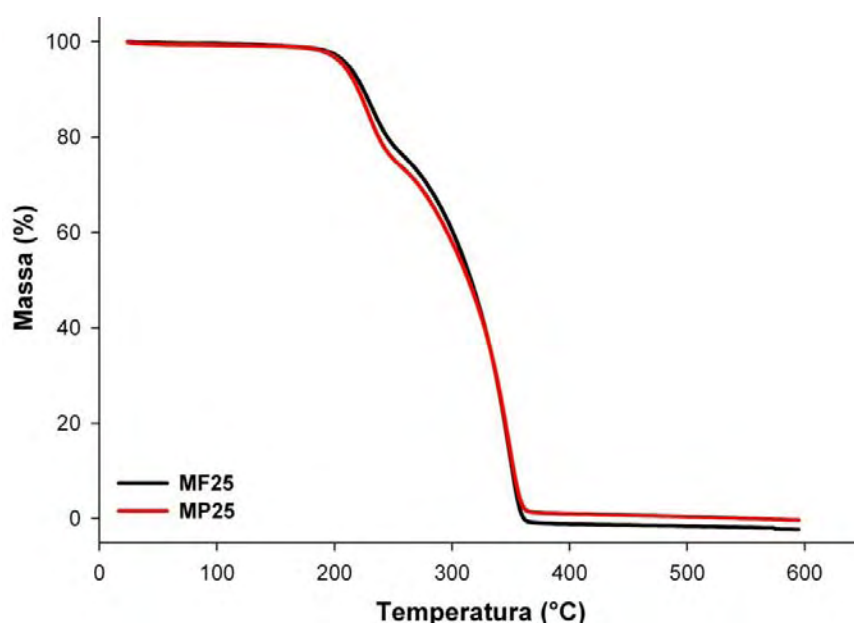


Figura 33- Curvas de TG da mistura física contendo 25% de cetorolaco (MF25) e das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco (MP25) obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

As curvas de DTG das amostras MF25 e MP25 (figura 34) demonstram os eventos de degradação referentes ao CT e PLGA bastante distintos, e também relacionar as intensidades dos picos de cada evento com a concentração de cada constituinte nas amostras.

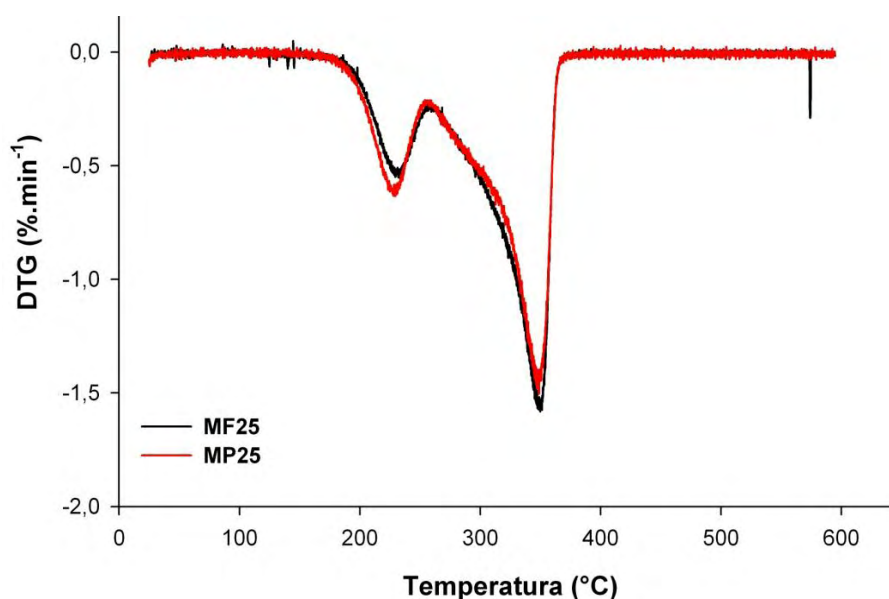


Figura 34- Curvas de DTG da mistura física contendo 25% de cetorolaco (MF25) e das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco (MP25) obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

As figuras 35 representa as curvas de TG para as amostras MF35 e MP35.

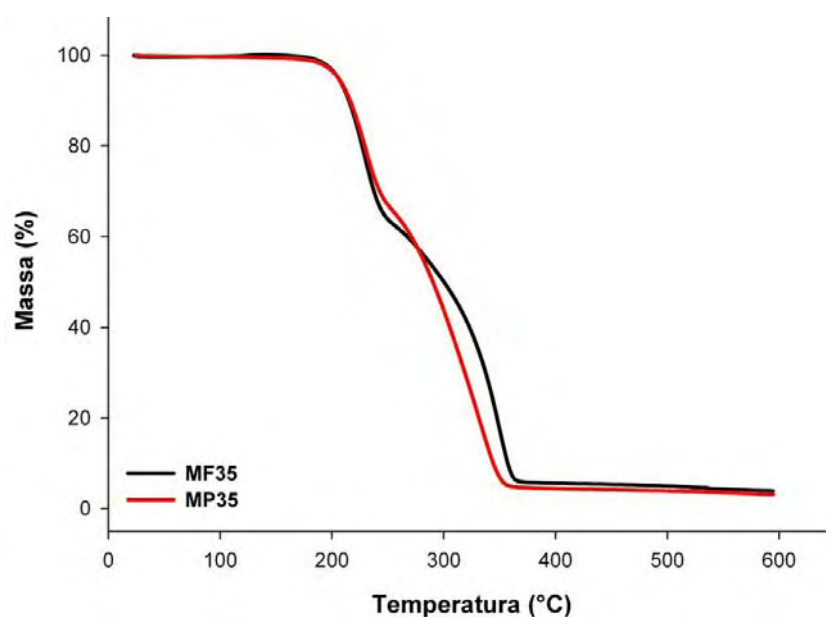


Figura 35- Curvas de TG da mistura física contendo 35% de cetorolaco (MF35) e das micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco (MP35) obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

A figura 36 representa as curvas de TG para as amostras MF35 e MP35.

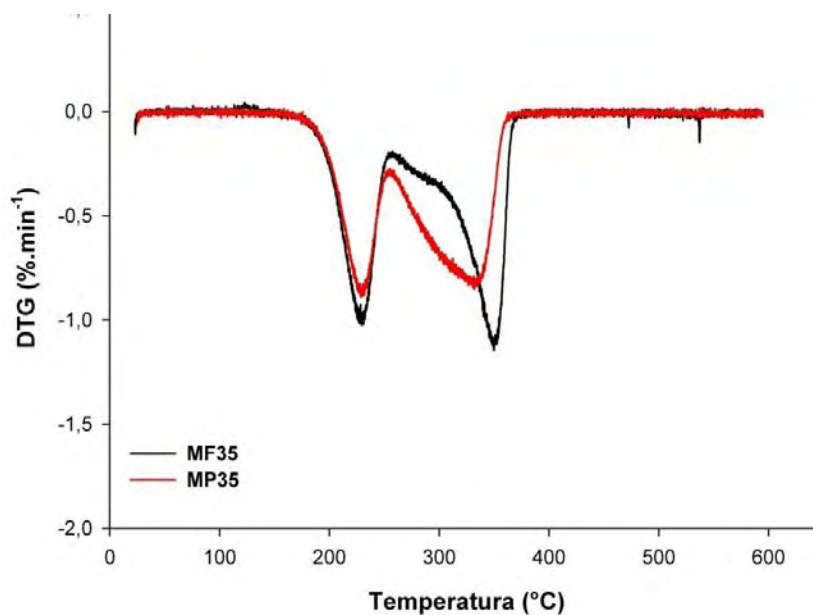


Figura 36- Curvas de DTG da mistura física contendo 35% de cetorolaco (MF35) e das micropartículas de PLGA contendo 35% de cetorolaco (MP35) obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

As curvas de TG mostram que embora os eventos de perda de massa dos constituintes possam ser visualizados de forma separadas em ambas as amostras, a MP35 apresenta o evento de degradação do polímero ocorrendo de forma mais intensa em temperaturas próximas a 260°C, indicando interação entre eles. Este fenômeno é confirmado nas curvas de DTG, onde o segundo evento de degradação da MP35 aparece um pouco deslocado para regiões de menores temperaturas. Ainda observando a curva de DTG da MP35, o evento de degradação do PLGA aparece como uma etapa única em um pico mais largo e achatado, diferente do que ocorre na MF35 onde se observa duas etapas distintas (CRAIG; READING, 2007).

As figuras 37 e 38 representam respectivamente as curvas de TG e DTG das amostras MF50 e MP50.

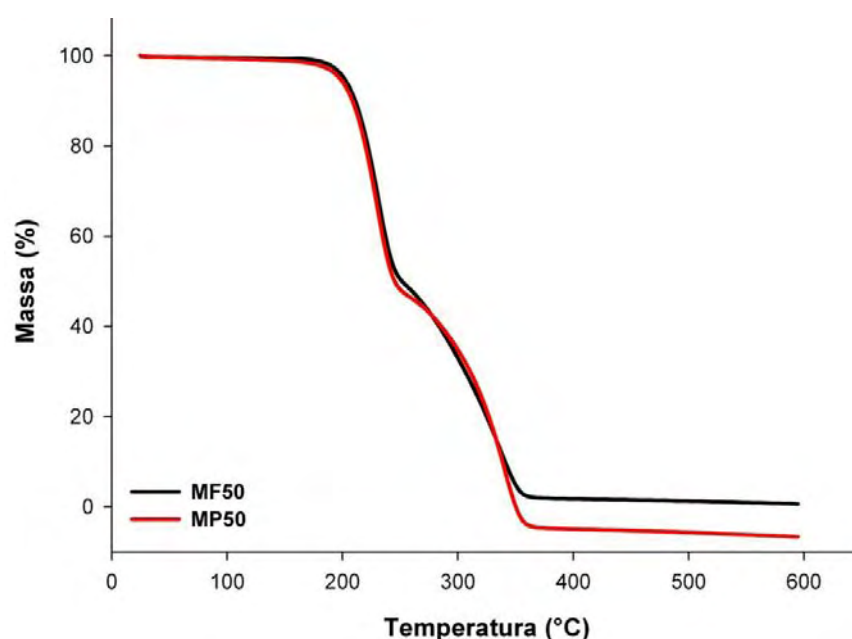


Figura 37- Curvas de TG da mistura física contendo 50% de cetorolaco (MF50) e das micropartículas de PLGA contendo 50% de cetorolaco (MP50) obtidas em atmosfera de nitrogênio (50mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹).

As curvas de TG e DTG apresentaram comportamentos semelhantes aos das demais amostras. Especialmente na DTG o evento referente ao CT apresenta-se mais intenso que o do PLGA, acompanhando o aumento da proporção de fármaco na amostra.

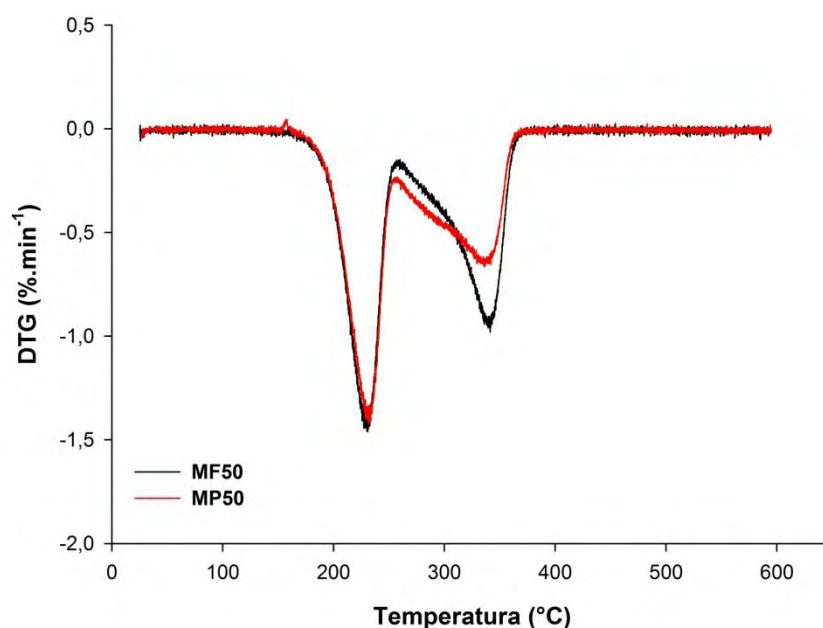


Figura 38- Curvas de DTG da mistura física contendo 50% de cetorolaco (MF50) e das micropartículas de PLGA contendo 50% de cetorolaco (MP50) obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

Da mesma forma em ocorre na amostra MP35, a curva de DTG da MP50 apresenta o evento de degradação do polímero em etapa única, mas abrangendo a mesma região de temperatura do evento correspondente das MFs.

Todos os eventos descritos nas curvas de TG, suas respectivas perdas de massa e as temperaturas de ocorrência estão presentes na tabela 3.

Tabela 03- Valores de perda de massa durante os eventos descritos nas análises de TG..

Amostra	Degradação CT	Degradação PLGA
MF15	181-238°C [$\Delta m = 11,89\%$]	239-366°C [$\Delta m = 81,80\%$]
MF25	178-255°C [$\Delta m = 23,31\%$]	257-360°C [$\Delta m = 75,49\%$]
MF35	179-245°C [$\Delta m = 32,79\%$]	246-370°C [$\Delta m = 62,12\%$]
MF50	179-248°C [$\Delta m = 47,96\%$]	249-360°C [$\Delta m = 48,41\%$]
MP15	176-251°C [$\Delta m = 14,44\%$]	252-366°C [$\Delta m = 88,30\%$]
MP25	180-249°C [$\Delta m = 23,42\%$]	250-361°C [$\Delta m = 73,60\%$]
MP35	180-245°C [$\Delta m = 32,59\%$]	246-358°C [$\Delta m = 62,87\%$]
MP50	179-248°C [$\Delta m = 48,75\%$]	249-363°C [$\Delta m = 50,89\%$]

Os valores de Δm apresentados na tabela 3 são condizentes com concentração dos respectivos constituintes em cada amostra analisada. Pequenas massas residuais após as perdas por degradação do CT e PLGA, são correspondentes aos resíduos calcinados.

Para facilitar a visualização das alterações ocorridas nos termogramas e respectivas derivadas das MP em relação aos dos seus constituintes, as curvas de TG do CT, PLGA, MF25 e MP25 foram reunidas na figura 39.

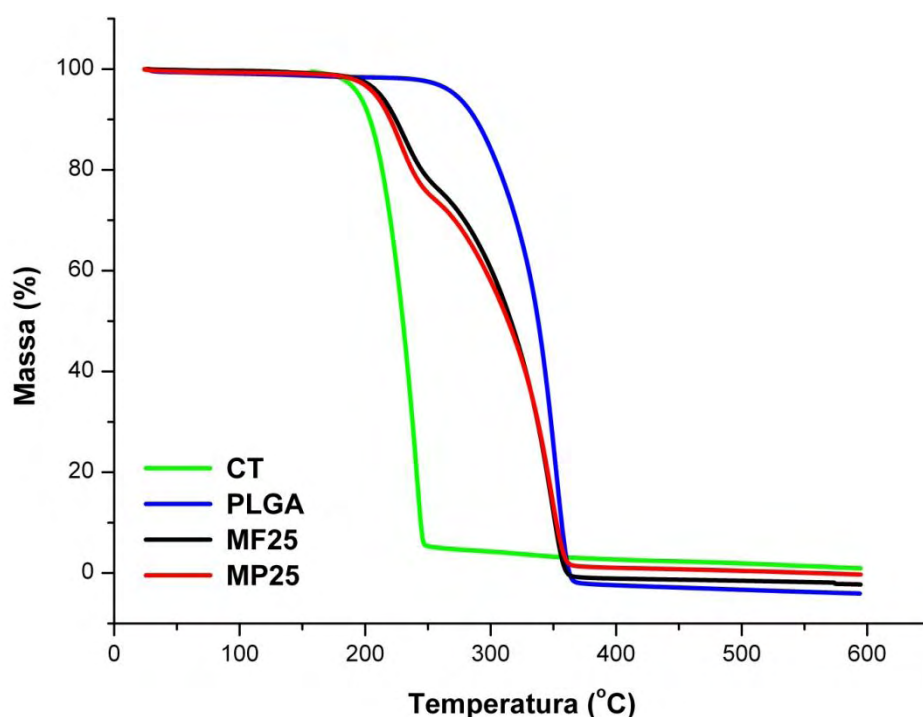


Figura 39 – Curvas de TG do cetorolaco, do PLGA, da mistura física contendo 25% de cetorolaco (MF25) e das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco (MP25) obtidas em atmosfera de nitrogênio (50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹).

A análise desses resultados mostra a maior evidência de interação entre o CT e o PLGA, onde as perdas de massas na MF e MP ocorrem em temperaturas intermediárias as dos seus constituintes, assumindo particularidades de ambas as curvas.

A figura 40 apresenta curvas de DTG do CT, PLGA, MF25 e MP25 sobrepostas. Observando os resultados da figura verifica-se que os resultados do CT e PLGA ocorrem

simultaneamente nas demais amostras com pequenos deslocamentos destacados anteriormente.

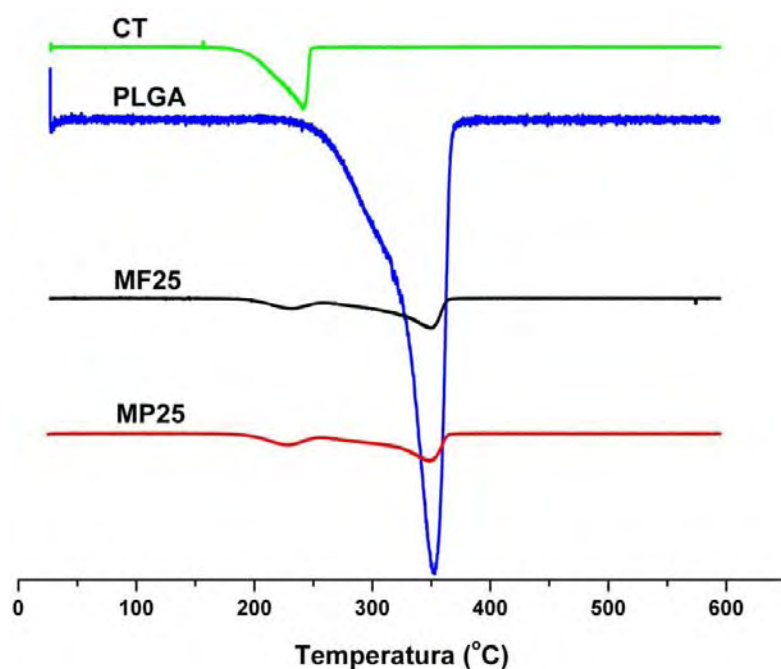


Figura 40 – Curvas de DTG do cetorolaco, do PLGA, da mistura física contendo 25% de cetorolaco (MF25) e das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco (MP25) obtidas em atmosfera de nitrogênio (50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹).

Após realizadas todas as análises térmicas pode-se sugerir que a técnica de Spray drying, empregada para obtenção das MPs, não provoca alterações de forma significativa a estabilidade térmica do CT e do PLGA, confirmando os resultados apresenta pelos ensaios de IR. Entretanto as alterações constatadas em alguns eventos térmicos, somadas com os resultados de IR, sugerem a uma possível presença de diferentes polimorfos do cetorolaco nas MFs e MPs, contudo tais hipóteses somente podem ser confirmadas com a realização dos ensaios de difração de raios-X.

5.2.5- Difração de raios-X (DRX)

Os resultados de análise térmica mostraram que apesar do emprego de temperaturas e solventes orgânicos o método de microencapsulação não altera a estabilidade térmica dos

componentes. Contudo, estudos anteriores explicam que a diferença na intensidade dos picos nas MFs e MPs podem estar relacionadas à organização estrutural do fármaco na matriz polimérica (SILVA-JUNIOR et al, 2008a e 2008b). Dessa forma as análises por difração de raios-X podem auxiliar o entendimento destes fenômenos.

Estudos de Sohn e Seo (2004) (figura 41) demonstraram que o CT apresenta 4 polimorfos denominados formas I, II, III e IV, e que essas formas, embora apresentem atividades terapêuticas semelhantes, possuem perfis de dissolução diferentes.

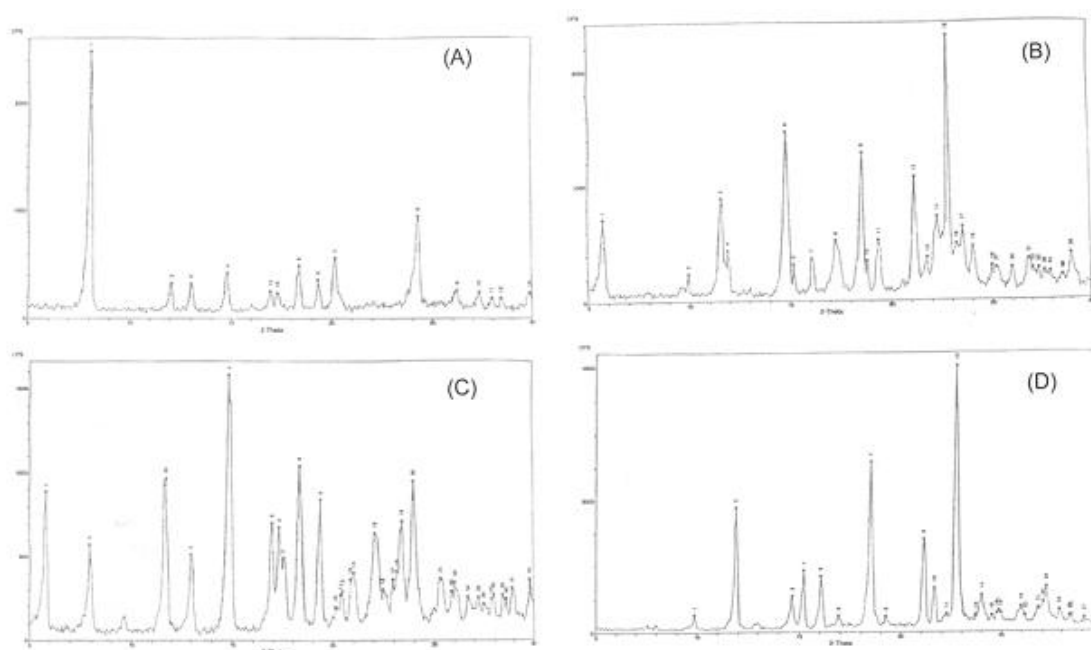


Figura 41 – Difratoograma de raios-X das formas I(A), II(B), III(C) e IV(D) do cetorolaco obtidos em 2θ 5-30° (SOHN; SEO, 2004)

A figura 41 apresenta os difratogramas de raios-X dos quatro polimorfos do CT descritos na literatura. Embora vários dos picos apresentados pelos polimorfos sejam coincidentes, a intensidade relativa entre eles é diferente. A tabela 4 descreve os quatro picos de cristalinidade com maior intensidade apresentados pelas formas I, II, III e IV, em ordem decrescente de intensidade (SOHN; SEO, 2004).

