UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI LÁTICO-CO-GLICÓLICO OBTIDAS POR "SPRAY DRYING" PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA INTRA-OCULAR DE FÁRMACOS

ARNÓBIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

ARARAQUARA – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI LÁTICO-CO-GLICÓLICO OBTIDAS POR "SPRAY DRYING" PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA INTRA-OCULAR DE FÁRMACOS

ARNÓBIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e 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
2008

Silva Júnior, Arnóbio Antônio da

Micropartículas de ácido poli lático-co-glicólico obtidas por “spray drying” para liberação prolongada intra-ocular de fármacos / Arnóbio Antônio da Silva Junior, 2007. 179p.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.
Orientador: Prof.Dr. Anselmo Gomes de Oliveira.

1. Liberação intra-ocular de fármacos; 2. Micropartículas biodegradáveis; 3. Radiação gama; 4. “Spray drying” 5. ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) 6. triancinolona; 7. ciprofloxacino.

ARNÓBIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

"MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI LÁTICO-CO-GLICÓLICO OBTIDAS POR "SPRAY DRYING" PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA INTRA-OCULAR DE FÁRMACOS"

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 11/04/2008, consideraram o candidato: ***Arnóbio Antônio da Silva Júnior***

( ) REPROVADO (X) APROVADO

_____

Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

_____

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

_____

Prof. Dr. Vitor Hugo Sarmento

_____

Prof. Dr. Acácio Alves Souza de Lima Filho

_____

Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci

PRÓLOGO

Em 1997 ingressei no curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde rapidamente apaixonei-me pela profissão farmacêutica e tive a oportunidade de conviver com seres humanos fantásticos que me influenciaram bastante dentro da escola farmacêutica e em minha concepção de vida. Lá, tive a oportunidade de desenvolver várias atividades acadêmicas, entre as quais, a descoberta da docência, ministrando aulas de biologia e matemática em escolas da rede estadual de ensino. Em pouco tempo já me definia como um futuro "profissional do medicamento", pois sempre acreditei na força de transformação da Indústria Farmacêutica, graduando-me em Farmácia em 2001 e concluindo a Habilitação em Farmácia Industrial de Medicamentos em 2002, também na UFRN. No mesmo ano, tive a oportunidade de conhecer o prof. Dr. Anselmo Gome de Oliveira, pessoa pela qual tenho grande admiração por sua história de vida e pela capacidade de realização dentro das Ciências Farmacêuticas, que naquele ano, ao me falar de suas linhas de pesquisas, fez acender ainda mais o interesse pelas atividades de pesquisa, o qual resultou em minha vinda para o estado de São Paulo em 2003. No mesmo ano, tive a oportunidade de ingressar no curso de Mestrado em Ciencias Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Nesta etapa, conheci pessoas de uma espetacular formação científica e humanística, e pude desfrutar das companhias e de um intenso aprendizado.

Em 2005, iniciei este trabalho como parte dos requisitos fundamentais para o doutoramento em Ciências Farmacêuticas. Procurei me empenhar ao máximo e espero que as informações que o leitor aqui encontre consigam contribuir para os seus trabalhos, da mesma forma como contribuíram para minha formação acadêmica dentro das Ciências Farmacêuticas. Procurei descrever as atividades de pesquisa de forma objetiva, porém tentando apresentá-las de uma forma leve e de fácil compreeensão. Os capítulos I e II apresentam de forma resumida, um pouco da história sobre os trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa na presente década e a fundamentação teórica necessária para realização do presente trabalho. Os capitulos III, IV e V apresentam os resultados experimentais, em ordem cronológica de execução dos estudos, conforme o planejado no início deste trabalho em 2005.

Este tempo de crescimento científico, proporcionado pela realização deste trabalho, trouxe-me também grande evolução espiritual, reflexão pela qual me fez entender algumas das verdadeiras atribuições das pessoas que fazem a academia e a pesquisa dentro de nosso país. Um país paradoxal, onde pessoas tão pobres convivem ao lado de tanta riqueza e como uma nação tão potente consegue ser ao mesmo tão dependente de outras.