Tabela 4 – Picos de cristalinidade com maiores intensidades dos polimorfos do cetorolaco.

Polimorfo do CT	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
Forma I	8°	24°	20°	18°
Forma II	23°	15°	18°	21°
Forma III	15°	18°	12°	24°
Forma IV	23°	18°	12°	21°

A figura 42 apresenta o difratograma de raios-X do CT. Analisando o difratograma do CT juntamente com os termogramas conclui-se que o polimorfo predominante é a forma I descrita por Sohn e Seo (2004), na qual os picos de maior intensidade em ordem decrescente estão em 8°, 24°, 20° e 18° na escala de 2 θ . A única diferença apresentada pelo CT utilizados em nossos estudos em relação à forma I descrita pelos autores foi inversão na intensidade dos picos de 18° e 20°, entretanto, observa-se todos os demais picos descritos pelos autores.

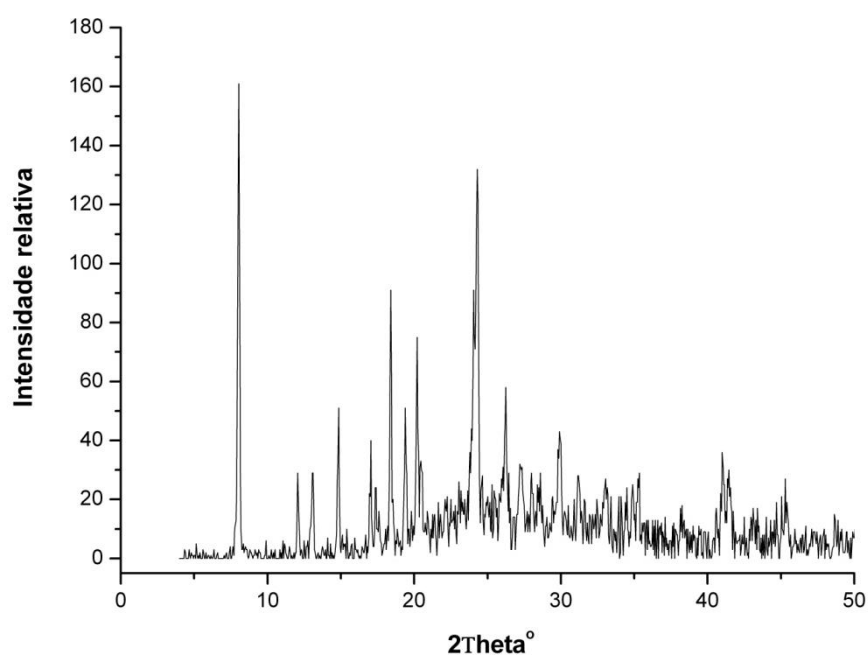


Figura 42- Difratograma de raios-X do cetorolaco obtido em 2 θ 4-50°.

A figura 43 apresenta o difratograma de raios-X do PLGA.

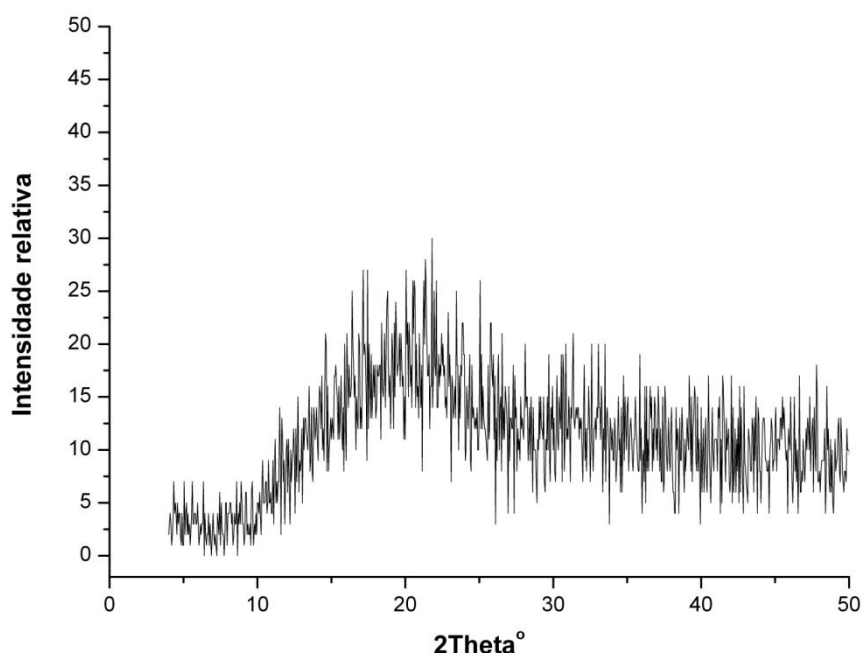


Figura 43- Difratograma de raios-X do PLGA 85:15 obtido em 2θ 4-50°.

Embora o PLGA 85:15 possua proporções diferentes de ácido lático e ácido glicólico, ele também não apresentou picos característicos de cristalinidade no difratograma de raios-X, comportando-se da mesma forma que o PLGA 50:50 (SILVA-JUNIOR et al, 2008b). A ausência de picos de fusão e a transição vítrea em temperaturas entre 50 e 60°C são indicativos do estado amorfo do polímero, entretanto esta confirmação somente pôde ser realizada através da análise por difração de raios-X.

A figura 44 apresenta a sobreposição dos difratogramas de raios-X obtidos para as amostras CT, PLGA e diferentes MPs na região de 2θ 4-50°.

A amostra MP50 apresenta picos de cristalinidade em 24°, 18°, 17°, 20°, 15° e 13°, tais picos indicam a presença de uma mistura dos polimorfos I e II (Figura 39). Na amostra MP35 os picos em 17°, 15° e 13° já não aparecem definidos como na MP50, e mesmo os demais picos se apresentam com intensidades relativas bastante reduzidas.

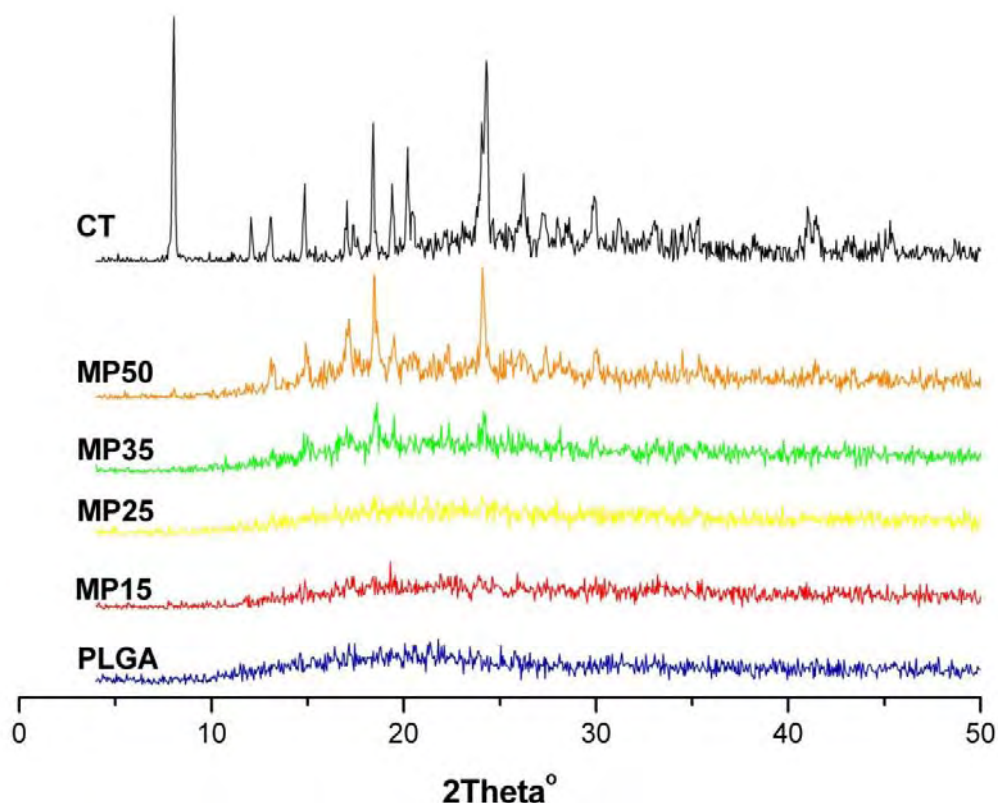


Figura 44- Difratomogramas de raios-X das amostras cetorolaco, PLGA, micropartículas de PLGA contendo 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) e 50% (MP50) de cetorolaco sobrepostos, obtidos em 2θ 4-50°.

Nas amostras MP15 e MP25 a predominância de PLGA nas amostras promoveu a supressão dos picos característicos de cristalinidade do CT, sendo possível visualizar somente a banda amorfa do polímero. Apesar de a maioria dos picos serem identificados com menores intensidades nas amostras MP35 e MP50, a ausência do pico em 8° (forma I) é o maior destaque, embora um vestígio deste pico possa ser visualizado na MP50. Duas explicações são possíveis para esse fenômeno, a interação física ocorrida entre fármaco e polímero durante o processo de microencapsulação promoveu a supressão e/ou deslocamento de alguns picos característicos do CT (COUGHLAN; CORRIGAN, 2006; FINI et al, 2008), apresentando uma forma semi-cristalina (GUPTA et al, 2000), ou talvez as altas temperaturas e o emprego de solvente durante a microencapsulação sejam suficientes para transformar o polimorfo I do CT em sua forma IV. Esta dúvida pode ser esclarecida através da comparação dos resultados obtidos na análise térmica com os

apresentados por Sohn e Seo (2004), pois o polimorfo IV apresenta além do pico de fusão do fármaco (160°C), pequenos eventos na região entre 40-50°C. Os resultados apresentados na tabela 2 mostram uma variação dos resultados das MFs e MPs na região de 40-60°C, onde ocorrem os eventos de transição vítrea do PLGA, normalmente entre 50-60°C nas MFs, e o mesmo evento tem início na região de 40°C nas MPs. Tal evidência pode nos confirmar, que o início do evento na região de 40°C seja na verdade dois eventos simultâneos em um único pico, o evento referente ao CT (forma IV) entre 40-50°C e a transição vítrea do PLGA de 50-60°C.

5.3 – Análise quantitativa do CT nas micropartículas

Os resultados das análises foram aplicados na equação da reta obtida através da regressão linear da curva analítica previamente construída (figura 45).

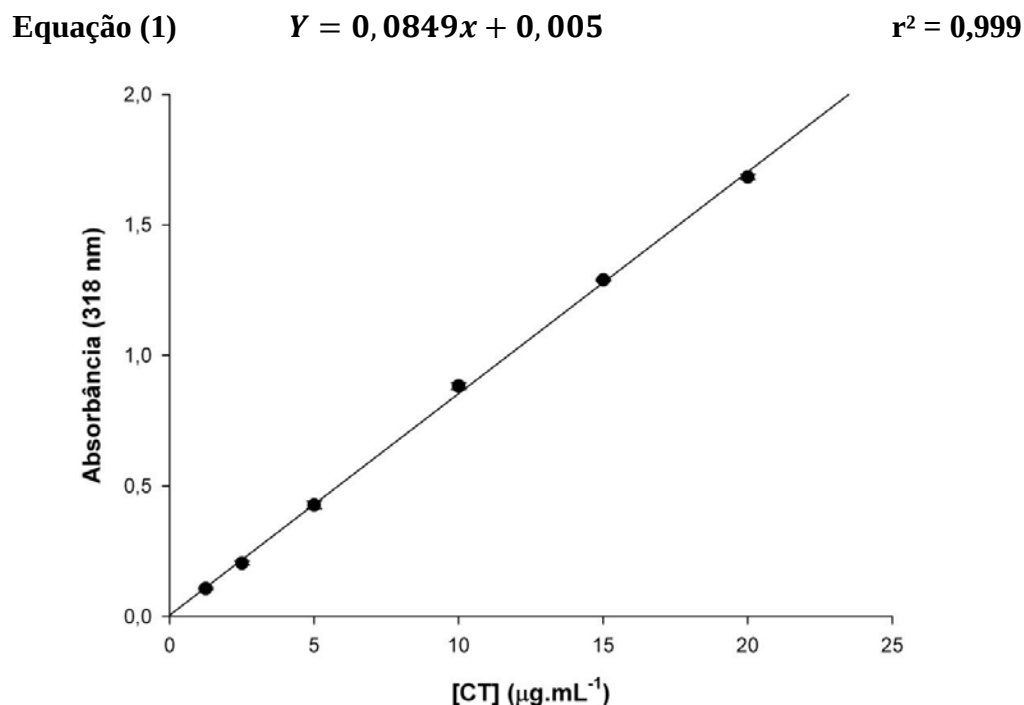


Figura 45 – Curva analítica do cetorolaco em ácido acético 0,1 mol.L⁻¹.

Os resultados do ensaio de doseamento estão expressos na tabela 5.

Tabela 5- Dados da análise quantitativa do cetorolaco contido nas micropartículas de PLGA.

Amostra	[CT/[PLGA]	Concentração Teórica de CT (µg/mg mØ.)	Concentração Obtida de CT (ug/mg mØ) ± DP	Eficiência de Encapsulação (%)
MP15	0,17	150	147,4 ± 1,72	98,28 ± 1,15
MP25	0,33	250	241,8 ± 2,06	96,72 ± 1,07
MP35	0,54	350	348,2 ± 4,02	99,62 ± 1,15
MP50	1	500	468,5 ± 6,60	93,70 ± 1,32

De acordo com os resultados obtidos através da análise quantitativa, todas as formulações apresentaram altos índices de eficiência de encapsulação, acima de 90%, confirmando a excelência da técnica de Spray drying e da metodologia empregada na obtenção de sistemas microparticulados. Desta forma todas as amostras foram selecionadas para compor o ensaio de liberação *in vitro* do CT a partir das micropartículas.

5.4- Estudo de liberação *in vitro* do CT a partir das micropartículas.

Para realizar as quantificações do ensaio de liberação *in vitro* através da espectroscopia na região do UV-Vis foi construída uma curva analítica do CT em tampão Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ pH 7,2. Soluções com concentrações entre 2,5 e 25µg.mL⁻¹ foram preparadas em triplicata e as análises foram realizadas em 323nm (figura 46). Através da regressão linear dos valores obtidos foi possível calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação.

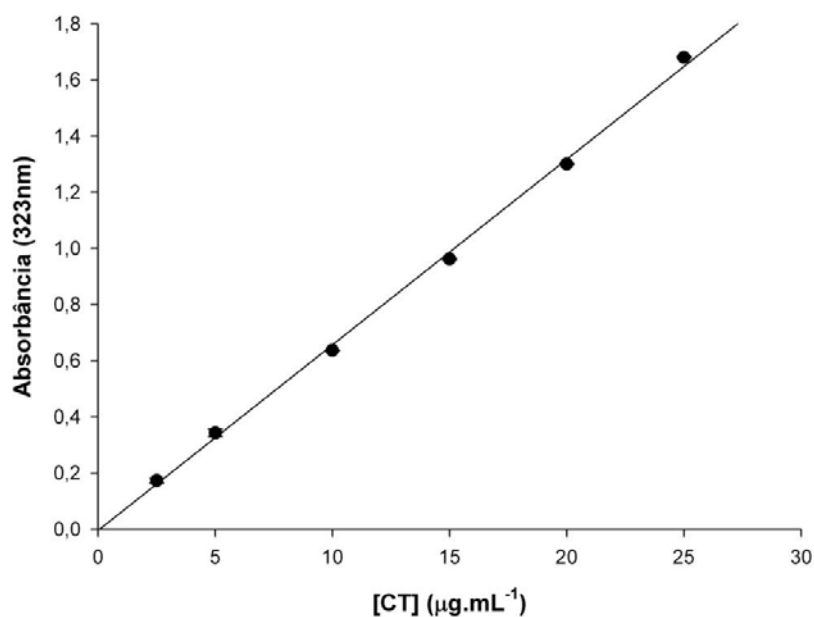


Figura 46- Curva analítica do cetorolaco em tampão Tris-HCl 10 mM pH=7,2.

Equação (2)

$$Y = 0,0661 \cdot x - 0,0046$$

$$r^2 = 0,998$$

Depois de construída a curva analítica e obtida a equação da reta para quantificação, foram iniciados os ensaios de liberação.

A figura 47 apresenta o perfil de liberação do CT a partir das MP15.

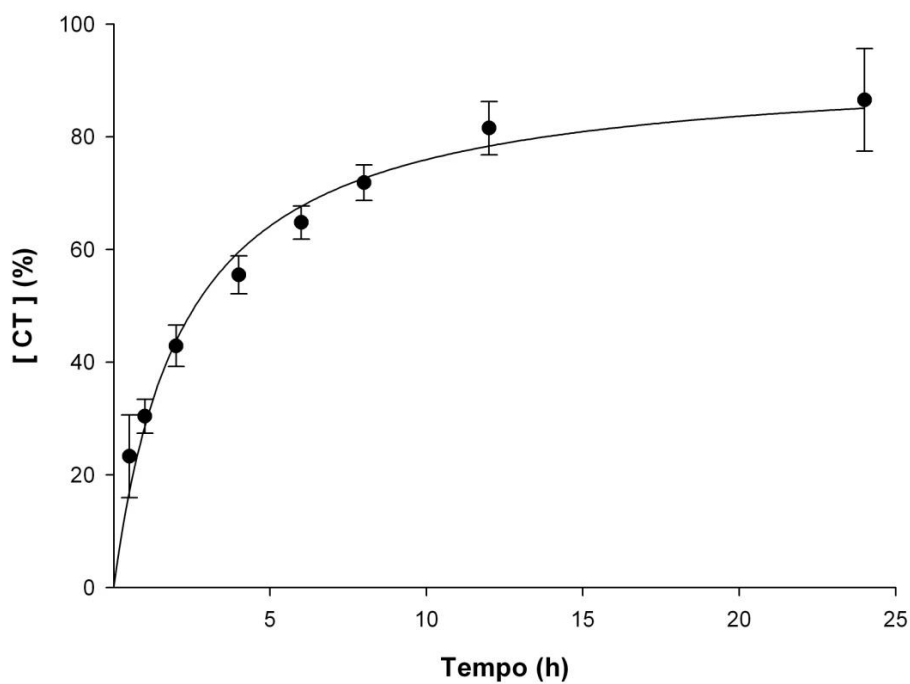


Figura 47- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 15% de fármaco (MP15) em tampão Tris 10mM pH 7,2.

Analisando a cinética de liberação das MP15, observa-se um perfil de etapa única. O ensaio caracteriza-se pela dissolução do CT no meio receptor de forma quase homogênea, obedecendo um perfil de curva de saturação(YE; KIM; PARK, 2010).

A figura 48 apresenta o perfil de liberação do CT a partir das MP25. Os resultados indicam um perfil com o início de liberação mais acentuada, com quase 60% do CT sendo liberado nas primeiras duas horas, e o restante do fármaco é liberado em porções menores até o final do ensaio.

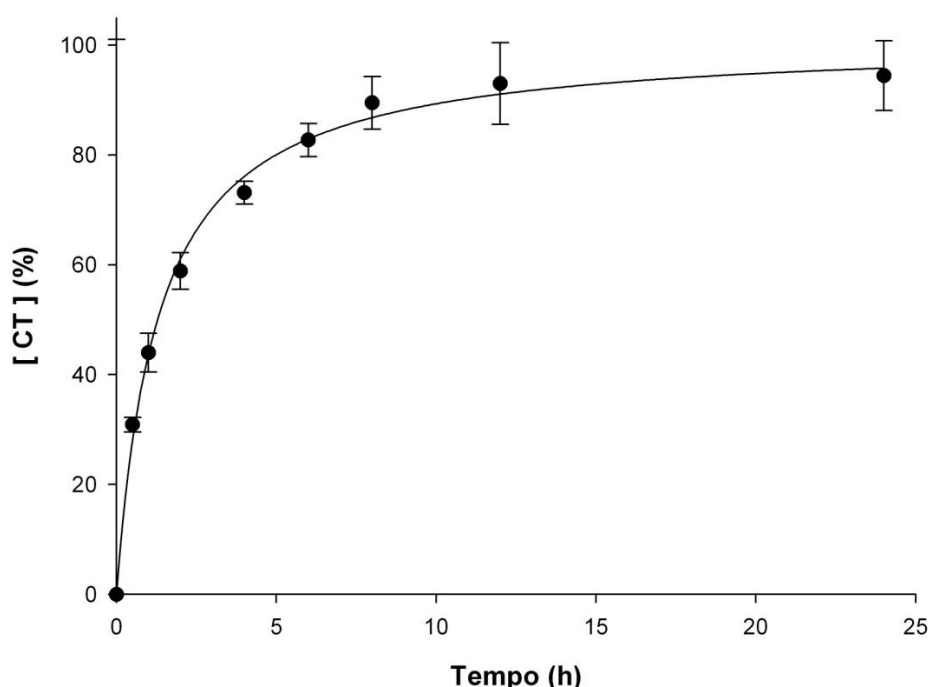


Figura 48- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 25% de fármaco (MP25) em tampão Tris 10mM pH 7,2.

A amostra MP35 (figura 49) possui um perfil de liberação semelhante ao das amostras anteriores, a diferença principal está na concentração de CT liberada durante as primeiras horas do ensaio. Dessa forma 30% do fármaco é liberado de forma mais lenta durante 20 horas aproximadamente.

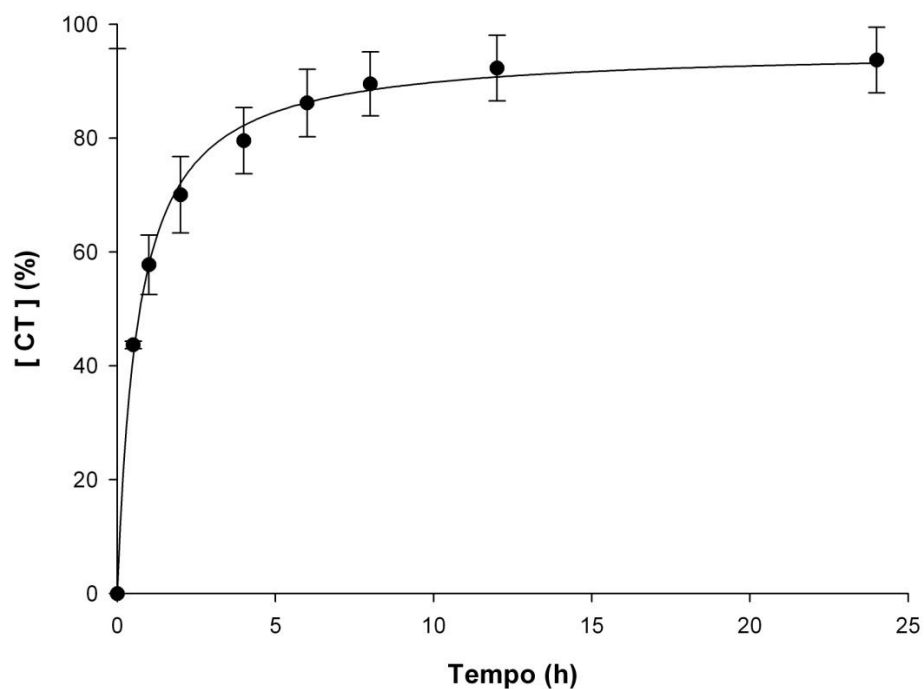


Figura 49- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 35% de fármaco (MP35) em tampão Tris 10mM pH 7,2.

A amostra MP50 (figura 50) apresentou perfil de liberação semelhante ao da MP35, com a liberação de 70% do CT nas duas primeiras horas e o restante sendo liberado gradativamente.

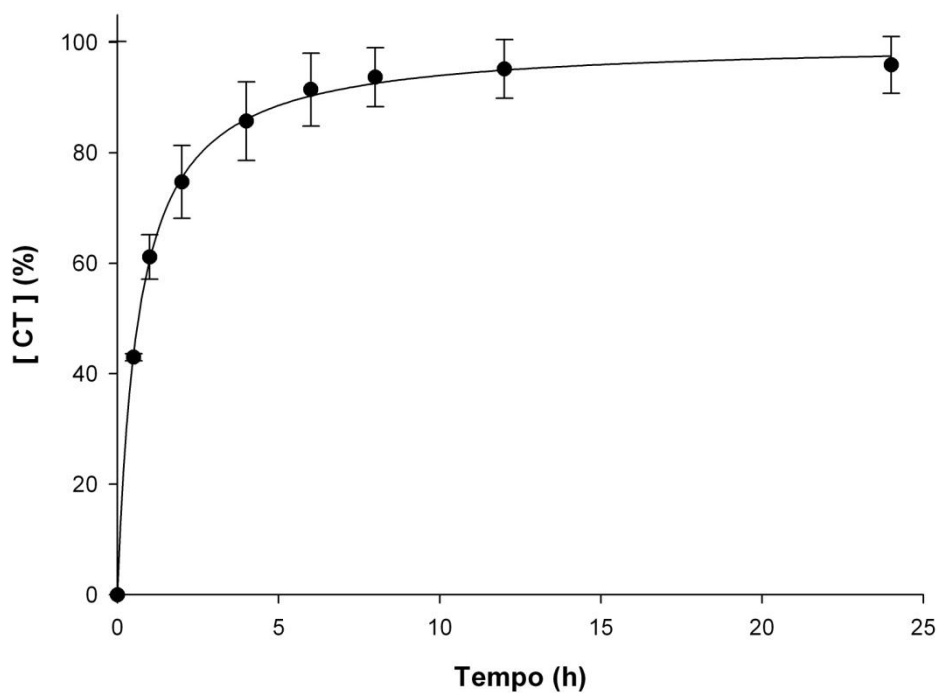


Figura 50- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 50% de fármaco (MP50) em tampão Tris 10mM pH 7,2.

Com a finalidade de facilitar a visualização da evolução do controle da liberação em função do aumento da proporção de PLGA nas amostras, a figura 51 apresenta a sobreposição dos perfis de liberação de todas as amostras.

O primeiro passo para estabelecer alguma forma de comparação é definir o tempo necessário para dissolver o fármaco livre no meio receptor. A figura 51 mostra que o CT livre é completamente dissolvido no meio receptor em 30 minutos. Sendo assim, todas as formulações apresentaram aumento no tempo de liberação. Também como esperado, as MPs conferem ao CT um aumento no tempo de liberação que cresce de acordo com o aumento da concentração de PLGA nas micropartículas. Pode-se supor que o aumento na concentração de PLGA nas micropartículas fornece uma maior organização à matriz polimérica, dificultando a dissolução do CT em regiões mais internas da partícula, diminuindo a velocidade de difusão do CT das micropartículas para o meio receptor.

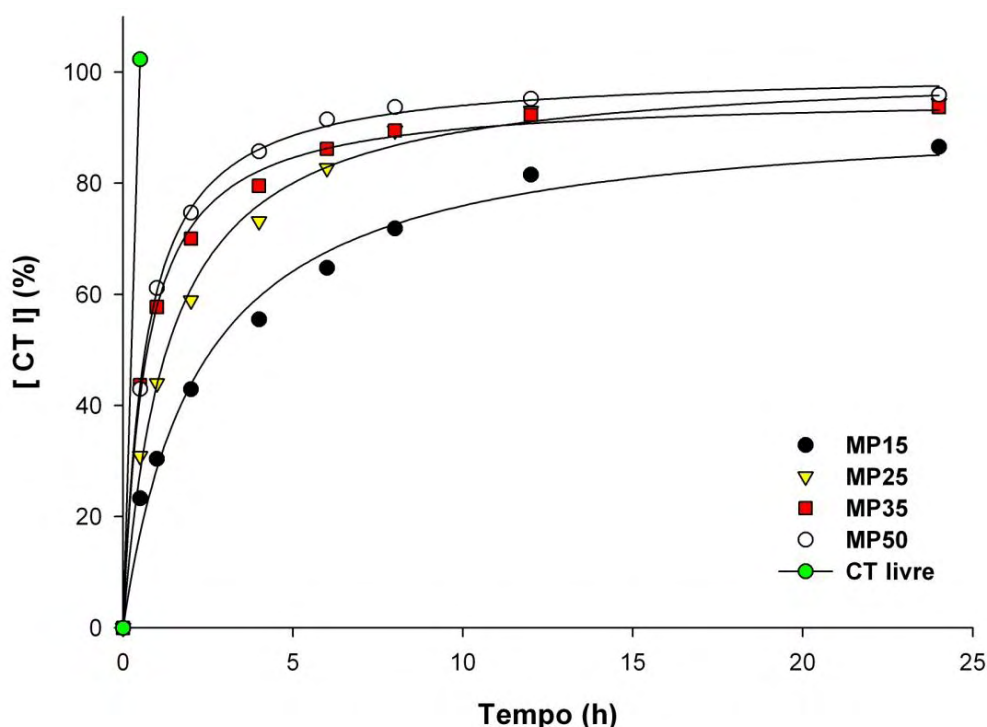


Figura 51- Liberação *in vitro* do cetorolaco livre e do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) e 50% (MP50) de fármaco em tampão Tris 10mM pH7,2 sobrepostos.

No desenvolvimento de sistemas de liberação microparticulados a adequação do perfil de liberação do fármaco a um modelo matemático pode ser uma ferramenta esclarecedora, pois através deste artifício pode-se sugerir quais mecanismos de liberação estão envolvidos em cada etapa, bem como avaliar os pontos críticos do sistema estudado. Embora a maioria dos modelos matemáticos seja fundamentada em mecanismos de difusão descritos pela primeira e segunda lei de Fick, existem modelos específicos que sugerem outros tipos de fenômenos que contribuem para a liberação de fármacos (BENITA, 2006).

A liberação de fármacos a partir de MPs de polímeros biodegradáveis pode ocorrer por diversos mecanismos distintos, e inclusive pela combinação de dois ou mais desses mecanismos. A liberação pode ocorrer pela difusão do fármaco presente na região superficial das partículas, tanto da superfície externa propriamente dita, quanto na superfície nos poros formados pelo processo de microencapsulação. Outro mecanismo pode ocorrer em função da degradação do polímero, no caso do PLGA por hidrólise, originado por canais ou túbulos que adentram as regiões mais internas da micropartícula por onde o meio receptor penetra. Com o meio receptor presente no interior da partícula, as moléculas de fármaco localizadas nessa região são difundidas da matriz polimérica para o meio receptor no interior da micropartícula em função do gradiente de concentração. Em seguida, ocorre a difusão do fármaco do meio receptor no interior da micropartícula para o meio receptor externo, novamente por gradiente de concentração (RANADE, 2004; BENITA, 2006; THASSU;DELEERS;PATHAK, 2007; SILVA-JUNIOR *et al*, 2008b).

Na maioria dos casos os dois eventos ocorrem neste tipo de sistema, porem na primeira etapa da liberação a difusão ocorre de forma isolada , onde uma concentração do fármaco, grande parte presente na superfície da partícula, é liberada rapidamente na fase inicial, enquanto a biodegradação do polímero ou erosão da matriz é um processo que

ocorre em uma velocidade menor, sendo um fenômeno que ocorre em conjunto com a difusão numa segunda etapa, e responsável pela chamada liberação prolongada conferida pelo sistema (BENITA, 2006; THASSU;DELEERS;PATHAK, 2007).

No caso em questão a concentração de CT inicial disperso na matriz polimérica (C_0) é muito superior à concentração no meio receptor, promovendo difusão por gradiente de concentração. A medida em que a diferença de concentração de CT entre a micropartícula e o meio receptor (ΔC) diminui a difusão do fármaco para o meio receptor ocorre de forma mais lenta. A evolução deste fenômeno confere ao gráfico de liberação um perfil de liberação com curva de saturação, que pode ser ajusta pela equação de Hiperbola, bastante utilizada para equacionar sistemas de liberação matriciais entre outros (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001).

A figura 52 apresenta o plot de Higuchi para as amostras MP15, MP25, MP35 e MP50.

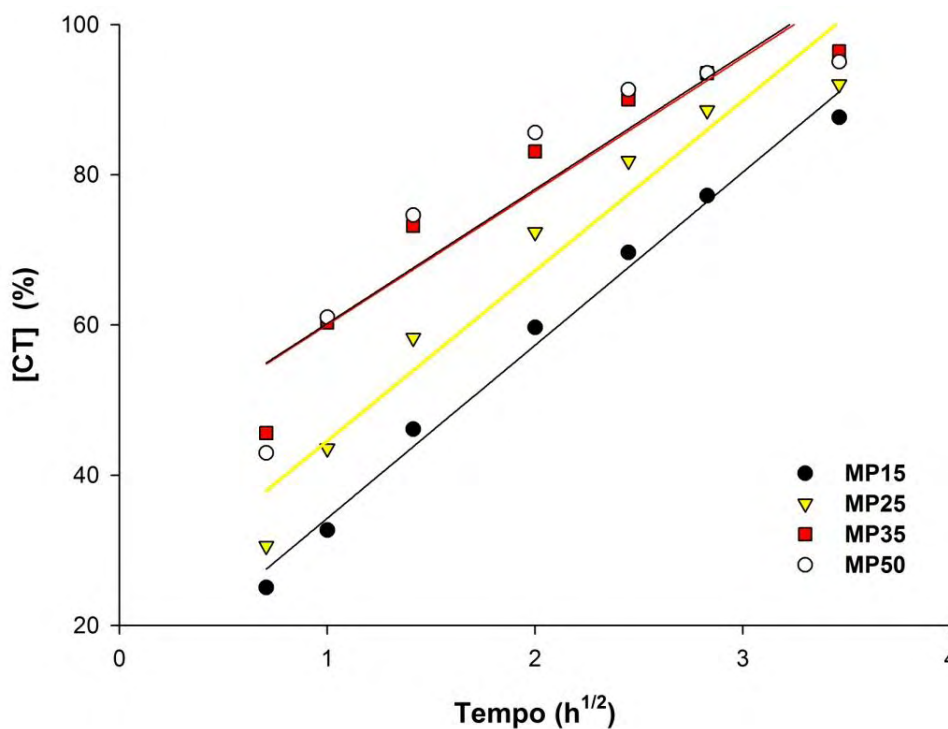


Figura 52- Plot de Higuchi para as micropartículas de PLGA contendo 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) e 50% (MP50) de fármaco em tampão Tris 10mM pH7,2 sobrepostos..

Os resultados obtidos com a aplicação de modelos matemáticos para os dados de liberação *in vitro* estão expressos na tabela 6.

De acordo com a descrição original (HIGUCHI, 1961; COSTA, 2002; BENITA, 2006) o modelo matemático de Higuchi (equação 1) é característico de sistemas no qual o mecanismo de liberação é exclusivamente por difusão, fundamentado pela lei de Fick. Por outro lado, não são todos os perfis de liberação que se adéquam ao modelo de Higuchi, pois este modelo foi criado com base em sistemas matriciais perfeitamente esféricos, sistemas granulosos e sistemas sólidos contendo fármaco hidrossolúvel. O modelo de Korsmeyer-Peppas (equação 2) foi criado para permitir o ajuste de dados dos sistemas que não seguem adequadamente o modelo de Higuchi ou que apresentam mais de um tipo de mecanismo envolvido em sua liberação. O parâmetro temporal (n) com valor menor ou igual a 0,5 é indicativo de que o mecanismo de liberação é predominantemente baseado em difusão, enquanto valores acima de 0,5 representam sistemas que apresentam o mecanismo de difusão associado demais fenômenos de liberação (KORSMEYER;PEPPAS, 1981; COSTA, 2002; BENITA, 2006).

Equação de Higuchi (3)

$$f(t) = k_H \cdot t^{1/2}$$

Equação de Korsmeyer-Peppas (4)

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = a \cdot t^n$$

Tabela 6- Parâmetros de ajuste dos resultados experimentais dos modelos teóricos da cinética de liberação *in vitro* do CT a partir das MPs

Proporção de CT:PLGA	Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	R ²	k	R ²	n	a
15:85	0,9154	22,37	0,9941	0,3117	35,01
25:75	0,7964	26,70	0,9905	0,2438	48,86
35:65	0,5474	27,64	0,9951	0,1709	59,46
50:50	0,5076	28,81	0,9923	0,1666	62,64

Os resultados obtidos a partir dos ajustes dos dados experimentais aos modelos matemáticos mostram que o mecanismo de liberação do CT a partir das micropartículas de PLGA apresenta um único fenômeno de liberação. Para todas as formulações de micropartículas os valores de n apresentados foram menores que 0,5, que indica que o tipo de liberação promovida por elas é predominantemente por difusão, confirmando os resultados obtidos através da adequação ao modelo de Higuchi (COSTA, 2002; DAS; RAO, 2006). O perfil de liberação apresentado pode ser explicado pelo fenômeno de difusão, onde a concentração inicial de fármaco (C_0) é superior à concentração de fármaco no meio receptor (C_m), e a diferença entre esses valores (ΔC), é diretamente responsável pela velocidade com que a difusão ocorre, pois a difusão ocorre de acordo com o gradiente de concentração. Quando o valor de ΔC diminui, conseqüentemente a velocidade de difusão tende a ser mais lenta, até que a diferença entre as concentrações seja mínima ou chegue ao equilíbrio (ARIFIN; LEE, WANG, 2006; FREDENBRG et al, 2011).

Embora o perfil de liberação tenha se adequadado aos modelos matemáticos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas, sugerindo liberação por difusão do CT a partir da matriz polimérica, o fato de o sistema liberar quase todo o CT em apenas 24 horas foi o fenômeno difícil de explicar. Quando se utiliza um polímero hidrofóbico juntamente com uma forma

menos hidrofílica do fármaco, espera-se obter um sistema capaz de sustentar a liberação do CT por vários dias (ROSSANEZI, 2008; WISCHKE;SCHWENDEMAN, 2008).

O meio receptor de dissolução utilizado em nossos ensaios de liberação foi tampão Tris 10mM com pH 7.2, entretanto o “sal” Tris utilizado na preparação deste tampão nada mais é do que a trometamina, substância que complexada com cetorolaco forma o sal mais comum e solúvel deste fármaco, cetorolaco de trometamina, muito mais hidrofílica que o CT em sua forma ácida. Além disso, a valor de pH do tampão é extremamente propício para a formação do sal mais solúvel, pois o CT apresenta valor de pka em 3,4, ou seja, para um fármaco de característica ácida o meio com valores de pH 2 unidades acima do valor de pka promove a ionização de 99% das moléculas de fármaco. No caso do CT, ocorre ionização da COOH, que na presença do tampão Tris forma cetorolaco de trometamina.

Para resolver este problema optamos por realizar um novo ensaio de liberação utilizando como meio receptor um tampão aniônico, tampão fosfato 10mM pH7.2, neutralizado com NaOH, de forma que não seja possível a formação de um sal mais solúvel, apenas a interação com Na^+ presente no tampão, que embora também de origem a um sal hidrofílico, é muito menos solúvel que o sal de trometamina.

A figura 53 apresenta o perfil de liberação do CT a partir das MP15 utilizando tampão fosfato como meio receptor. Diferente do ocorrido nos ensaios anteriores, a difusão inicial do CT presente na superfície foi menor, cerca de 40% liberado nas primeiras 4 horas de ensaio, seguido de uma variação gradual até a etapa de liberação controlada, que prossegue até o final do ensaio.

Quando não ocorre a complexação do CT e consequente transformação em uma forma mais solúvel, a difusão dele a partir da matriz polimérica ocorre de maneira mais lenta, pois a sua capacidade de se dissolver no meio receptor é menor. Por esse motivo a difusão acontece durante gradualmente durante as mais de 300 horas de ensaio.

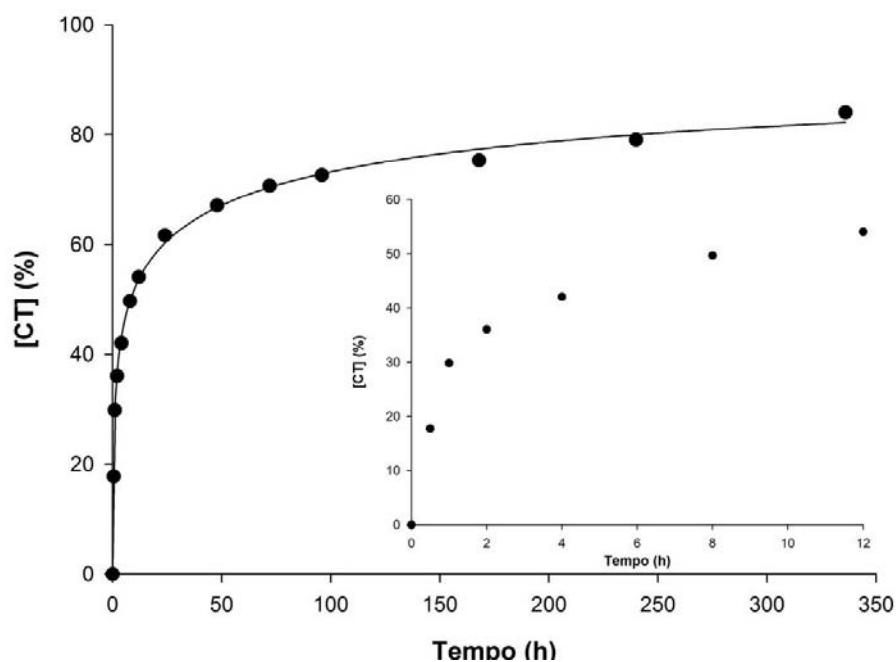


Figura 53- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 15% de fármaco (MP15) em tampão fosfato 10mM pH7,2.

A figura 54 apresenta o perfil de liberação do CT a partir das MP25 utilizando tampão fosfato como meio receptor.