Em 2006 o Brasil viu formados mais de 10.000 doutores. No ano de 2007, a área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos foi classificada pelo Ministério de Ciência e Tecnologia-MCT como área estratégica para o desenvolvimento técnológico do país, com a atribuição de recursos financeiros específicos para a formação de recursos humanos especializados nesta área de pesquisa, há muito já "abraçada" por países com alto Índice de Desenvolvimento Humano e ecônomico.

Acontecimentos recentes demonstram o potencial tecnológico de nosso país e sua capacidade de desenvolvimento como uma nação igualitária e democrática. Para isso, torna-se necessária a aplicação de todos os seus recursos humanos capazes de gerar a transformação (Educadores, Professores e Pesquisadores), que deve transpor as barreiras dos laboratórios e salas de aula e permear a nossa sociedade, tornando-se não somente uma qualidade mas uma obrigação de todos.

Gostaria de expor aqui o meu muito obrigado à toda a nação brasileira que através de seus impostos, contribuíram para a realização deste trabalho, o qual considero não somente uma vitória pessoal, mas de todos, esperando que um dia possa devolver grande parte do que ganhei com a sua realização.

Faço minhas as palavras de Ariano Suassuna "*"O nosso país está em um fluxo rígido e constante de transformação rumo a uma coisa muito boa. Não me considero um pessimista, pois este é medíocre, também não me considero um otimista, pois este muitas vezes torna-se ingênuo, mas sigo tranquilamente no grupo dos realistas animados".*

Arnóbio Antônio da Silva Júnior.

EPÍGRAFE

A sabedoria inspira vida aos seus filhos;
ela toma sob sua proteção aqueles que a procuram;
ela os precede no caminho da justiça.
Aquele que a ama, ama a vida;
aqueles que velam por encontrá-la sentirão sua doçura.
Aqueles que a possuem terão a vida como herança,
e Deus abençoará todo lugar onde ele entrar.
Aqueles que a servem serão obidientes ao Santo;
aqueles que a amam serão amados por Deus.
Aquele que a ouve julgará nações;
aquele que é atento em contemplá-la permanecerá seguro.
Quem nela põe sua confiança tê-la-á como herança
e sua posteridade a possuirá,
pois na provação ela anda com ele,
e escolhe-o em primeiro lugar.
Ela traz-lhe temor, o pavor e a aprovação.
Ela o atormenta com sua penosa disciplina,
até que, tendo-o experimentado nos seus pensamentos,
ela possa confiar nele.
Então ela o porá firme, voltará a ele em linha reta.
Ela o cumula de alegria, desvenda-lhe seus segredos
e enriquece-o com tesouros de ciência, de inteligência e de justiça.
Porém se ele se transviar, ela o abandonará
E o entregará às mão do seu inimigo.

Livro do Eclesiástico
capítulo 4, versículos 12-22.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais ***Arnóbio Silva*** *e* ***Maria da Cruz*** *e aos meus queridos irmãos* ***Augusto, Hélio, Leonardo e Luciana*** *pelo amor, apoio, incentivo e ativa participação em todos os momentos de minha vida. A esta família que tanto amo, admiro e que está sempre comigo.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS por permitir-me aprender sobre as coisas da vida e tornar o aprendizado tão belo e infinito quanto à magnitude da nossa imaginação.

"***O senhor é meu pastor e nada me faltará"***

A Arnóbio, Maria da Cruz, Augusto, Hélio, Leonardo e Luciana e toda a minha família pelo incentivo dedicado ao longo destes anos de estudos e por tomar meu sonho como parte dos seus.

Arnóbio e Maria da Cruz, obrigado por fornecer os pilares que hoje sustentam as linhas de minha vida.

Augusto, obrigado por abrir o caminho e fazer com que meus primeiros passos encontrassem a terra mais firme, segura e mais próspera.

Hélio, obrigado por manter meus olhos sempre abertos ao longo dos caminhos, mantendo-se sempre alerta para minhas dúvidas e indecisões.

Leonardo e Luciana, obrigada pelo amor, incentivo e principalmente pela compreensão nos momentos em que a distância física não foi superada pelo amor e conexão espiritual.

À família, obrigado a vocês por permanecerem sempre próximos, mantendo-me sempre forte, fazendo-me entender na prática que vocês são a base de tudo.

Ainda que dominasse todas as línguas faladas e escritas pelos homens, não encontraria as palavras certas para expor minha gratidão a vocês. Simplesmente, amo vocês.