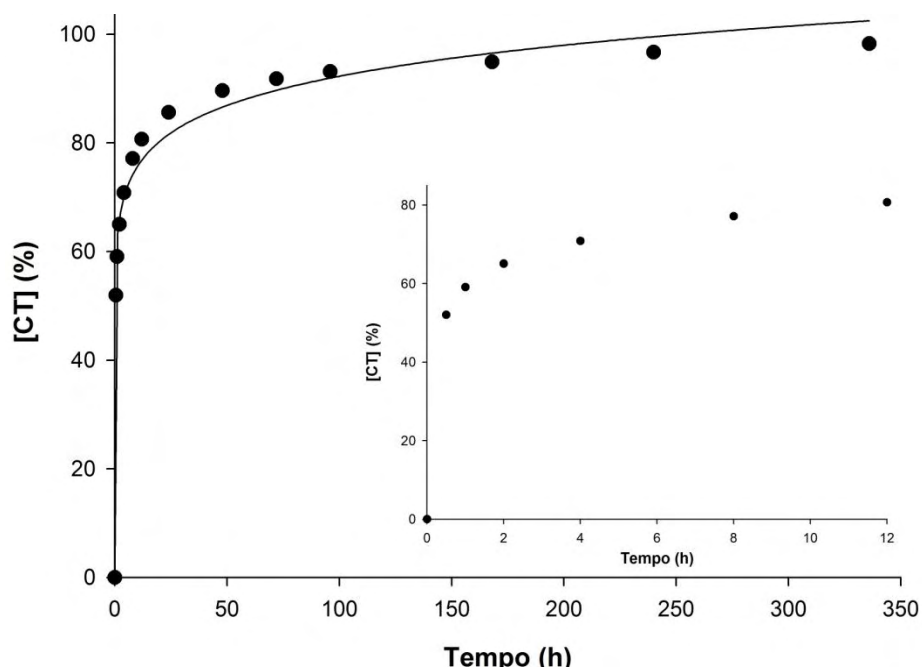


Figura 54- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 25% de fármaco (MP25) em tampão fosfato 10mM pH7,2.

Nesta amostra ocorre uma difusão inicial mais acentuada liberando aproximadamente de 85% do CT durante as primeiras 24 horas. A partir deste ponto tem início a etapa de liberação mais lenta e gradativa do fármaco.

As amostras MP35 (figura 55) e MP50 (figura 56) apresentam a mesma tendência nos perfis de liberação com mais de 80% do CT sendo liberado na primeira hora de ensaio, e aproximadamente 15% é liberado de forma lenta durante o restante do ensaio.

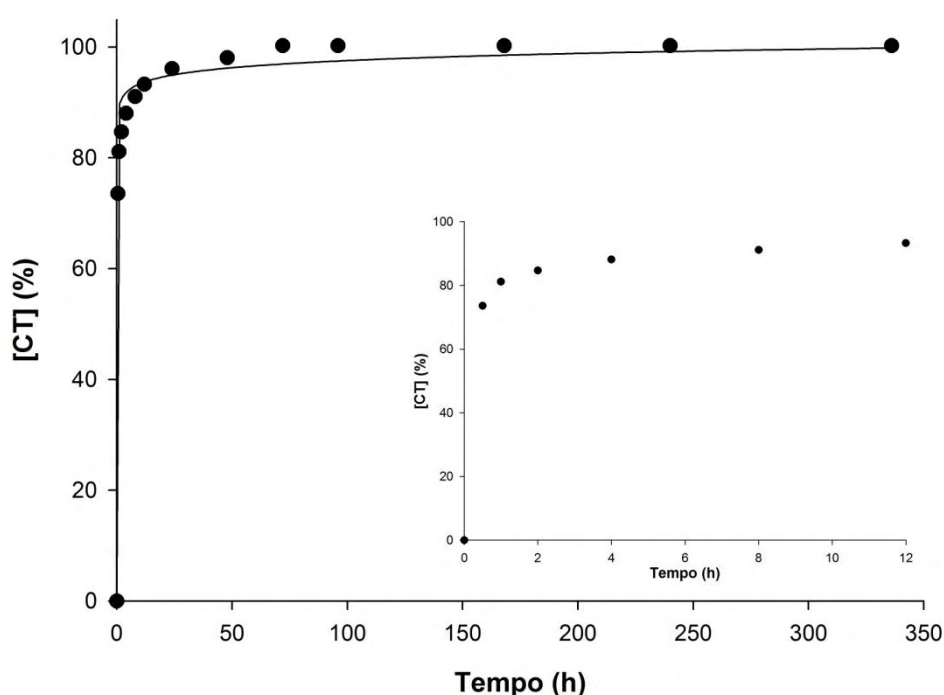


Figura 55- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 35% de fármaco (MP35) em tampão fosfato 10mM pH7,2.

A liberação inicial em todos os casos ocorre de maneira mais acentuada. Isso pode ser explicado pelo fato de num primeiro momento existe uma determinada concentração de CT pronto para sofrer difusão para o meio receptor. Quando esse fármaco se difunde, um volume de meio receptor ocupa o seu lugar no interior da matriz polimérica, e dessa maneira o fármaco começa a se difundir para esse meio receptor presente no interior da micropartícula. A difusão ocorre em uma determinada velocidade (k) em função de um gradiente de concentração. Quando fármaco está livre e pronto para ser difundido, a

constante de difusão para o meio externo (k_s) é a única limitante do processo, porém se o fármaco está conjugado a algum tipo de sistema, ele necessita se desligar deste sistema e se difundir para o meio receptor interno, mecanismo que também ocorre de acordo com uma constante (k_d). Sendo assim nas primeiras horas do ensaio, o mecanismo de liberação é predominantemente dominado por k_s . Após a difusão inicial k_s ainda continua fazendo parte do mecanismo de liberação, entretanto ele começa a ser dependente do valor de K_d (RANADE, 2003; FREDENBERG et al, 2011).

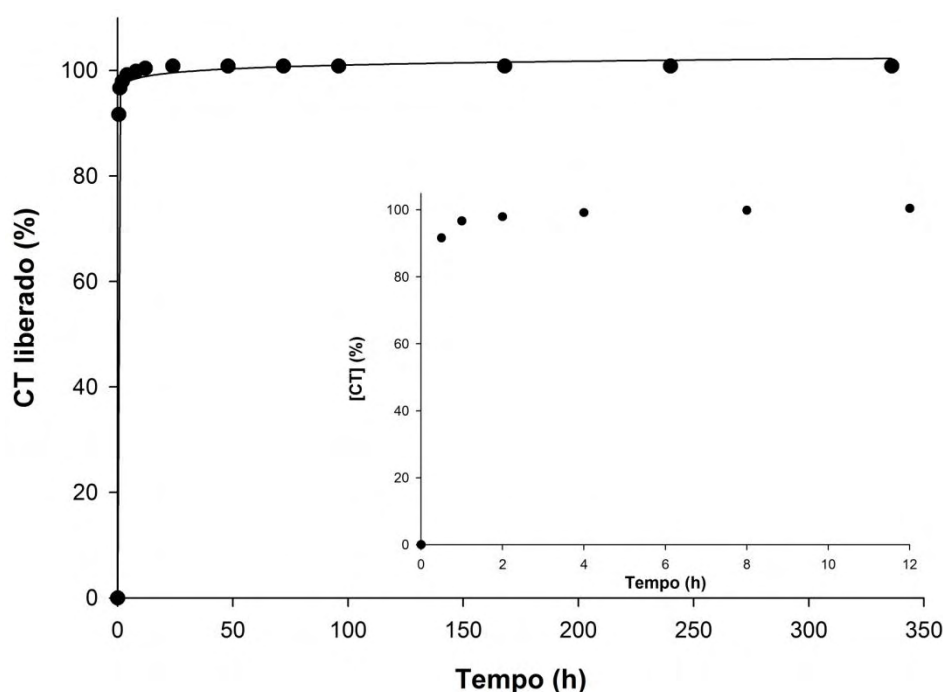


Figura 56- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 50% de fármaco (MP50) em tampão fosfato 10nM pH7,2.

Com o intuito de facilitar a visualização e comparação dos perfis de liberação das diferentes micropartículas contendo CT, a figura 57 apresenta a sobreposição dos perfis de liberação de todas as amostras e do CT livre.

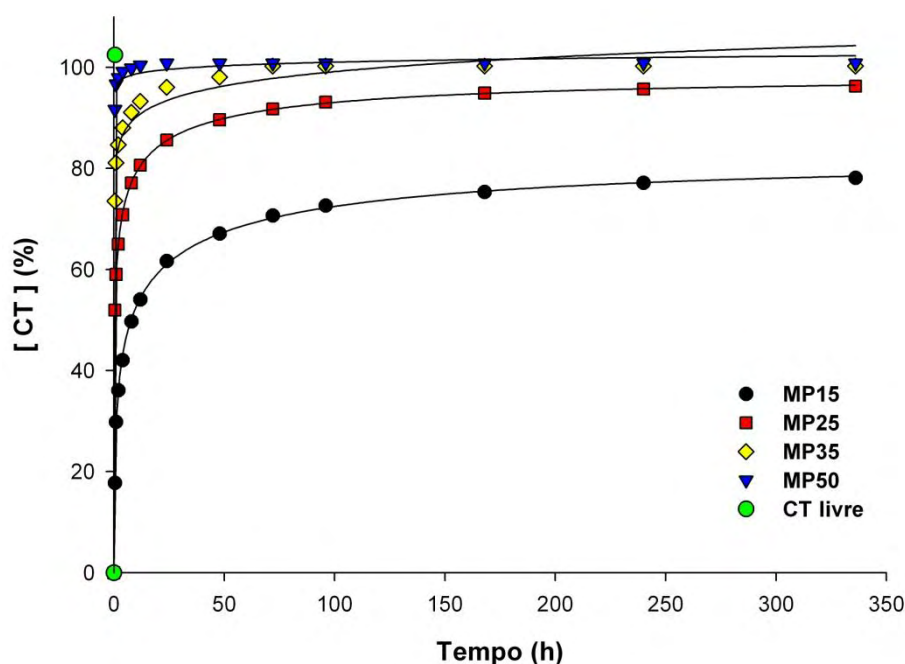


Figura 57- Gráfico de liberação *in vitro* do cetorolaco livre e do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) e 50% (MP50) de fármaco em tampão fosfato 10mM pH7,2 sobrepostos.

Da mesma forma como ocorreu no ensaio utilizando tampão Tris como meio receptor, todas as amostras apresentaram capacidade de promover liberação controlada, desde discretas como no caso da MP50, até um aumento significativo no tempo de liberação como no caso das MP15.

A diferença nos perfis de liberação quando utiliza-se meios receptores diferentes pode ser melhor visualizada na figura 58.

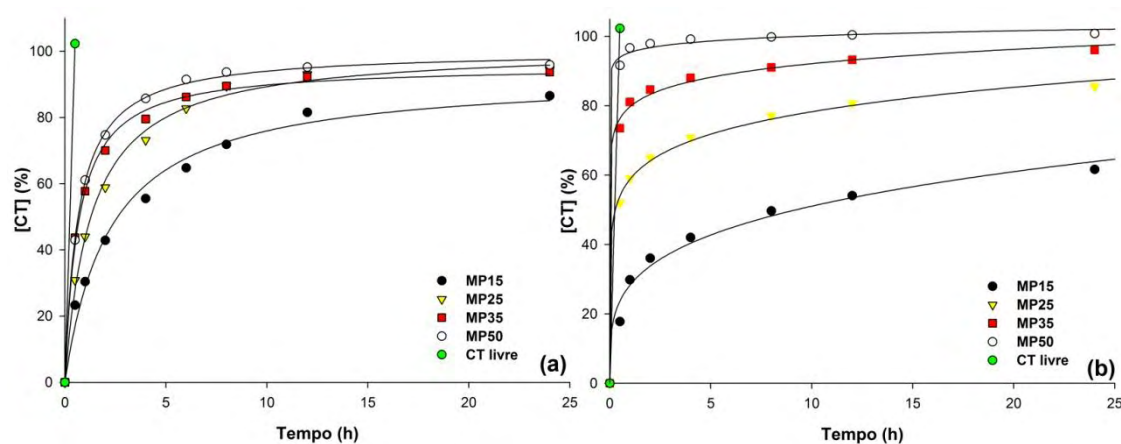


Figura 58- Perfil de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA utilizando como meio receptor tampão Tris (a) e tampão fosfato (b).

A diferença nos perfis de liberação é mais evidente nas formulações contendo 15% e 25% de CT, que apresentam liberação mais lenta durante as 24 horas. Nas formulações contendo 35% e 50 % de CT praticamente não se encontram diferenças.

É importante ressaltar que a mudança do meio receptor não alterou a completa solubilização do CT já na primeira coleta do ensaio de liberação *in vitro*, mostrando que realmente as condições Sink foram respeitadas.

Assim como a razão de CT/PLGA interfere no diâmetro médio das micropartículas, ela também tem influência sobre a concentração de CT liberado em determinado tempo da liberação como podemos observar na figura 59.

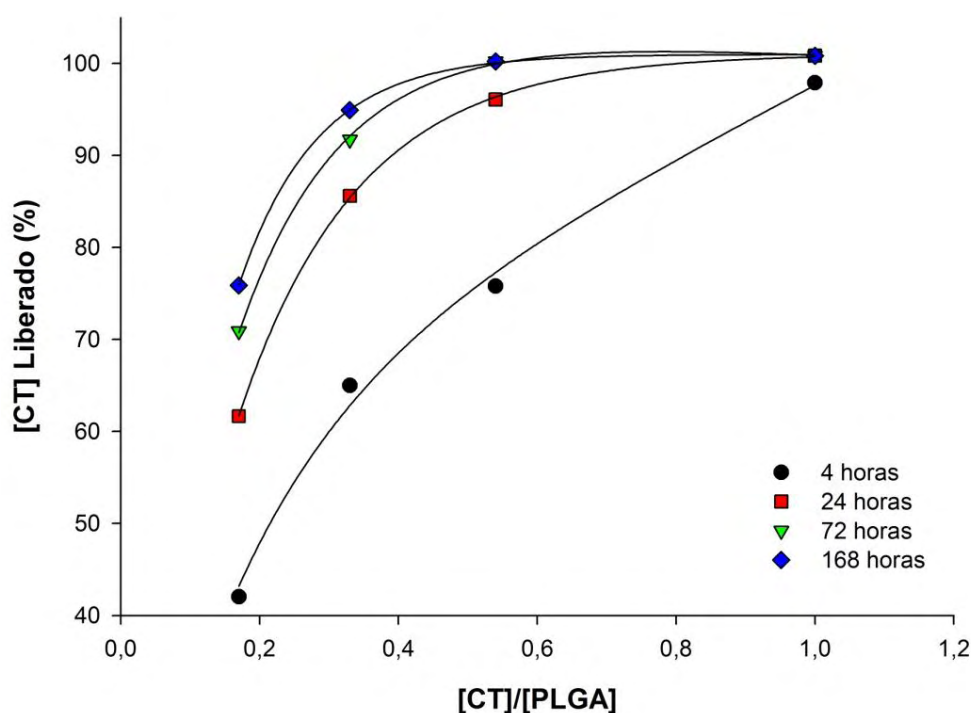


Figura 59- Efeito da variação da relação de cetorolaco/PLGA na liberação do cetorolaco nos tempos de 4, 24, 72 e 168 horas de experimento.

Como pode ser observado na figura 59, o aumento da razão CT/PLGA confere ao CT presente na matriz polimérica facilidade para se difundir para o meio receptor. Este fenômeno é mais evidente no tempo de 4 horas. Pode-se dizer que durante as primeiras

horas do ensaio as formulações com menores razões de CT/PLGA são capazes de diminuir a difusão do fármaco presente nas micropartículas devido a melhor organização polimérica, que dificulta a entrada de meio receptor para o interior das micropartículas. Após um tempo de exposição é inevitável que o meio receptor penetre na matriz polimérica, promovendo a maior difusão do fármaco. Conforme a razão CT/PLGA aumenta, a organização da matriz polimérica se torna menor, e o meio receptor encontra menos dificuldade para penetrar a micropartícula e consequentemente difundir o CT. (RANADE, 2003; BENITA, 2006 THASSU;DELEERS;PATHAK, 2007; WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

A figura 60 apresenta o plot de Higuchi para o perfil de liberação *in vitro* das amostras MP15, MP25, MP35 e MP50 utilizando tampão fosfato 10mM pH 7,2 como meio receptor.

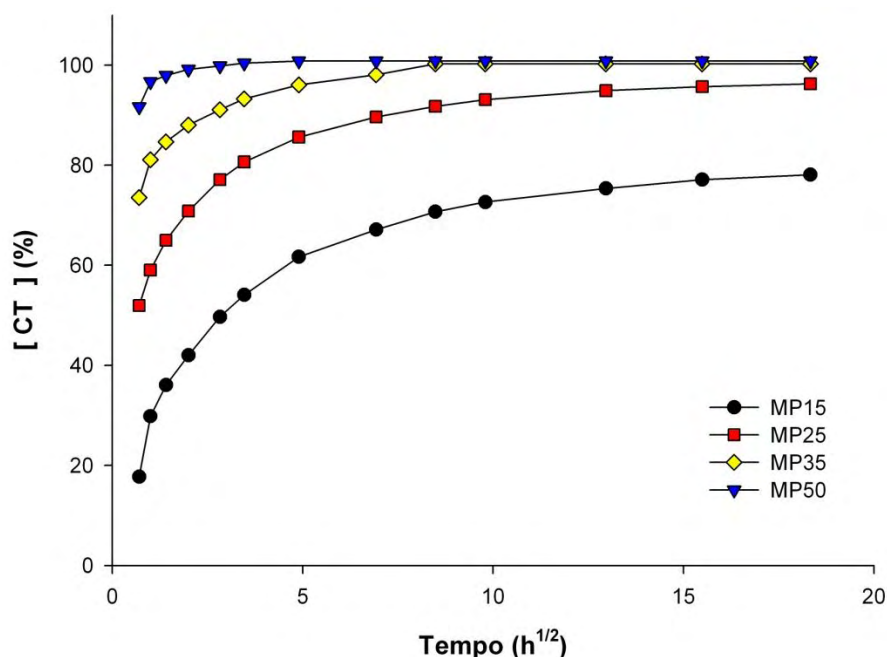


Figura 60- Plot de Higuchi para as micropartículas de PLGA contendo 15% (MP15), 25% (MP25), 35% (MP35) e 50% (MP50) de fármaco em tampão fosfato 10mM pH 7,2.

Os resultados obtidos com a aplicação de modelos matemáticos para os dados de liberação *in vitro* utilizando tampão fosfato 10mM pH 7,2 estão expressos na tabela 7.

Tabela 7- Parâmetros de ajuste dos resultados experimentais dos modelos teóricos da cinética de liberação *in vitro* do ceterolaco a partir das micropartículas utilizando tampão fosfato 10mM pH 7,2 como meio receptor.

Proporção de CT:PLGA	Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer- Peppas		
	R ²	k	R ²	n	a
15:85	0,9725	22,49	0.9945	0,1689	32,79
25:75	0,9230	30,28	0,9982	0,0846	61,93
35:65	0,8758	33,47	0,9992	0,0417	81,83
50:50	0,8339	34,82	0,9999	0,0101	96,40

Novamente os resultados obtidos na aplicação dos modelos matemáticos confirmam que o mecanismo de liberação baseia-se predominantemente na difusão. Os valores do expoente de liberação *n* indica que mecanismo de liberação é baseado na difusão fundamentada na lei de Fick (ARIFIN; LEE; WANG, 2006; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

A difusão inicial é resultado da difusão do fármaco presente na superfície da micropartícula, que são da ordem de micrometros, ou seja, possui uma área de superfície muito grande e concentra boa parte do fármaco presente na micropartícula. A parte seguinte do perfil de liberação representa o fármaco que está disperso nas partes internas das micropartículas, e que também são liberadas pelo fenômeno de difusão (ARIFIN; LEE; WANG, 2006; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008; FREDENBERG et al, 2011). Porém, para essa fração do CT esse mecanismo ocorre de forma indireta, onde o fármaco deve difundir-se da matriz polimérica para o meio receptor interno, constituído do meio receptor que penetra pelos microcanais originados pela difusão do fármaco presente na superfície. Esse meio receptor interno possui uma concentração de fármaco maior em relação ao meio receptor externo, dessa forma o mecanismo de difusão ocorre em duas etapas, a primeira sendo a difusão do CT presente na matriz polimérica para o meio receptor interno, e a

segunda a difusão do CT solubilizado no meio receptor interno para o meio receptor externo (RANADE, 2003; BENITA, 2006; THASSU;DELEERS;PATHAK, 2007; SILVA-JUNIOR et al, 2008b; FREDENBERG et al, 2011).

Com base nos resultados obtidos no ensaio de liberação *in vitro* as amostras MP15 e MP25 foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho. Essas amostras foram devidamente acondicionadas em frascos-ampolas e enviadas para serem irradiadas com diferentes doses de radiação gama.

5.5-Exposição das micropartículas ao processo de esterilização por radiação gama

As micropartículas foram irradiadas por radiação gama, utilizando Cobalto 60 como fonte de radiação nas doses de 10 e 25KGy. Inicialmente a proposta era utilizar também as doses de 5 e 15 KGy de radiação para o estudo dos efeitos da radiação gama sobre as micropartículas contendo CT, porem essas doses foram retiradas do estudo. Como a dose de radiação normalmente utilizada como processo de esterilização pelas indústrias para as quais a Empresa Brasileira de Radiações-EMBRAD presta serviços é de 25KGy, a empresa tem suas câmaras de irradiação devidamente condicionadas para trabalhar nessas condições. Para irradiar amostras com outras doses de radiação gama é necessário realizar ajustes nestas câmaras, e somente nossas amostras seriam irradiadas neste processo, inviabilizando o processo inclusive pelo custo. Contudo a EMBRAD concordou gentilmente em irradiar nossas amostras com a dose de 10KGy, além da dose usual de 25KGy.

5.6- Estabilidade das micropartículas de PLGA contendo CT pós-irradiação.

5.6.1- Morfologia

Foram realizadas análises utilizando MEV para as amostras MP15 irradiada com 10KGy (MP15-10KGy) e 25 KGy (MP15-25KGy), assim como para as MP25 (MP25-10KGy e MP25-25KGy respectivamente).

A figura 61 apresenta a microscopia eletrônica de varredura da MP15-10KGy. As partículas visualizadas, em sua maioria, apresentam distribuição de tamanho de 1 a 5 μm , bastante aglomeradas, com formato mais oval do que esférico.

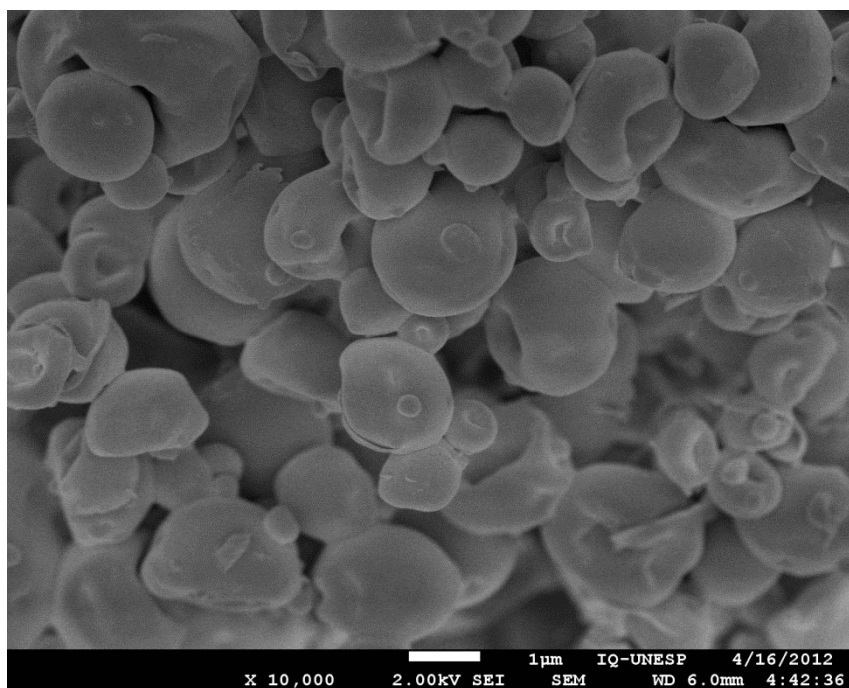


Figura 61 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 10KGy sob aumento de 1000X.

A figura 62 apresenta a microscopia eletrônica de varredura da MP15-25KGy. A morfologia apresentada nesta amostra é semelhante à amostra anterior, com o mesmo tipo de distribuição de tamanho.

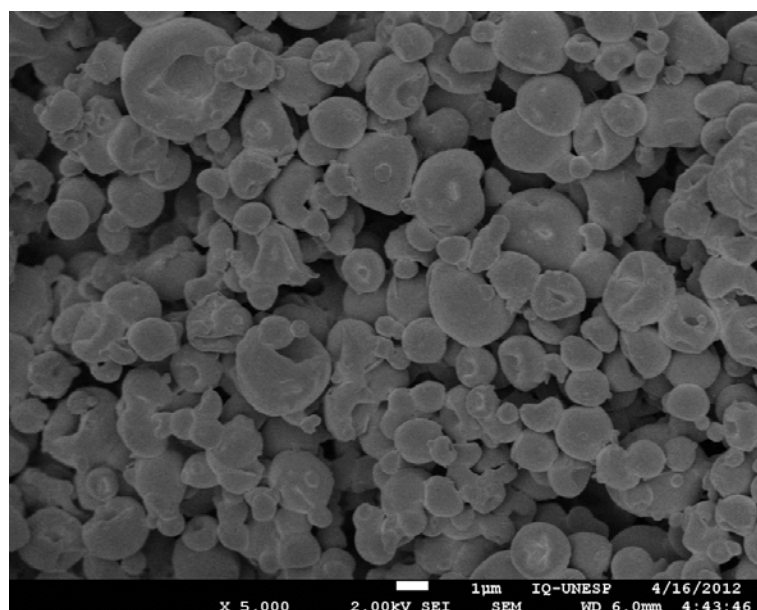


Figura 62 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 25KGy sob aumento de 1000X.

A figura 63 apresenta a microscopia eletrônica de varredura da MP25-10KGy. Nesta amostra as partículas mostram uma morfologia um pouco diferente, porem com a mesma distribuição de tamanho das partículas. As deformidades das partículas parecem decorrentes de algum problema relacionado a etapa de secagem, e descrito por Masters (1991), e não relacionadas a degradação em função da irradiação.

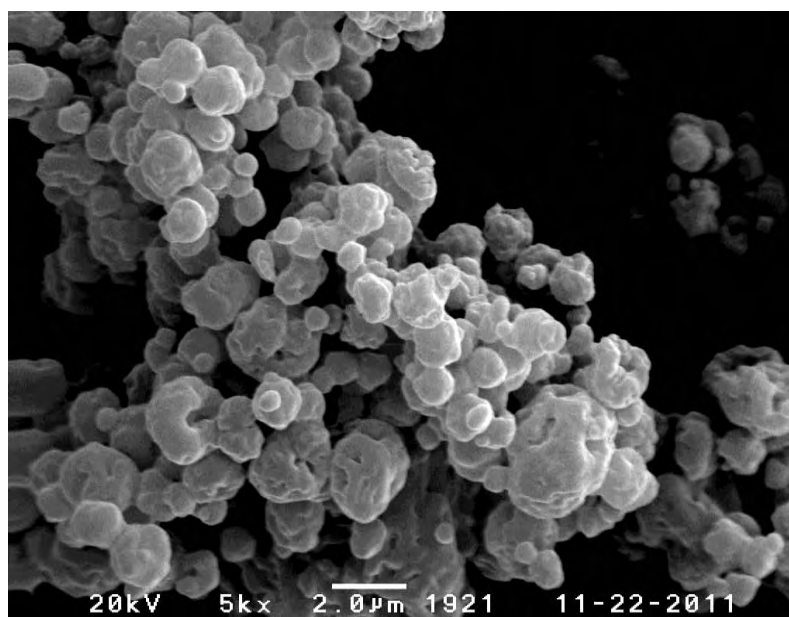


Figura 63- Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 10KGy sob aumento de 1500X.

A figura 64 apresenta a microscopia eletrônica de varredura da MP25-25KGy. Da mesma forma que a amostra anterior esta apresenta partículas mais disformes, aglomeradas e com superfície aparentemente rugosa. Isso era esperado, pois são amostras de um mesmo lote. Novamente as imperfeições não parecem ser provenientes do processo de esterilização, mas sim de alguma irregularidade durante o processo de secagem.

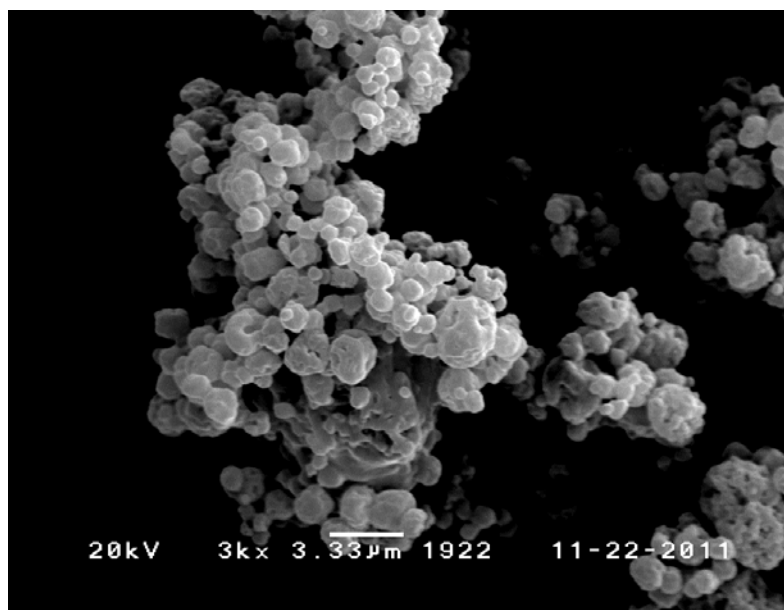


Figura 64 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 25KGy sob aumento de 3000X.

5.6.2- Análise de distribuição de diâmetro das micropartículas

A figura 65 apresenta os resultados das análises de diâmetro médio das MP15-10KGy.

As análises de diâmetro mostraram distribuição bimodal das partículas, com pequena proporção (<10%) apresentando diâmetro entre 700 e 900 nm, e a maior proporção (>90%) mostra distribuição do tipo Gaussiana na região de 1300 a 1800 nm. O diâmetro médio calculado foi de 1,636 µm.

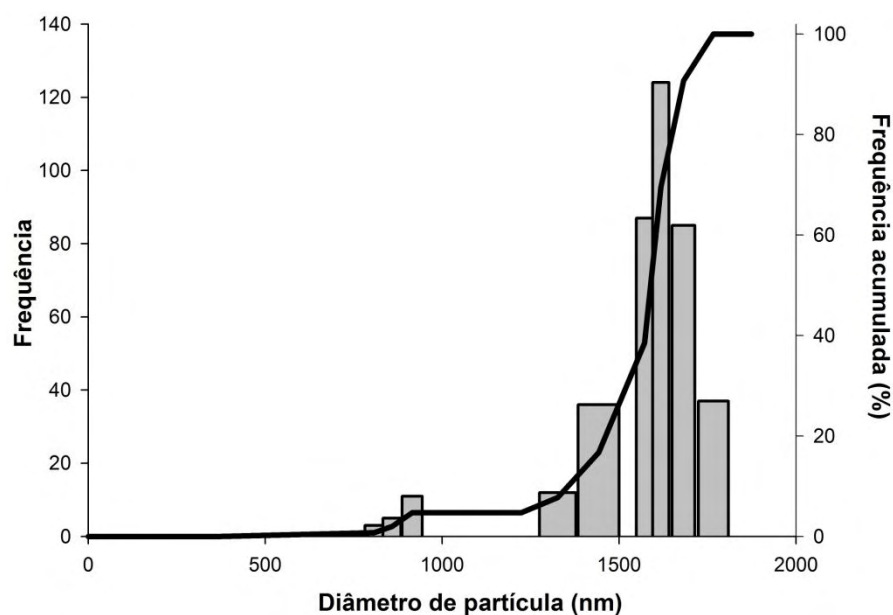


Figura 65- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 10KGy (MP15-10KGy).

Da mesma forma a amostra MP15-25KGy (figura 66) apresentou uma curva Gaussiana de distribuição com discreta diferença na frequência de valores, mas com o mesmo perfil de distribuição e frequência acumulada. O diâmetro médio calculado foi de 1,583 μm , bastante próximo da amostra anterior.

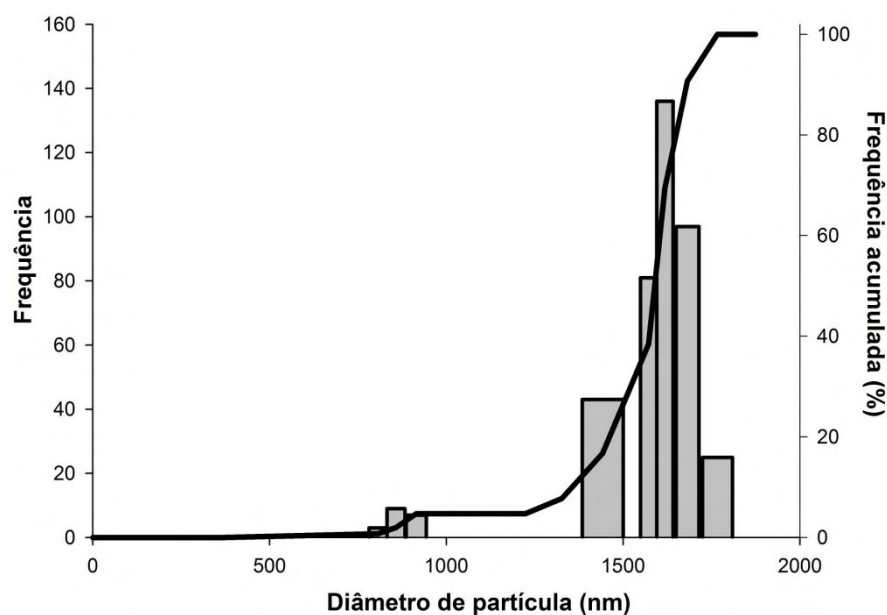


Figura 66- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 25KGy (MP15-25KGy).

A figura 67 apresenta os resultados das análises de diâmetro médio das MP25-10KGy.

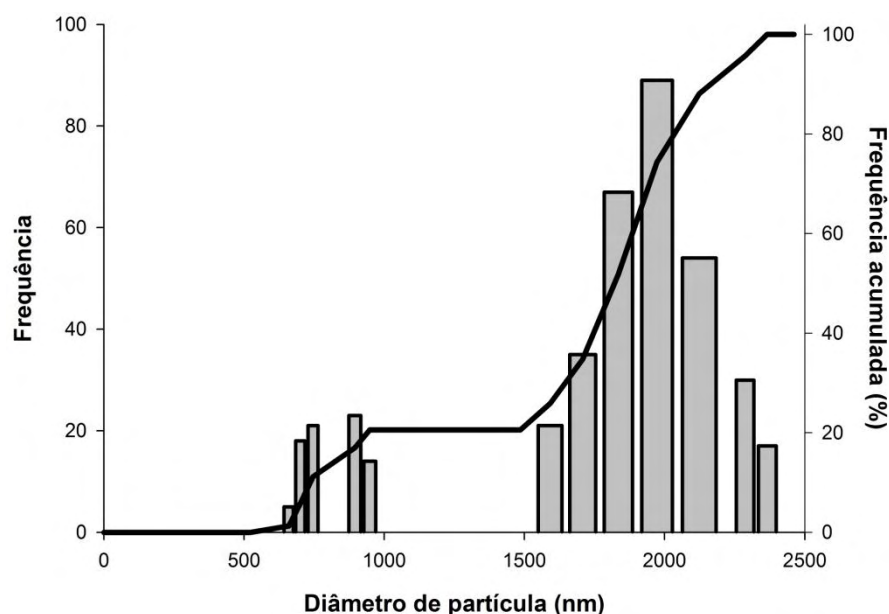


Figura 67- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 10KGy (MP25-10KGy).

Os resultados mostram valores de diâmetro também distribuídos de forma bimodal, porém com uma proporção maior de partículas apresentando diâmetro menor que 1 μm (>20%) e o restante (<80%) apresenta distribuição de Gauss na região de 1600 a 2400. As análises indicam que a maior concentração de fármaco encapsulado na amostra reflete diretamente no aumento do diâmetro médio, com valor de 1,727 μm .

A figura 68 apresenta os resultados das análises de diâmetro médio das MP25-25KGy.

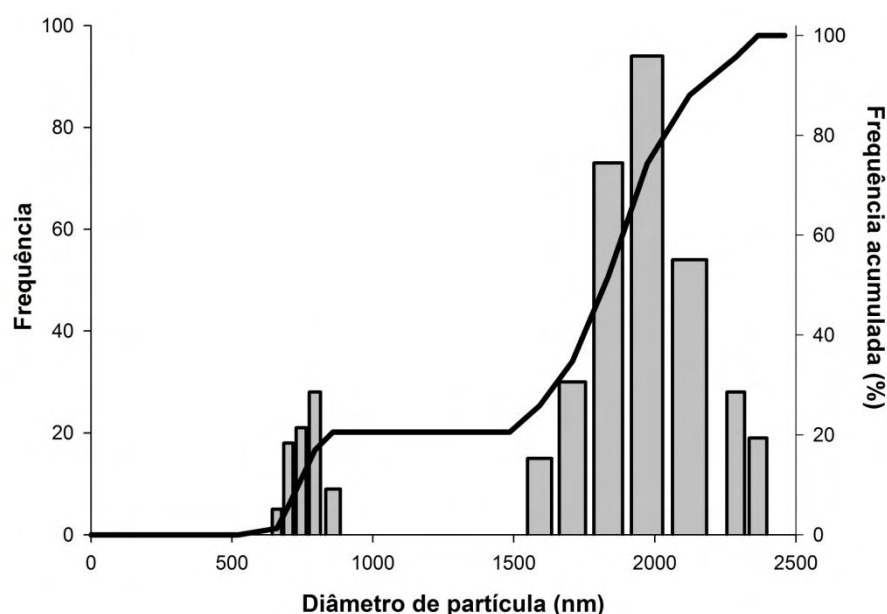


Figura 68- Frequência e frequência acumulada da distribuição de diâmetro das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco irradiadas com radiação gama na dose de 25KGy (MP25-25KGy).

Assim como na amostra anterior a maior parte da amostra concentrou-se na região de 1600 a 2400 nm, com cerca de 20% das micropartículas aparecendo na região abaixo de 1000 nm. O diâmetro médio calculado foi semelhante ao da MP25-10KGy, 1,742 μm .

5.6.3- Espectroscopia na região do infravermelho (IR)

A espectroscopia de IR pode fornecer informações sobre diversos tipos de eventos que podem ocorrer, desde degradação proveniente de algum stress até incompatibilidades ou interações entre fármaco e excipiente (SILVA-JUNIOR et al, 2008^a).

A figura 69 apresenta os espectros de IR das amostras MP15, MP15-10KGy e MP15-25KGy. Na análise dos perfis de IR é possível observar a grande semelhança existente entre as partículas não irradiadas e irradiadas com diferentes intensidades de radiação. O pico característico da C=O do CT (1500 a 1600 cm^{-1}) é bastante discreto em todas as amostras em função da proporção do fármaco nesta formulação, porém o pico característico da C=O do PLGA (1750 cm^{-1}) encontra-se bastante evidenciado, e apresenta intensidades semelhantes.

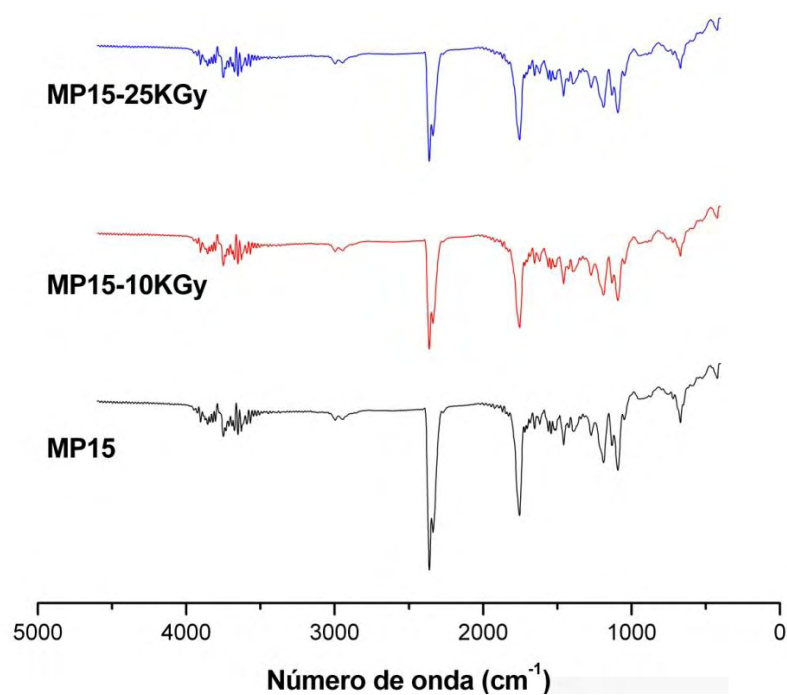


Figura 69- Espectroscopia na região do infravermelho das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco não irradiadas (MP15), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP15-10KGy) e 25KGy (MP15-25KGy) sobrepostos.

A figura 70 apresenta os espectros de IR das amostras MP25, MP25-10KGy e MP25-25KGy.

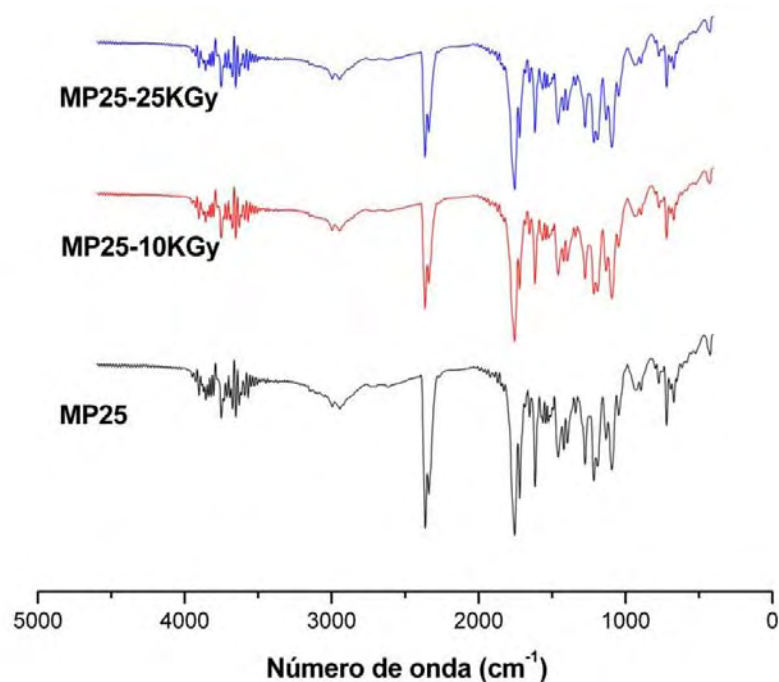


Figura 70- Espectroscopia na região do infravermelho das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco não irradiadas (MP25), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP25-10KGy) e 25KGy (MP25-25KGy) sobrepostos.

Nestas amostras é possível visualizar o pico indicativo do CT e o pico do PLGA, onde o CT em 1600 cm^{-1} tem aproximadamente metade da intensidade do PLGA em 1700 cm^{-1} . Com exceção da intensidade dos picos, as amostras irradiadas são semelhantes às não irradiadas e não apresentam qualquer outro tipo de pico que indique formação de algum produto de degradação relacionado ao método de esterilização.