À Alianda Maira por seu amor, amizade, apoio e por compartilhar das alegrias e dificuldades encontradas nestes tempos.

O amor é o sentimento mais puro e admirável que, às vezes, pessoas muito especiais proporcionam-nos a oportunidade de conhecê-lo em sua plenitude.

Ao Prof. Dr. Anselmo, pela orientação, dedicação, confiança e aprendizado compartilhado, permanecendo sempre amigo para com as minhas dúvidas como jovem, estudante e pesquisador. Simplesmente, muito obrigado por tudo.

Os frutos vão à mesa cedo ou tarde. Ensinar a plantar é fácil, a cultivar talvez e a colher e saboreá-los mais fácil ainda. No entanto, poucos são aqueles que conseguem fazer entender como todo o processo funciona.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jivaldo Rosário de Matos e seus alunos do Laboratório de Análise Térmica Prof. Ivo Giolito (LATIG) do Instituto de Química da USP-SP, pelo acolhimento em seu laboratório, pelo treinamento, aprendizado proporcionado e enorme colaboração prestada nas análises térmicas realizadas neste trabalho.

Ao prof. Dr. Raul César Evangelista e à Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pelas colaborações prestadas no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Celso Santilli à Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci e ao Prof. Dr. Luís Otávio Bulhões pela colaboração prestada na realização das análises de difração de raios-X.

Ao prof. Dr. João Aristeu pela colaboração na análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Aos pesquisadores do Grupo de Pesquisa em Medicamentos Oftálmicos, em especial aos pesquisadores em oftalmologia Dr. José Augusto Cardillo e Fernando Paganelli pelas contribuições e colaboração durante a realização dos estudos *in vivo.*

Ao pesquisador Dr. Acácio Alves de Souza Lima Filho pelo intenso apoio e colaboração e amizade demonstrados e à Empresa Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda. pela bolsa de pesquisa concedida durante o primeiro semestre de realização deste trabalho, pela colaboração para realização do processo de exposição das micropartículas à radiação gama.

Aos professores do departamento de Farmácia da UFRN, em especial ao Prof. Dr. Túlio Moura, Prof^{a}. Mirza Medeiros, Eleanora e pela semente lançada tempos atrás.

Aos Docentes do departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Farmácia de Araraquara-UNESP, em especial aos Professores Dra. Maria Palmira, Dra. Ana Dóris e Dr. Raul César pela convivência no laboratório, apoio, amizade e pelo carinho demonstrado. À Dra. Virgínia Scarpa, Dra. Hérida Regina, Dra. Raquel; Dr. Luís Vítor, Dra. Leila Chiavacci, Dra. Chung Man Chin, Dra. Adélia, e Prof^{a}. Patrícia pelo imenso apoio, carinho e amizade demonstrados nestes anos.

Aos demais docentes da Faculdade de Farmácia de Araraquara-UNESP, em especial aos Professores Dra. Rosangela, Dr. Sandro Valentin, Dr. Ricardo Nunes,

Dra. Cleópatra e Dr. João Aristeu pelo apoio, incentivo, carinho e amizade demonstrada ao longo destes estes anos.

Aos meus amigos Matheus, Émerson, Ângelo, Cristiane, Nathan e Sara; Rodrigo Kitagawa, Rita e João Pedro; Najeh e Rubiana; Thiago Francês, Fernando Boldrini, Omar, Amin, Édson Crusca, Cézar e Eva; Thalita, Nélsom, Ederlan, Caio, Júlio Vinuezza, e todos os meus amigos pelo o apoio, troca de idéias e por tornar mais agradável a estadia em Araraquara.

Aos colegas docentes em especial ao Rodrigo Kitagawa, Rita, Sílvia, Paschoal, Daniel Sieveri, Débora, Valéria, Cibele, Silvana, Cristiane pelo carinho e apoio demonstrados.

Aos colegas e amigos pesquisadores do laboratório de Farmacotécnica e da pós-graduação pela amizade companheirismo e imensa contribuição para a realização deste trabalho, em especial a Gisele Oliveira, Beatriz Stringethi, Cristina Terrugi, Cristina Franzini, Kelly Pestana, Gustavo Rossanezi, Fabrício Medeiros, Ana Luiza, Priscileila, Flávia, Joceana, Flávio, Luana, Cristina, Ketlyn, Daniele, Marlus, Jean, Renato, Lorena, Ednir, Thaís Contente.