5.6.4- Análise térmica

A capacidade de manter as características após processos de esterilização é de extrema importância para qualquer forma farmacêutica, pois delas dependem o efeito farmacológico e conseqüentemente a eficácia terapêutica. Porém, no caso de sistemas de liberação controlada baseados em matrizes poliméricas, a estabilidade física é de igual importância para garantir segurança e eficiência na liberação do fármaco encapsulado (SILVA-JUNIOR et al, 2008b).

5.6.4.1- Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A figura 71 apresenta os resultados de DSC para as amostras MP15, MP15-10KGy e MP15-25KGy. Os dados mostram que todos os eventos térmicos são integralmente mantidos após o processo de esterilização. O evento de fusão do CT na região de 140 a 150°C ocorre de forma idêntica em todas as amostras, apenas um pouco mais intenso nas amostras esterilizadas, bem como o evento de degradação do PLGA a partir de 300°C . Apenas o evento de transição vítrea do polímero aparece de forma mais discreta nas amostras esterilizadas em comparação com a MP15.

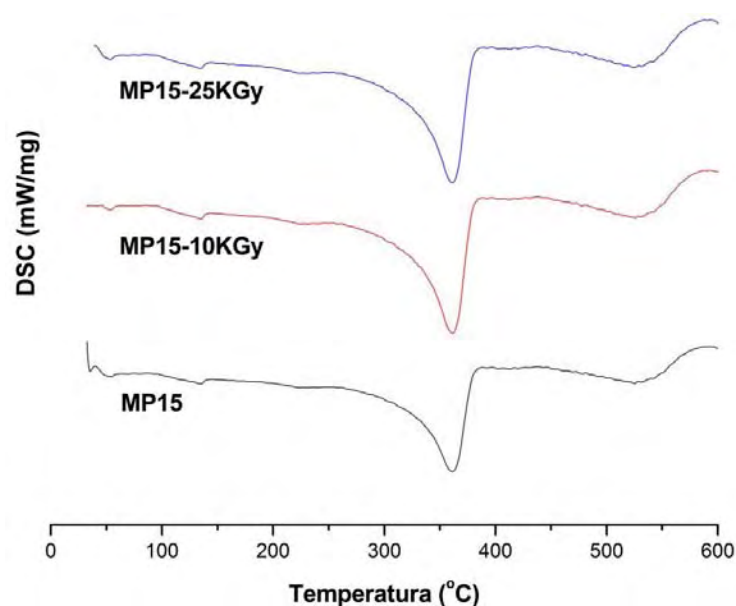


Figura 71 – Curvas de DSC das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco não irradiadas (MP15), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP15-10KGy) e 25KGy (MP15-25KGy) sobrepostos obtidas em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

A figura 72 apresenta os resultados de DSC para as amostras MP25, MP25-10KGy e MP25-25KGy. Todos os eventos mostrados nas curvas das micropartículas irradiadas podem também ser observados na curva da MP25, mais uma vez diferindo somente quanto às intensidades.

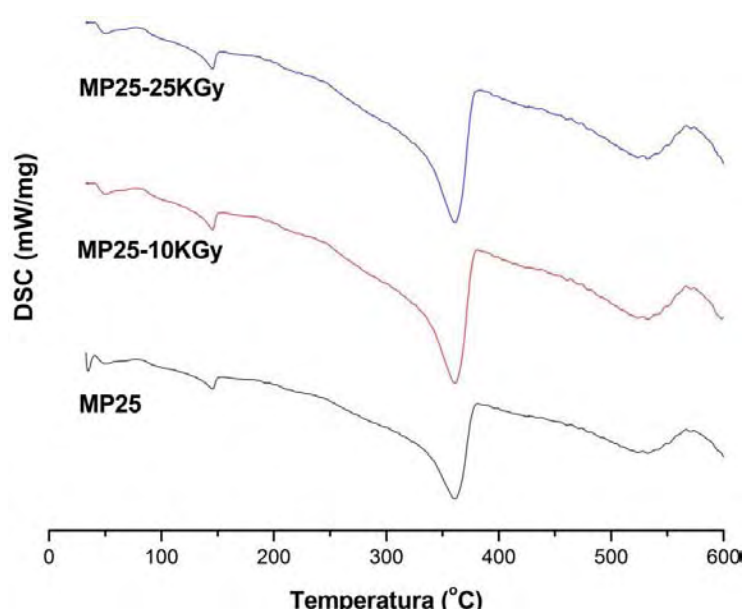


Figura 72 – Curvas de DSC das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco não irradiadas (MP25), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP25-10KGy) e 25KGy (MP25-25KGy) sobrepostos obtidas em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

A análise comparativa das figuras 71 e 72 mostra que não houve deslocamentos de picos para regiões de temperaturas diferentes ou inversões e desproporcionalidades nas intensidades dos picos referentes aos eventos do CT e do PLGA.

A tabela 8 apresenta os valores de entalpia referentes aos eventos descritos nas análises de DSC.

Tabela 8- Valores de entalpia relacionados aos eventos térmicos das micropartículas analisados por DSC.

Amostra	Transição vítrea PLGA	Fusão CT	Degradação CT-PLGA
MP15	41,27-59,66°C [$\Delta H = -8,45 \text{ Jg}^{-1}$]	116,57-148,83°C [$\Delta H = -7,89 \text{ Jg}^{-1}$]	330.50-390,56°C [$\Delta H = -485,30 \text{ Jg}^{-1}$]
MP15-10KGy	41,86-58,12°C [$\Delta H = -7,82 \text{ Jg}^{-1}$]	116,22-149,07°C [$\Delta H = -10,31 \text{ Jg}^{-1}$]	328.65-396,60°C [$\Delta H = -514,22 \text{ Jg}^{-1}$]
MP15-25KGy	40,66-59,12°C [$\Delta H = -9,02 \text{ Jg}^{-1}$]	115,98-149,53°C [$\Delta H = -10,93 \text{ Jg}^{-1}$]	329.15-397,84°C [$\Delta H = -520,71 \text{ Jg}^{-1}$]
MP25	41,67-54,87°C [$\Delta H = -4,15 \text{ Jg}^{-1}$]	134,30-152,90°C [$\Delta H = -12,18 \text{ Jg}^{-1}$]	327,64-379,45°C [$\Delta H = -602,70 \text{ Jg}^{-1}$]
MP25-10KGy	40,48-56,12°C [$\Delta H = -6,03 \text{ Jg}^{-1}$]	133,49-157,12°C [$\Delta H = -18,58 \text{ Jg}^{-1}$]	325,37-381,38°C [$\Delta H = -795,13 \text{ Jg}^{-1}$]
MP25-25KGy	40,35-57,89°C [$\Delta H = -7,11 \text{ Jg}^{-1}$]	133,21-158,38°C [$\Delta H = -20,13 \text{ Jg}^{-1}$]	324,19-384,66°C [$\Delta H = -805,20 \text{ Jg}^{-1}$]

Os resultados obtidos nas análises mostram que existem diferenças entre os valores de entalpia das amostras. As micropartículas irradiadas apresentam valores de entalpia um pouco maiores quando comparados com as micropartículas não irradiadas. Entretanto isto se repete em todos os eventos descritos, e os valores embora maiores não foram destoantes dos apresentados nas micropartículas não irradiadas. Outro aspecto importante é que não houve mudanças no intervalo de temperatura onde os eventos ocorreram, indicando que a estabilidade térmica não foi comprometida pelo processo de esterilização.

Quando se compara os valores de entalpia com a concentração do constituinte relacionado ao evento descrito, as variações de energia são totalmente condizentes. As MP25s apresentam maiores entalpias relacionadas aos eventos de fusão do CT e a

degradação, e as MP15 apresentam maiores valores de entalpia relacionadas à transição vítrea do PLGA, assim como ocorrido em todas as análises pré-irradiação.

5.6.4.2- Termogravimetria e Termogravimetria derivada (TG/DTG)

As curvas de TG das amostras MP15, MP15-10KGy e MP15-25KGy estão apresentadas na figura 73. As curvas apresentam perfis muito semelhantes, e em todas é possível distinguir os eventos referentes às perdas de massa por degradação do CT iniciada próxima de 200°C, seguida da degradação do polímero.

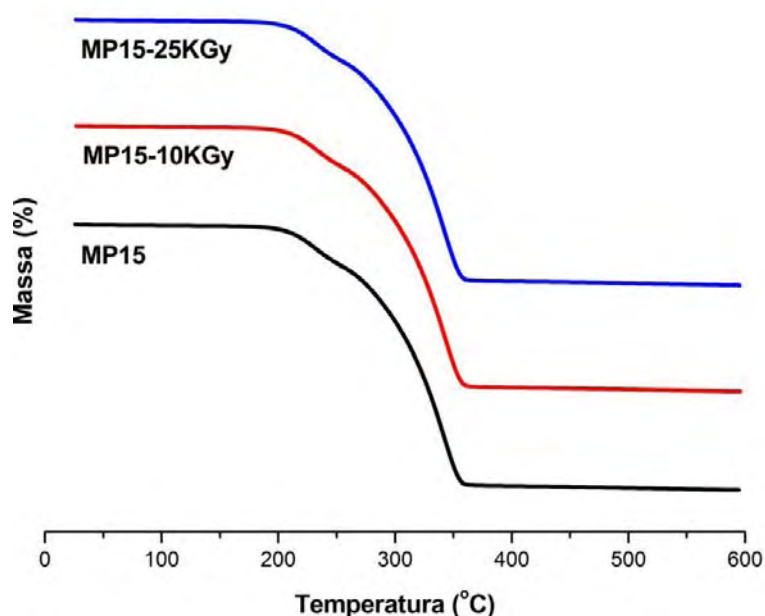


Figura 73- Curvas de TG das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco não irradiadas (MP15), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP15-10KGy) e 25KGy (MP15-25KGy) sobrepostos obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

A figura 74 apresenta as curvas de DTG das amostras MP15, MP15-10KGy e MP15-25KGy. Através da análise das curvas de DTG fica mais evidente que os eventos de degradação do fármaco e do polímero ocorrem de forma individual em todas as amostras. O perfil das curvas são extremamente semelhantes e todos os eventos descritos são coincidentes entre as amostras.

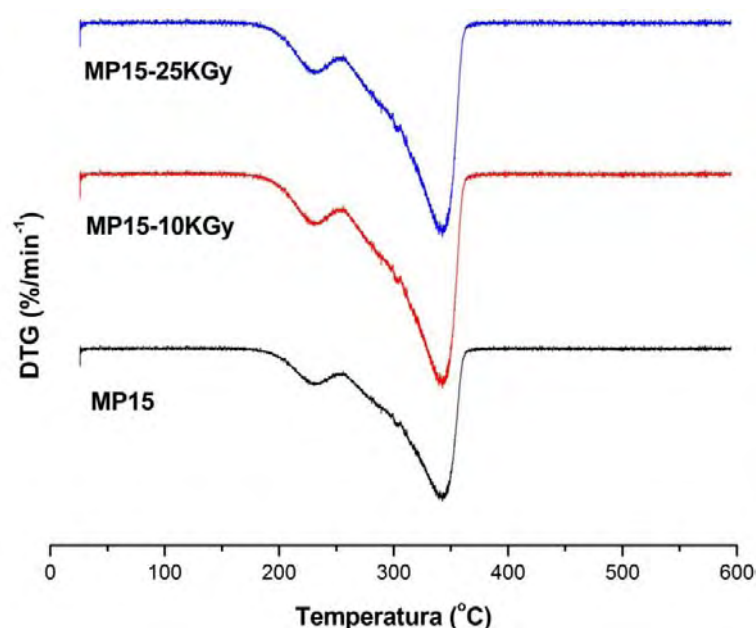


Figura 74- Curvas de DTG das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco não irradiadas (MP15), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP15-10KGy) e 25KGy (MP15-25KGy) sobrepostos obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

As curvas de TG das amostras MP25, MP25-10KGy e MP25-25KGy estão apresentadas na figura 75. Assim como ocorre com as amostras MP15 neste caso todos os eventos são praticamente idênticos em todas as amostras e é perceptível uma perda de massa maior referente ao CT.

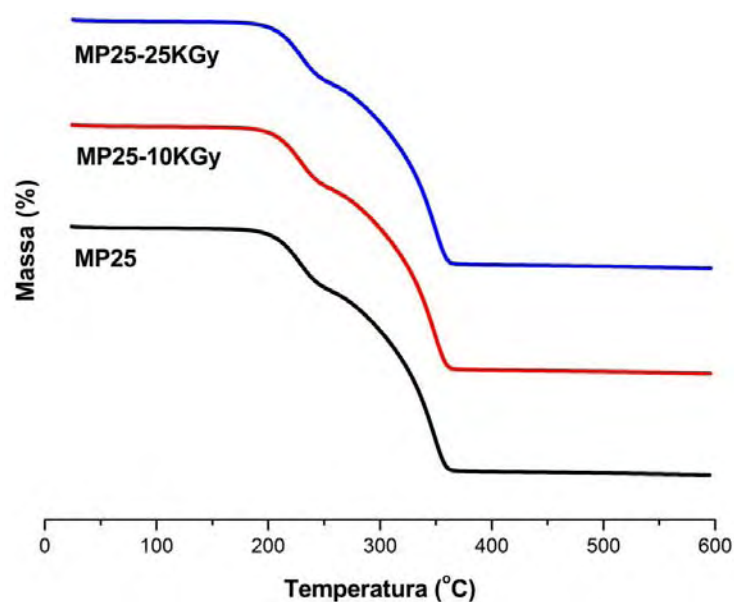


Figura 75- Curvas de TG das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco não irradiadas (MP25), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP25-10KGy) e 25KGy (MP25-25KGy) sobrepostos obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

A figura 76 apresenta as curvas de DTG das amostras MP25, MP25-10KGy e MP25-25KGy. Os eventos de degradação do CT são mais acentuados nessas amostras, seguidos imediatamente pelo evento de degradação do PLGA.

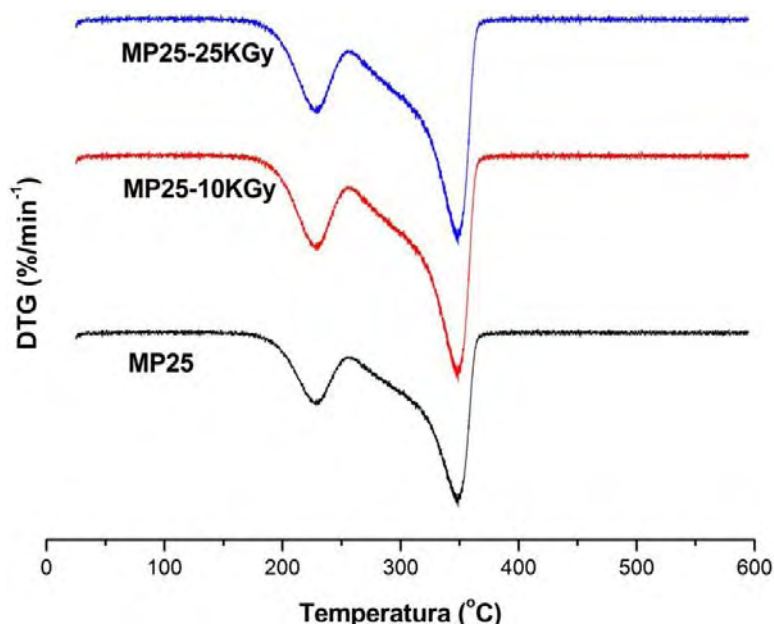


Figura 76- Curvas de DTG das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco não irradiadas (MP25), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP25-10KGy) e 25KGy (MP25-25KGy) sobrepostas obtidas em atmosfera de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

Como ocorreu em todas as curvas de análise térmica os perfis das amostras são muito semelhantes, não foi observada a presença de eventos novos que indiquem qualquer tipo de produto de degradação, fusão ou interação não esperada de fármaco e polímero.

A tabela 9 apresenta os valores de perda de massa descritos nas análises de TG.

Tabela 9-Valores de perda de massa relacionados aos eventos descritos nas análises de TG.

Amostra	Degradação CT	Degradação PLGA
MP15	176-251°C [$\Delta m=14,44\%$]	252-366°C [$\Delta m=88,30\%$]
MP15-10KGy	177-253°C [$\Delta m=14,47\%$]	254-369°C [$\Delta m=88,04\%$]
MP15-25KGy	177-254°C [$\Delta m=14,52\%$]	255-371°C [$\Delta m=87,98\%$]
MP25	180-249°C [$\Delta m=23,42\%$]	250-361°C [$\Delta m=73,60\%$]
MP25-10KGy	180-250°C [$\Delta m=23,88\%$]	251-361°C [$\Delta m=73,25\%$]
MP25-25KGy	181-252°C [$\Delta m=23,71\%$]	253-362°C [$\Delta m=73,41\%$]

Os valores obtidos nas análises de TG foram praticamente idênticos aos obtidos nas amostras não irradiadas. A avaliação de todos os resultados de análise térmica indica que a radiação gama nas doses de 10 e 25 KGy empregadas como método de esterilização não afeta a estabilidade térmica das micropartículas.

5.6.5- Difração de raios-X (DRX)

Embora as amostras selecionadas não tenham apresentado picos de cristalinidade referentes ao CT nos estudos de pré-esterilização, devido à predominância da característica amorfa do PLGA na amostra, o ensaio foi repetido na pós-esterilização para verificar se o uso da radiação gama como método de esterilização seria capaz de alterar a característica amorfa das micropartículas.

A figura 77 apresenta os difratogramas de raios-X das amostras MP15, MP15-10KGy e MP15-25KGy. Os resultados não apresentaram nenhum pico indicativo de cristalinidade nas amostras irradiadas, indicando que a radiação gama nas concentrações empregadas, não provocam alterações na banda amorfa predominante desta amostra.

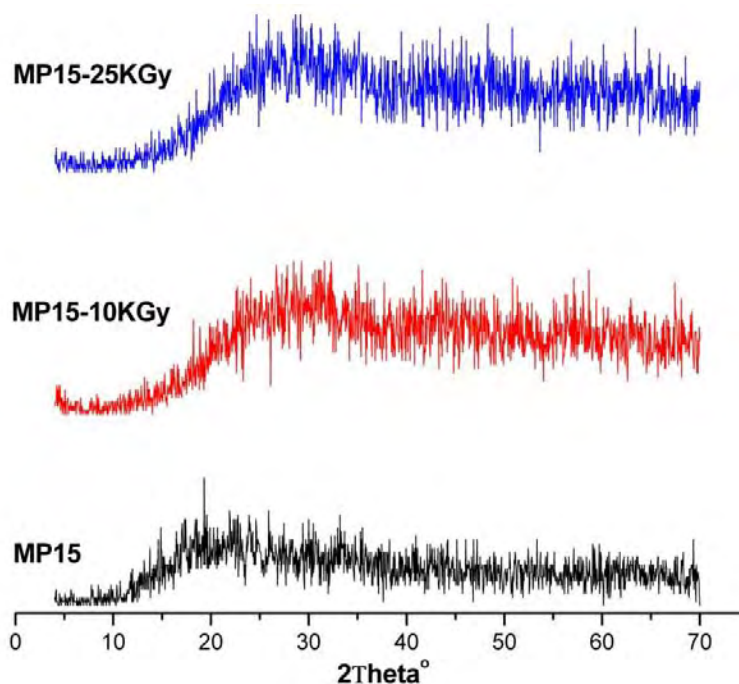


Figura 77 – Difratomogramas de raios-X das micropartículas de PLGA contendo 15% de cetorolaco não irradiadas (MP15), e irradiadas com radiação gama nas doses 10KGy(MP15-10KGy) e 25KGy(MP15-25KGy) sobrepostos.

Os difratogramas de raios-X das amostras MP25, MP25-10KGy e MP25-25KGy estão apresentados na figura 78.

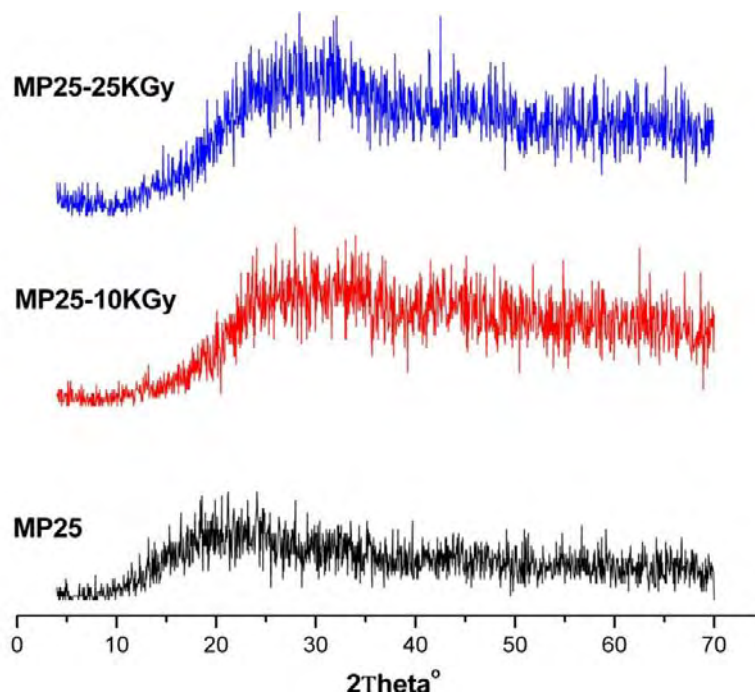


Figura 78 – Difratomogramas de raios-X das micropartículas de PLGA contendo 25% de cetorolaco não irradiadas (MP25), e irradiadas com radiação gama nas doses 10KGy (MP25-10KGy) e 25KGy (MP25-25KGy) sobrepostos.

Assim como ocorreu com as amostras irradiadas com menor concentração de CT, não foram identificados picos de cristalinidade quando as micropartículas foram submetidas à dose de 25K Gy de radiação gama. Entretanto não é possível afirmar se ocorreram ou não alterações na organização estrutural das amostras, pois mesmo antes do processo de irradiação, a presença do PLGA em concentração muito superior na amostra fazia com que os picos de cristalinidade do CT fossem suprimidos pela banda amorfa do polímero, de forma que as características do PLGA prevalecessem na amostra. Desta forma, pode-se afirmar que a radiação gama nas doses de 10K Gy e 25K Gy não promoveu modificação das características amorfas das micropartículas analisadas.

5.6.6- Determinação da eficiência de encapsulação do CT nas micropartículas de PLGA após a irradiação por raios gama.

A metodologia de análise empregada foi a mesma utilizada para as micropartículas antes de serem submetidas ao processo de esterilização (item 5.3). Os resultados obtidos estão expressos na tabela 10.

Tabela 10- Resultados do doseamento das micropartículas de PLGA contendo cetorolaco.

Amostras	Concentração Teórica de CT (µg/mg amostra)	Concentração Obtida de CT (µg) ± DP	Eficiência de Encapsulação (%)
MP15	150	147,7 ± 1,71	98,28 ± 1,15
MP15-10K Gy	150	147,9 ± 1,12	98,80 ± 0,85
MP15-25K Gy	150	147,1 ± 1,30	98,58 ± 0,92
MP25	250	241,8 ± 2,06	96,72 ± 1,07
MP25-10K Gy	250	242,0 ± 3,44	96,88 ± 1,35
MP25-25K Gy	250	244,7 ± 2,51	97,36 ± 1,02

Os resultados do ensaio de quantificação das micropartículas não mostraram alteração nos níveis de CT encapsulado. Todas as amostras mantiveram os valores das eficiências de encapsulação altas, acima de 95%, e com desvio padrão bastante baixo. Estes resultados indicam que a exposição das micropartículas a radiação gama nas doses de 10 KGy e 25KGy não provocou decomposição do cetorolaco microencapsulado nas partículas de PLGA.

5.6.7- Estudo de liberação *in vitro* do CT a partir das micropartículas

A figura 79 apresenta os perfis de liberação do CT a partir das MP15, MP15-10KGy e MP15-25KGy.

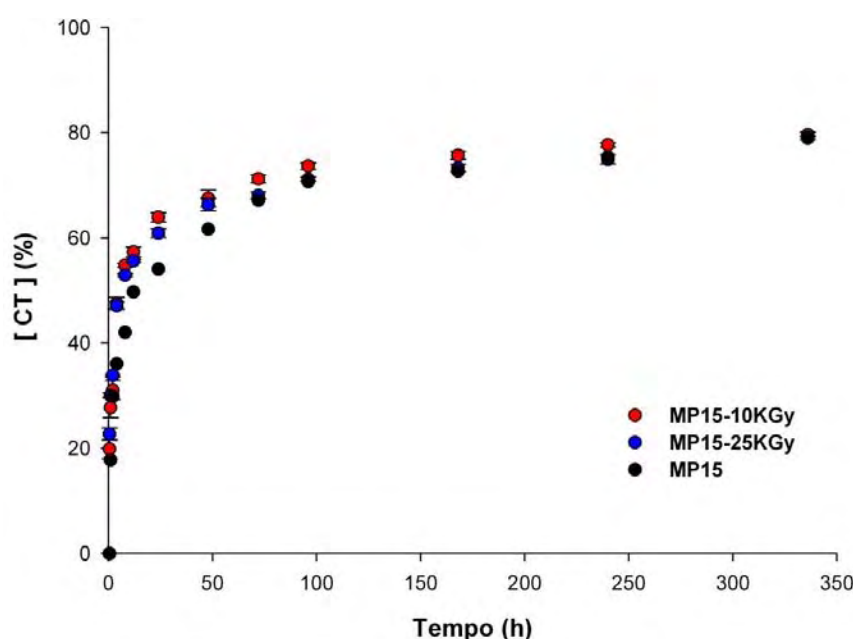


Figura 79- Perfis de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 15% de fármaco não irradiadas (MP15), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP15-10KGy) e 25KGy (MP15-25KGy) sobrepostos.

A análise dos resultados da figura 79 mostra perfis de liberação do CT semelhantes aos das micropartículas não irradiadas. Não houve diferenças significativas nas

velocidades de liberação do CT antes e após a irradiação indicando a manutenção das integridades química do fármaco e do polímero. Também pode-se deduzir que a radiação gama não provocou nenhum tipo de interação entre o fármaco e a matriz polimérica.

Os perfis de liberação do CT a partir das MP25, MP25-10KGy e MP25-25KGy estão apresentados na figura 80.

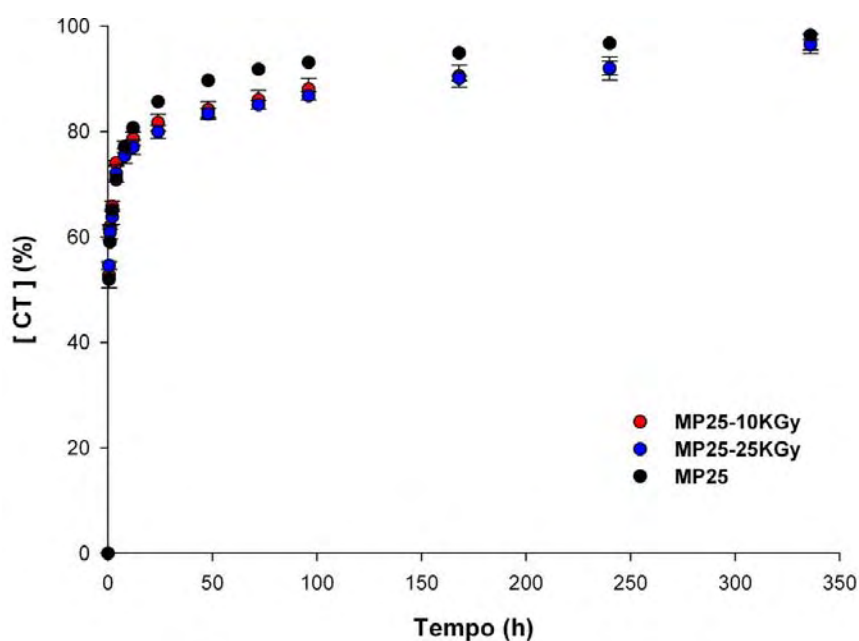


Figura 80- Perfis de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA contendo 25% de fármaco não irradiadas (MP25), e irradiadas com radiação gama nas doses de 10KGy (MP25-10KGy) e 25KGy (MP25-25KGy) sobrepostos.

Os perfis de liberação das amostras irradiadas novamente estão muito semelhantes aos apresentados pela amostra não irradiada, e com o mesmo perfil cinético na liberação. Note-se a exemplo das MP15, uma liberação gradual durante as 336 horas da liberação, coincidindo com as amostras não irradiadas.

Com o intuito de verificar a ocorrência de alguma alteração no mecanismo de liberação do CT os valores experimentais obtidos foram analisados através dos modelos matemáticos de Higuchi e de Korsmeyer-Peppas. Os resultados da análise matemática dos

dados experimentais através dos modelos de Higuchi e de Korsmeyer-Peppas estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros de ajuste dos resultados experimentais dos modelos teóricos da cinética de liberação *in vitro* do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA utilizando tampão fosfato 10mM pH 7,2 como meio receptor.

Amostra	Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	R ²	k	R ²	n	a
MP15	0,9725	22,49	0,9945	0,1689	32,79
MP15-10KGy	0,9650	22,91	0,9899	0,1575	34,53
MP15-25KGy	0,9672	22,37	0,9938	0,1482	35,08
MP25	0,9230	30,28	0,9982	0,0846	61,93
MP25-10KGy	0,9140	29,37	0,9988	0,0741	62,92
MP25-25KGy	0,9171	29,08	0,9994	0,0758	61,84

Em todos os casos as amostras submetidas à irradiação apresentaram valores ajustáveis ao modelo de Higuchi ($R^2 > 0,90$), os quais foram também analisados pelo modelo de Korsmeyer-Peppas ($n < 0,5$), para verificar alguma possível modificação do mecanismo de liberação, provocada pela irradiação. Os valores de constante de liberação do modelo de Higuchi (k) são muito parecidos com os obtidos pelas amostras não irradiadas. No ajuste dos resultados obtidos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas também não foram observadas diferenças consideráveis nos valores de expoente de liberação (n) e constante de liberação (a), entretanto podemos estabelecer uma relação entre os valores de (n) e (a). Conforme os valores de (n) diminuem os valores de (a) aumentam, porem como todos os valores de (n) estão abaixo de 0,5, ou seja, característico de liberação por difusão, não houve alteração no mecanismo de liberação após o processo de irradiação.

5.7. Estudo de biodisponibilidade do CT a partir das micropartículas usando coelhos albinos.

Uma alíquota de 0,1mL de humor vítreo de cada amostra foi adicionada a um eppendorff® contendo 0,1mL de fase móvel (solução de ácido acético 2% pH 4,3: ACN, 7:3) e 0,1mL de ácido perclórico, para precipitar proteínas. O frasco foi agitado durante aproximadamente um minuto e centrifugado durante 20 minutos a 14.000 rpm. Posteriormente uma alíquota de sobrenadante foi retirada e analisada por HPLC, através de metodologia previamente validada (ROSSANEZI, 2008).

Os resultados obtidos nas análises foram aplicados na equação obtida através da regressão linear da curva de calibração do CT (figura 81).

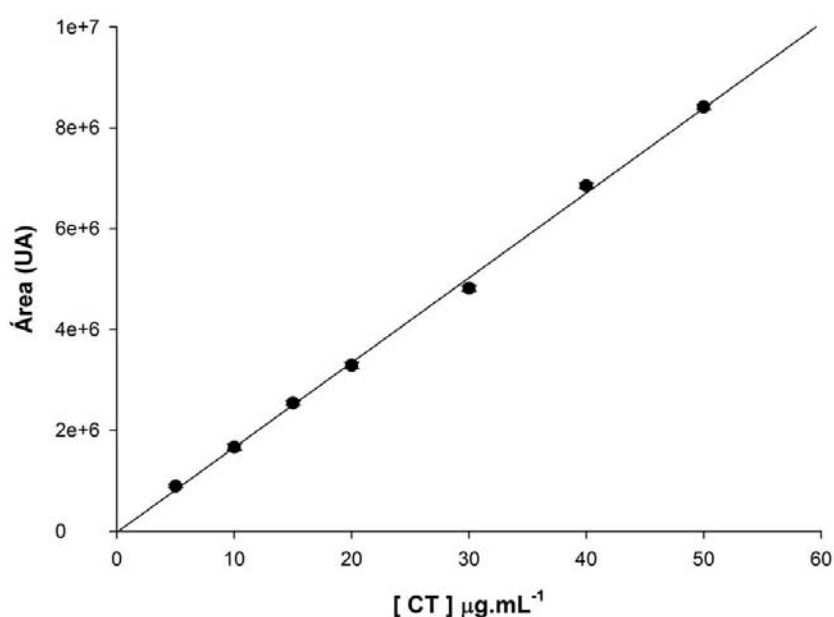


Figura 81- Curva analítica do cetorolaco em acetonitrila: solução de ácido acético 2% pH 4,3 (3:7).

$$\text{Equação (5)} \quad Y = 168222,37 \cdot x - 18528,03 \quad r^2 = 0,998$$

A figura 82 apresenta os resultados da farmacocinética ocular para a solução aquosa de CT (controle). Os resultados apresentam concentração máxima na primeira hora de

ensaio, em seguida os níveis de CT começam a diminuir. Durante as primeiras horas a queda na concentração é acentuada chegando próxima do valor de meia vida do fármaco. A eliminação CT continua com velocidades cada vez menores até a última coleta com 360 horas de ensaio.

Considerando o tempo de meia vida do cetorolaco de trometamina que é de aproximadamente duas horas, o uso do cetorolaco em sua forma ácida aumenta em mais de 20 horas esse tempo, o que representa um aumento considerável no tempo necessário para sua eliminação.

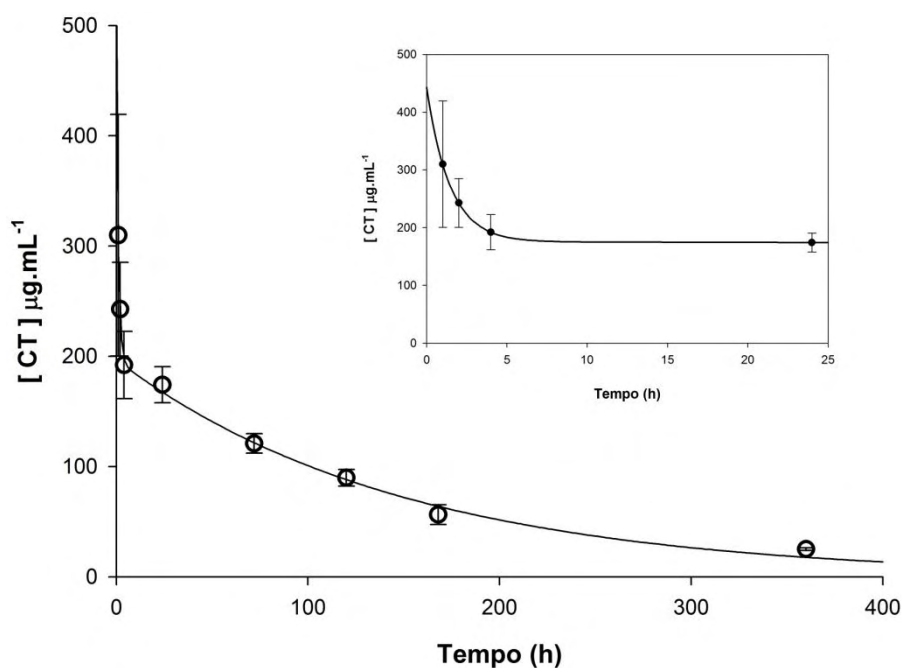


Figura 82- Farmacocinética ocular do cetorolaco em solução aquosa administrado em dose única por via intravitreal.

A figura 83 apresenta o perfil farmacocinético do cetorolaco a partir das micropartículas de PLGA. Assim como ocorrido com o grupo controle, as micropartículas apresentaram máxima concentração no vitreo nas primeiras horas do experimento, com diminuição da concentração ocorrendo de forma mais lenta que o grupo controle.

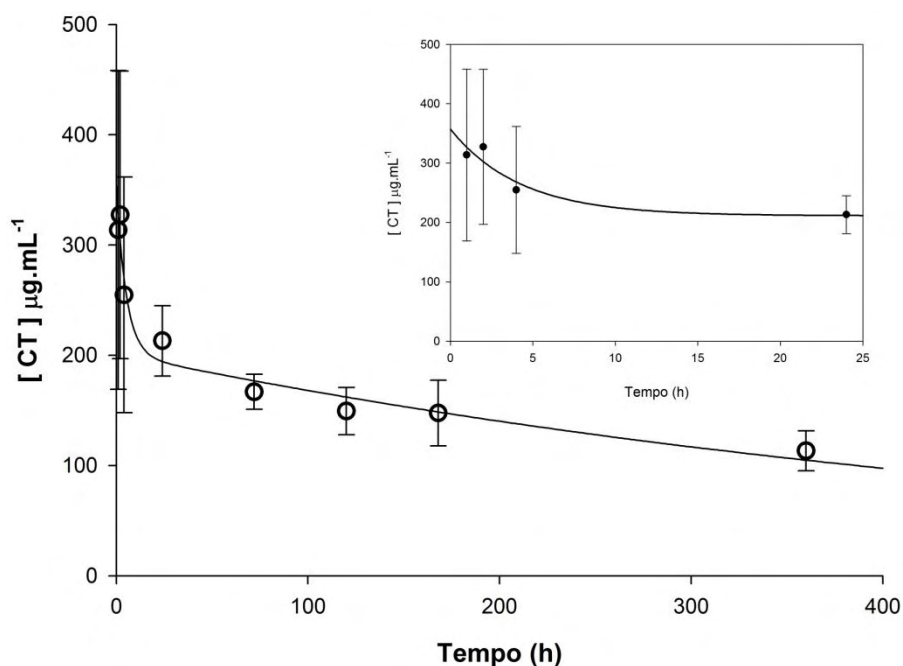


Figura 83- Farmacocinética ocular do ceterolaco a partir das micropartículas de PLGA administradas em dose única por via intravitreal.

A manutenção de concentrações de CT durante 15 dias de experimento refletem os resultados obtidos no ensaio de liberação *in vitro*. A diferença do perfil farmacocinético entre o grupo controle e o grupo tratado com micropartículas pode ser melhor visualizada na figura 84.

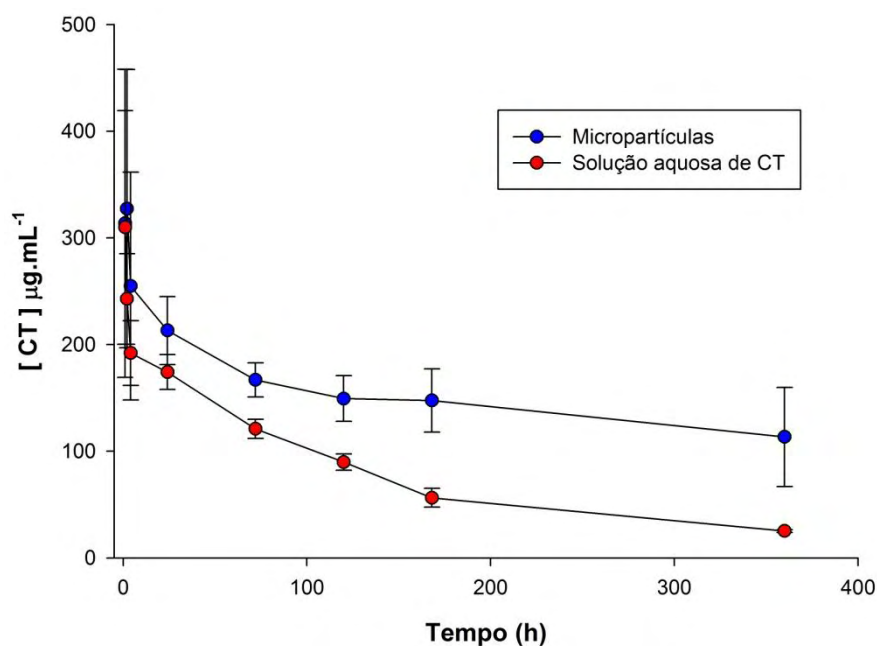


Figura 84- Sobreposição dos perfis farmacocinéticos do ceterolaco em solução aquosa e das micropartículas de PLGA contendo ceterolaco (* $p < 0,05$ Mann-Whitney).

Observando a figura comparativa percebe-se que a concentração de CT presente no humor vítreo tratado com micropartículas após 15 dias é aproximadamente 4 vezes maior que as concentrações encontradas no vítreo tratado com solução aquosa, comprovado estatisticamente ($p < 0,05$). Ainda a título de comparação, pode-se evidenciar que a concentração de CT no vítreo tratado com micropartículas após 15 dias é semelhante a concentração encontrada no grupo controle 3 dias após as administrações.

Com a finalidade de analisar melhor o efeito da incorporação do CT nas micropartículas de PLGA na cinética intraocular, frente a solução aquosa de CT, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos a partir das curvas obtidas no ensaio de biodisponibilidade *in vivo*.

O cálculo da constante de eliminação do fármaco pode auxiliar na comparação entre os perfis de biodisponibilidade. De acordo com Cawello (2003), e Toutain e Bousquet-Mélou (2004), a constante de eliminação é calculada utilizando os valores obtidos em intervalos de coletas, após a etapa de absorção e distribuição do fármaco, ou seja, após o decaimento do pico máximo de concentração, obtido nos primeiros intervalos de coleta. Esses valores são colocados em gráficos e adequados de acordo com a equação abaixo e são obtidos os valores de constante de eliminação.

$$\text{Equação (6)} \qquad C(t) = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

onde, C_0 é concentração de fármaco no início de tempo selecionado, $C(t)$ é a concentração de fármaco no tempo determinado e k é valor da constante de eliminação do fármaco para o intervalo denominado.

Para o cálculo da constante de eliminação foram selecionados os resultados obtidos nos intervalos entre 2 horas e 15 dias de ensaio, tanto para o grupo controle como para o

grupo tratado com micropartículas. O perfil farmacocinético do grupo controle apresenta um valor de constante de eliminação (k) de $0,0072 \mu\text{g}.\text{min}^{-1}$, enquanto o grupo tratado com micropartículas apresenta o valor de k de $0,0018 \mu\text{g}.\text{min}^{-1}$. Tal diferença na velocidade de eliminação reflete em maior concentração de CT disponível por um período maior de tempo no humor vítreo.

A tabela 12 apresenta um resumo dos parâmetros farmacocinéticos calculados. Os valores de C_{max} (concentração máxima de CT quantificado no humor vítreo) e T_{max} (intervalo de tempo no qual foi quantificada a C_{max}), não apresentaram diferenças significativas nos tratamentos avaliados. Os valores de ASC_{0-360} , que refletem a concentração de CT durante o decorrer das 360 horas de ensaio de biodisponibilidade são significativamente maiores no tratamento com micropartículas, e levando-se em conta os valores de $\text{ASC}_{0-\infty}$ (valores estimados para o tempo infinito) a diferença entre os tratamentos é ainda maior.

Tabela 12 – Parâmetros farmacocinéticos do ceterolaco após administração intravítreal da formulação controle (solução aquosa de ceterolaco) e micropartículas de PLGA contendo ceterolaco.