Aos alunos de iniciação científica, em especial a Joyce de Oliveira, Carla Kanemoto, Clarissa, Fernanda Carbinatto, Danilo Silva, Marina, Juliane e Juliana pelo aprendizado proporcionado.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial à Keila, Fátima, Zenaide, Margareth, Eduardo, Olívia, Tiana, Francisco, Éverson, José Bispo, Lazzareto, Sílvio, Plínio, Mário, Neto, Nélson, Delfino, Sérgio pela amizade e carinho.

A Iranir, Moacir, Ana, Max e a todos os demais funcionários do serviço técnico de Biblioteca da Faculdade pelo apoio e amizade.

A secretaria de pós-graduação em especial a Cláudia, Laura e Sônia.

A CAPES, CNPq, FAPESP, UNESP e a República Federativa do Brasil pelo apoio financeiro.

Esta, com certeza foi a página mais difícil de escrever, pois é impossível lembrar de todos àqueles que contribuíram ao logo destes tempos, registro aqui o obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o crescimento e para realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve o objetivo obter mediante a técnica de “spray drying”, dois sistemas microparticulados a base de ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) capazes de proporcionar níveis terapêuticos do fármaco administrado nos tecidos intraoculares. O primeiro sistema foi desenvolvido para o ciprofloxacino (CP), que é uma quinolona de segunda geração, para o uso em profilaxia e tratamento de endoftalmites. Enquanto, o segundo sistema foi para triancinolona (Tr), que é um antiinflamatório esteroidal, para uso no tratamento de diversas afecções do seguimento posterior do olho e doenças vitreoretinais. Como técnica de esterilização foi escolhida a irradiação gama, e para determinar o seu efeito, as micropartículas foram caracterizadas antes e depois da exposição a diferentes cargas de radiação (5,10,15 e 25kGy) quanto à morfologia, tamanho médio de partícula e a distribuição do tamanho de partículas usando a microscopia eletrônica de varredura. As interações fármaco-polímero e a microestrutura foram estudadas através da espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica e Termogravimetria derivada (ATG/DTG), e Difratometria de raios X. O teor de fármaco foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e foi investigado o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas de PLGA. Após a esterilização das micropartículas utilizando a carga de 25kGy de radiação gama, foi realizado o estudo *in vivo* em coelho albino como modelo animal, para o estudo de biodisponibilidade e determinação dos parâmetros farmacocinéticos dos sistemas administrados. A dose de 1mg/0,1mL de triancinolona em micropartículas foi administrada por via intravitreal e como controle foi utilizado a mesma dose do fármaco em suspensão. No caso do antimicrobiano, foi administrada a dose de 2mg/0,2mL de ciprofloxacino em micropartículas utilizando a via subtenoniana e como controle foi administrada a mesma dose de fármaco em solução salina tamponada. Também foi investigado eficácia das micropartículas frente ao uso do colírio de ciprofloxacino 0,3%. As micropartículas de PLGA carregadas com fármaco forneceram níveis terapêuticos por período de tempo prolongado quando comparado com os respectivos tratamentos controle utilizados.

ABSTRACT

The present work has the aim to obtain two spray dried poly lactide-co-glycolide microparticle systems able to supply therapeutic level by prolonged time of the drugs in the intraocular tissues. The first was developed for ciprofloxacin that is a quinolone derivative aiming its use in the prophylaxis and endophthalmitis treatment, while the second system was for triamcinolone that is a steroidal anti-inflammatory for treatment of several ocular diseases of posterior segment of eye and vitreoretinal diseases. The gamma irradiation was chosen as terminal sterilization procedure, and with aim to determine its effect, the drug-loaded PLGA microparticles were characterized after the radiation exposure (0, 5,10, 15 and 25 kGy). The morphology and particle size were investigated by scanning electronic microscopy (SEM). The drug-polymer interactions and the microstructure of the particles were accessed by infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC); thermogravimetry and derivative thermogravimetry (TG/DTG) and X-ray diffraction analysis. The drug content was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the *in vitro* drug release profile from PLGA microparticles was determined. After the gamma irradiation sterilization using the dose of 25kGy, the *in vivo* study was performed using healthy New Zeeland rabbit as animal model for bioavailability study and to determine the pharmacokinetic parameters. A dosage of $1 mg.mL^{-1}$ of Triamcinolone into PLGA microparticles was administered by intravitreal route. As control, the same dosage of non-encapsulated drug was administered in aqueous suspension. In the ciprofloxacin case, the dosage of $2 mg.mL^{-1}$ into PLGA microparticles was administered by sub-tenon's rout. As control, the same dosage of drug was administered in aqueous solution. The efficacy of CP-loaded PLGA microparticles was investigated too, using the ciprofloxacin 0.3% eye drops as control. The drug-loaded PLGA microparticles supplied therapeutic levels of drug by prolonged time in relation of different treatment controls used.