Parâmetro	Solução aquosa de CT	Micropartículas contendo CT
$C_{\text{max}} (\mu\text{g}.\text{mL}^{-1})$	$309,8258 \pm 109,53$	$313,6072 \pm 144,50$
$T_{\text{max}} (\text{h})$	1	1,2
$\text{ASC}_{0-360} (\mu\text{g}.\text{h}.\text{mL}^{-1})*$	$27945,98 \pm 2595,02$	$45937,1 \pm 13530,5$
$\text{ASC}_{0-\infty} (\mu\text{g}.\text{h}.\text{mL}^{-1})*$	$31892,8 \pm 2325,16$	$85593,4 \pm 18261,2$
$K_{\text{el}} (\text{h}^{-1})*$	$0,0072 \pm 0,0003$	$0,0018 \pm 0,0003$
$t_{1/2} (\text{h})*$	$108,9 \pm 9,03$	$242,54 \pm 63,27$
V_d	$2,979 \pm 0,4393$	$2,4954 \pm 0,5487$
$Cl (\text{h}.\text{mL}^{-1})*$	$0,0184 \pm 0,0016$	$0,00718 \pm 0,00018$

* $p < 0,05$ teste Mann-Whitney

Como consequência da diferença nos valores de k_{el} , avaliados anteriormente, os valores de $t_{1/2}$ também foram consideravelmente maiores no tratamento com micropartículas em comparação com o grupo controle.

Os valores de Cl (clearance local), ou capacidade do órgão ou sistema de eliminar o fármaco, apresentaram-se cerca de 2,5 vezes menor no tratamento com as micropartículas contendo CT frente o grupo controle.

A concentração de fármaco eliminada pelo órgão, sistema ou organismo está diretamente relacionada à concentração de fármaco dissolvido em uma determinada região. Neste caso, a concentração de CT dissolvido é maior na solução aquosa, pois as micropartículas estão dispersas e não solubilizadas, sendo assim o CT deve se desligar da matriz polimérica antes de dissolver-se no meio receptor (figura 85). Consequentemente evolui-se para uma situação onde a concentração de fármaco que é eliminada do globo ocular é dependente da concentração de fármaco dissolvido no humor vítreo, e a concentração de fármaco que se solubiliza é dependente da velocidade de eliminação. Ou seja durante as primeiras coletas a velocidade de eliminação é grande em ambos os casos devido a saturação do vítreo, entretanto nos intervalos seguintes ocorre a diferenciação devido à concentração de fármaco biodisponível no humor vítreo.

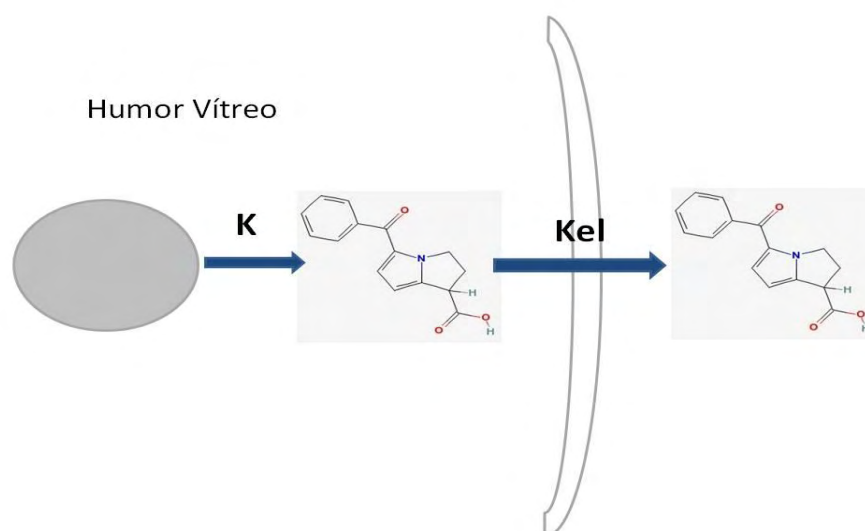


Figura 85- Representação do mecanismo de eliminação do ceftriaxone a partir das micropartículas de PLGA.

Esses dados são ótimos indicadores da capacidade das micropartículas de PLGA de promover liberação controlada de CT no humor vítreo, através de administração intravítreal.

É importante ressaltar que a dose administrada de CT (560 μg) foi um valor resultante da concentração Mp possível de ser dispersada em 0,1mL de amostra, volume indicado para administração em coelhos devido ao diâmetro e volume do globo ocular. No caso de pacientes humanos, o volume de injeção pode ser de 0,15 a 0,20mL, em função do maior volume do globo ocular, atingindo assim a concentração de CT normalmente administrada via intraocular que é de aproximadamente 1mg.

VI-CONCLUSÕES

Através da metodologia proposta para produção das micropartículas de PLGA contendo CT, foram obtidos sistemas microparticulados da ordem de 1 à 4 μm bastante aglomeradas que apresentam concentrações de CT variando entre 15% e 50% (m/m). Entretanto devido à alta concentração de CT nas MP50, a forma assumida por elas foi de esferas com folículos laminados de fármaco.

A caracterização das MPs mostrou que com o emprego da técnica de Spray drying como método de obtenção das micropartículas promoveu excelente eficiência de encapsulação em todas as amostras (acima de 90%). Os estudos de análise térmica mostraram que o método de obtenção não alterou de forma significativa os eventos térmicos apresentados pelos constituintes nas análises isoladas, entretanto ocorre a transformação do polimorfo I do CT em formas IV.

As análises de difração de raios-x indicam que as MP15 e MP25 assumem a característica amorfa, e os picos de cristalinidade do CT praticamente imperceptíveis. Diferentemente, as amostras MP35 e MP50 apresentam os picos de cristalinidade do fármaco mais definidos, entretanto o principal pico característico desaparece, indicando mudança de polimorfo. O aparecimento de picos de cristalinidade do CT nas amostras com maiores quantidades de fármaco mostram a crescente saturação da matriz polimérica.

As amostras apresentam diferenças quanto a forma e diâmetro médio, e estas estão diretamente relacionadas com a proporção de CT:PLGA das amostras.

A cinética de liberação apresentada pelas MPs mostrou um aumento no tempo de liberação, em relação ao fármaco livre, e independente da proporção de fármaco/polímero o mecanismo de liberação predominante é a difusão.

A irradiação das micropartículas por raios gama não promoveu alterações na concentração de CT presente nas MPs, no diâmetro médio, no perfil termoanalítico ou na cristalinidade das amostras analisadas. Também não foram identificadas diferenças entre os perfis de liberação das amostras irradiadas e não irradiadas, o que sugere que a irradiação por raios gama nas doses de 10 e 25 KGy podem ser utilizadas como métodos de esterilização desde que sejam confirmadas suas eficácias através de análises microbiológicas.

A avaliação do perfil de biodisponibilidade *in vivo* das MPs apresentaram menor velocidade de eliminação do CT em relação ao grupo controle, a partir das primeiras 24 horas do ensaio. Também a concentração de CT quantificada no humor vítreo dos animais tratados com micropartículas apresentou diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo controle a partir das 72 horas de ensaio.

Com base em todos resultados obtidos pode-se afirmar que as micropartículas poliméricas biodegradáveis constituem uma estratégia tecnológica eficiente para liberação prolongada de CT no humor vítreo durante mais de 15 dias, através de administração de dose única por via intravítreal.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKULA, S.K.; MA, P.E.; PEYMAN, G.A.; RAHIMY, M.H.; HYSLOP, N.E.; JANNEY, A.; ASHTON, P. Treatment of cytomegalovirus retinitis with intravitreal injection liposome encapsulated of ganciclovir in a patient with AIDS. **Brit. J. Ophthalm.**, v. 78, p. 677-680, 1994.
- ANDREO FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, Brasília, v.9, n. 1/5, p.18-21, 1999.
- ANSEL, H.C.; POPHOVICH, N.G; ALLEN-JR., L.V. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. **6ª ed. Tradução Oliveira, A.G. et al.. São Paulo: Editora Premier, 2000, p.65.**
- ANTHONY, D.; JASINSKI, D.M. Postoperative pain management: Morphine versus ketorolac. **J. Perianest. Nurs.**, v.17, n.1, p. 30-42, 2002.
- ARIFIN, D.Y.; LEE, L.Y.;WANG, C. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.58, p.1274-1325, 2006.
- BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2nd ed. – Drugs and pharmaceutical sciences; Taylor & Francis Group, New York, v.73, p. 1- 122, 2006.
- BONINI-FILHO, M.A.; JORGE,R.; BARBOSA,J.C.; CARDILLO, J.A.; COSTA, R.A. Intravitreal injection versus sub-Tenons infusion of triamcinolone acetonide for refractory diabetic macular edema: a randomized clinical trial. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, p. 3845-3849, 2005
- CAMPOS, M.A.; SANCHEZ, A.; ALONSO, J.M. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for delivery of drugs to the ocular surface. Application to ciclosporin A. **Int. J. Pharm.**, v. 224, p. 159-168, 2001.

- CARDILLO, J.A.; FARAH, M.E.; MORALES, P.H.; COSTA, R.A.; MELO, L.A.S.; KUPPERMAN, B.; JORGE, R.; ASHTON, P. An intravitreal biodegradable sustained release naproxen and 5-fluorouracil system for treatment of experimental post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. **Brit. J. Ophthalmol.**, v. 95, p. 262-270, 2004.
- CARDILLO, J.A.; PAGANELLI, F.; MELO JR, L.A.S.; SILVA-JUNIOR, A.A.; PIZZOLITO, A.C.; OLIVEIRA, A.G. Subconjunctival Delivery of Antibiotics in a Controlled-Release System. **Arch. Ophthalmol.** Vol.128(1), p. 81-87 , 2010.
- COLTHURST, M.J.; WILLIAMS, R.L.; HISCOTT, P.S.; GRIERSON. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**, v. 21, i. 7 p.649-665, 2000.
- COSTA, P.J.C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. RBCF, v.38, n.2, 2002.
- COUGHLAN, D.C.; CORRIGAN, O.I. Drug-polymer interactions and their effect on thermoresponsive poly (N-isopropylacrylamide) drug delivery systems. **Int. J. Pharm.** V.313, p.163-174, 2006.
- DALMORA, M.E.; DALMORA, S.L.; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrins and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.** V.222, p.45-55, 2001.
- DAS, M.K.; RAO, K.R. Evaluation of zidovudine encapsulated ethylcellulose microspheres prepared by water-in-oil-in-oil (w/o/o) double emulsion solvent diffusion technique. **Acta Polon. Pharmac.** V.63 n.2 p.141-148, 2006.
- Del AMO, E.M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. **Drug Disc. Today**, v.11, p.2, 2008.
- DILLOW, A.K.; LOWMAN, A.M. **Biomimetic Materials and Design. Biointerfacial strategies, tissue engineering and targeted drug discovery.** Marcel Dekker, Inc, New York, 2002.

- DING, S. Recent development in ophthalmic drug delivery. **PSTT**, v. 1, p. 328-335, 1998.
- DONNENFELD, E.D.; PERRY, H.D.; WITTPENN, J.R.; SOLOMON, R.; NATTIS, A.; CHOU, T. Preoperative ketorolac tromethamine 0,4% in phacoemulsification outcomes. **J. Cat. Ref. Surg.**, v.32, p.1474-1482, 2006.
- DUONG, H.V.Q.; 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. **J. Cat. Ref. Surg.**, v. 33, p.1925–1929, 2007.
- FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanism of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. **Int. J. Pharm.** V. 415, p.34-52, 2011.
- FINCH, C.A. Microencapsulation. In: ELVERS, B.; HAWKINS, S.; SCHULZ, G. **Olmann's encyclopedia of industrial chemistry**. 5th ed. Neinhene: VCH Verlagsgesellschaft, 1990, v.A16, p.575-588.
- FINI, A.; CAVALLARI, C.; OSPITALI, F. Raman and thermal analysis of indometacin/PVP solid dispersion enteric microparticles. **Eur. J. Pharm and Biopharm.**, v.70, p.409-420, 2008.
- FU, Y.J.; SHYU, S.S.; SU, F.H.; YU, P.C. Development of biodegradable co-poly (D,L-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 25, p. 269-279, 2002.
- GEROSKI, H. D.; EDELHAUSER, F.H. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 52, p. 37 – 48, 2001.
- GUPTA, A.K.; MADAN, S.; MAJUMDAR, D.K.; MAITRA, A. Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterization and ocular anti-inflammatory studies. **Int. J. Pharm.**, v.209, p.1-14, 2000.

- HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman's. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw Interamericaca do Brasil Ltda, 2003.
- HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, FM. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 52, p.5-16, 2001.
- HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 50, p.874-875, 1961.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate f release of solid dispersed in solid matrices. **J. Pharm. Sci**, New York, v. 52, p. 1145-1149, 1963
- JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 24, p. 703-727, 1998.
- JORGE R.; QUIRINO, L. S.; CARDILLO, J.A.; OLIVEIRA, A.G.; WANCZINSKI,B.J. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, p. 515-515, 2004.
- KIM, S.J.; FLACH, A.J.; JAMPOL, L.M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Ophthalmology. **Surv. Ophthalmol.**, v.55, n.2, 2010
- KIM, S.J.; TOMA, H.S. Inhibition of choroidal neovascularization by intravitreal ketorolac. **Arch Ophthalmol**. V.128, n.5, p.596-600, 2010.
- KIMURA, H.; OGURA, Y.; HASHIZOE, M.; NISHIWAKI, H.; HONDA, Y.; IKADA, Y. A new drug delivery system using an implantable polymer device. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 35, p. 2815-2819, 1994.
- KOMPELLA, B.U.; BANDI, N.; AYALASOMAYAJULA, S.P. Subconjunctival nano and microparticles sustain retinal delivey of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.**, v. 44, p. 1192-1201, 2003.

- KORSMEYER, R.W.; PEPPAS, N.A. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In ROSEMAN, T.J.; MANSDORF, S.Z. eds Controlled release delivery systems. New York: Marcel Dekker, 1981
- KUNOU, A.; OGURA, Y.; YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; MIYAMOTO, H.; HONDA, Y.; YKADA, Y. Long term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of Cytomegalovirus retinitis. **J. Control. Rel.** v. 68, p. 263-271, 2000.
- LIMA, A.C. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de praziquantel.** 2006. 83f. Dissertação(Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.
- MASTERS, K. **Spray drying handbook**, 5th ed. London: Longman Scientific and Technical, 1991.
- McCARRON, P.A.; WOOLFSON, A.D.; KEATING, S.M. Sustained release of 5-fluorouracil from polymeric nanoparticles. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, p. 1451-1459, 2000.
- 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.
- MYLES, M.E.; NEUMANN, D.M.; HILL, J.M. Recent progress in ocular drug delivery for posterior segment disease: Emphasis on transcleral iontophoresis. **Adv. Drug. Del. Ver.**, v.57, p.2063-2079, 2005.
- MONTANARI, L.; CONSTANTINI, M.; SIGNORETTI, E.C.; VALVO, L.; SANTUCCI, M.; BARTOLOMEI, M.; FATTIBENE, P.; ONORI, S.; FAUCITANO, A.; CONTI, B.; GENTA, I. Gamma irradiation effects on poly(lactide-co-glycolide) microspheres. **J. Control. Rel.**, v. 56, p. 219-229, 1998.

- MONTANARI, L.; CILURZO, F.; SELMIN, F.; CONTI, B.; GENTA, I.; POLETTI, G.; ORSINI, F.; VALVO, L. Poly(lactide-co-glicolide) microspheres containing bupivacaine: comparison between gamma and beta irradiation effects. **J. Control. Rel.**, v.90, p.281-290, 2003.
- MORITERA, T.; OGURA Y.; HONDA, Y.; WADA, R.; HYON, S.H.; IKADA, Y. Microspheres of biodegradable polymer as a drug delivery system in vitreous. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 32, p. 1785-1790, 1991.
- MORITERA, T.; OGURA, Y. ; YOSHIMURA, N.; HONDA, Y.; WADA, R.; HYON, S.H.; ICADA, Y. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 33, p. 3125-3130 , 1992.
- NADKARNI, S.R.; AND YALKOWSKI, S.H. Controlled delivery of pilocarpine. 1. In vitro characterization of gelfoam matrices. **Pharm. Res.**, v. 10 p. 109-112 , 1993.
- NAGARWAL, R.C.; KANT, S.; SINGH, P.N.; MAITI, P.; PANDIT, J.K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **J. Control. Rel.**, v. 136, p. 2-13, 2009.
- NANDIYANTO, A.B.D.; OKUYAMA, K. Progress in development spray drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to the submicrometer size ranges. **Adv. Powder Technol.** , v.22, p.1-19, 2011.
- OGURA.Y. Drug delivery to the posterior segment of eye. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 52, p. 1-3, 2001.
- OLIVEIRA, A.G; SCARPA, M.V.; BUENO, J.H.F.; EVANGELISTA, R.C. Micro e nanocápsulas. Um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 14, p. 37-49, 1992.
- PAGANELLI, F.; CARDILLO, J.A.; DARE, A.R.J., MELO JR, L.A.S.; SILVA-JUNIOR, A.A.; OLIVEIRA, A.G.; PIZZOLITO, A.C. LAVINSKY, D.; SKAF, M.; SOUZA FILHO,

- A.A.; HOFLING-LIMA, A.L.; NGUYEN, Q.D.; KUPPERMANN, B.D.; HERRERO-VANRELL, R.; BELFORT JR, R. Controlled transscleral drug delivery formulations to the eye: establishing new concepts. **Expert. Opin. Drug Deliv.** Vol. 7 (8), p. 955-965, 2010.
- PAGANELLI, F.; CARDILLO, J.A.; MELO JR, L.A.; OLIVEIRA, A.G; SKAF, M.; COSTA, R.A. A single intraoperative sub-tenon`s capsule triamcinolone acetonide injection for the treatment of post-cataract surgery inflammation. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 111, p. 2102-2108, 2004.
- PARIKH, D.M. **Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology.** 2nd ed.-Collection-Drugs and Pharmaceutical Sciences, Taylor & Francis Group, Boca Raton, v.158, 2005.
- PIGNATELO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.;PUGLISI, G. Eudragit RS 100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v, 16, p. 53-61, 2002.
- RANADE, V.V.; HOLLINGER, M.A. **Drug Delivery Systems.** 2nd ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2004.
- ROSSANEZI, G. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada de Cetorolaco de trometamina obtidas por Spray drying.** 2008, 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- SALARIS, M.; NIEDDU, M.; RUBATTU, N.; TESTA, C.; LUONGO, E.; RIMOLI, M.G.; BOATTO, G. Acid and base degraded products of ketorolac. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v..52, p. 320-322, 2010.
- SANSONE, F.; AQUINO, R.P.; Del GAUDIO, P.; COLOMBO, P.; RUSSO. P. Physical caracteritics and aerolsol performance of narigin dry powders for pulmonary delivery prepared by Spray drying. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.72, p.206-213, 2009.

- SHALABY, W.S.; BURG, K.J.L. **Absorbable and Biodegradable Polimers**, 2nd ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2004.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 328-343, 2008.
- SILER-MARINKOVIC, S.; MOJOVIC, L.; DAVINIC, V.; BUGARKY, B. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs. **Drug Dev. Ind. Pharm.** V. 23, n.5, 1997.
- SILVA, J. E. **Obtenção e caracterização de pellets para liberação prolongada de triancinolona a partir de micropartículas biodegradáveis de ácido poli-lático-co-glicólico**. 2004, 85f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- SILVA-JUNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; PESTANA, K.C.; MERCURI, L.P.; MATOS, J.R.; OLIVEIRA, A.G. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. **Thermochim. Acta.**, v.467, p. 91-98, 2008a
- SILVA-JUNIOR, A.A; MATOS, J.R; FORMARIZ, T.P.; ROSSANEZI, G.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T; OLIVEIRA, A..G. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. **Int. J. Pharm.** 2008 doi: 10.1016/j.ijpharm. 2008b. 09.054.
- SILVA-JUNIOR, A.A. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos**. 2005, 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara,2005
- SILVA-JUNIOR, A.A. **Micropartículas de ácido poli-lático-co-glicólico obtidas por Spray drying para liberação prolongada intra-ocular de fármacos**. 2008, 179f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara., 2008

- SOHN, Y.T.; SEO, H.O. Crystal forms of ketorolac. **Arch. Pharm. Res**, v.27, n.03, p.357-360, 2004.
- TAN, M.L.; CHOONG, P.F.M.; DASS, C.R.. Recent developments in liposome, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v.31, p-184-193, 2010.
- THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Informa Healthcare- Collection-Drugs and Pharmaceutical Sciences, Taylor & Francis Group, Boca Raton, v.166, 2007.
- THRIMAWITHANA, T.R.; YOUNG, S.; BUNT, C.R.; GREEN, C.; ALANY, R.G. Drug delivery to the posterior segment of eye. **Drug Disc. Today**, v.16 number 5/6, 2011.
- UCHEGBU, I.F.; SCHÄTZLEIN, A.G. **Polymers in Drug Delivery**. 1st ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006
- UHRICH, E.K.; CANIZZARO, MS.; LANGER, S.R.; SHAKESHEFF, M.K. Polimeric system for controlled drug release. **Am. Chem. Soc.**, v. 99, p. 3181-3198, 1998.
- VEHRING, R.. Pharmaceutical particle engineering via Spray drying. **Pharm. Res.**, v.25, n° 5, 2008.
- VEHRING, R.; FOSS, W.R.; LECHUCA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. **J. Aeros. Sci.**, v.38, p.728-746, 2007.
- VELLOSO, A.A.; ZHU Q.; HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, M.F. Ganciclovir loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.38, p. 665-675, 1997.
- WANCZINSKI, B.J. **Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina veiculados em copolímero termosensível (Pluronic F127) para aplicação intraocular**, 2005.

- Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S.P.. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **Int. J. Pharm.**, v.364, p. 298-327, 2008.
- YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; KUNOU N.; MIYAMOTO H.; HONDA Y.; OGURA Y.; IKADA Y. Biodegradable scleral implant for intravitreal implant controlled release of ganciclovir. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol**, 2000.