ABREVIATURAS

ATG (Análise termogravimétrica)

AUC (Área sob a curva)

AUMC (Área sob a curva no primeiro momento)

CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

CP (ciprofloxacino)

CV% (Coeficiente de variação)

DRX (Análise de difração de raios-X)

DSC (Calorimetria exploratória diferencial)

DTG (Termogravimetria derivada)

HA (Humor aquoso)

HV (Humor vítreo)

IV (Infravermelho)

kGy (unidade de medida de radiação “kilogray”)

LOD (Limite de detecção)

LOQ (Limite de quantificação)

McCp (Micropartículas de ácido poli lático-co-glicólico contendo ciprofloxacino)

McTr (Micropartículas de ácido poli lático-co-glicólico contendo triancinolona)

PLGA (ácido poli lático-co-glicólico)

Tg (Temperatura de transição vítrea do polímero)

Tr (triancinolona)

ΔH (Variação de energia)

Δm (Variação de massa)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teste de precisão do método CLAE para o ciprofloxacino	63p.
Tabela 2	Teste de precisão intermediária e de exatidão do método CLAE para o ciprofloxacino.	64p.
Tabela 3	Resultados para cálculo de LOD e de LOQ do ciprofloxacino nos líquidos intraoculares.	65p.
Tabela 4.	Teste de precisão do método CLAE para a triancinolona	69p.
Tabela 5.	Teste de precisão intermediária e de exatidão do método CLAE para a triancinolona.	70p.
Tabela 6.	Resultados para o cálculo de LOD e de LOQ da triancinolona na matriz biológica.	71p.
Tabela 7.	Efeito da radiação gama no tamanho das McCP.	88p.
Tabela 8.	Efeito da carga de radiação utilizada no teor de ciprofloxacino incorporado nas micropartículas de PLGA	90p.
Tabela 9.	Efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (DSC) das McCp.	100p.
Tabela 10.	Efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (ATG/DTG) das McCp.	101p.
Tabela 11.	Efeito da radiação gama na microestrutura das McCp por DRX.	105p
Tabela 12.	Efeito da radiação gama no tamanho das McTr.	110p.
Tabela 13.	Efeito da radiação gama no teor de triancinolona incorporada nas micropartículas de PLGA.	112p
Tabela 14.	Estudo do efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (DSC) das McTr.	122p.
Tabela 15.	Efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (TG/DTG) das McTr.	125p.
Tabela 16.	Efeito da radiação gama na microestrutura das McTr por DRX.	129p.
Tabela 17.	Parâmetros farmacocinéticos calculados para os diferentes tratamentos de ciprofloxacino investigados.	151p.

Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos calculados para os diferentes tratamentos de triancinolona investigados. 158p.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomia do olho humano.	28p.
Figura 2.	Histologia da Córnea.	29p.
Figura 3.	Estruturas oculares e vias de acesso e eliminação	30p.
Figura 4.	Estrutura química do triancinolona.	32p.
Figura 5.	Estrutura química do ciprofloxacino	34p.
Figura 6.	Estruturação das micropartículas.	38p.
Figura 7.	Funcionamento de um aparelho de “spray dryer”.	39p.
Figura 8.	Estrutura química do ácido glicólico, ácido lático e do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA).	41p.
Figura 9.	Curvas padrão do ciprofloxacino	60p.
Figura 10.	Teste de especificidade para o ciprofloxacino na matriz polimérica	61p.
Figura 11.	Teste de especificidade para o ciprofloxacino na matriz biológica	62p.
Figura 12.	Curvas padrão da triancinolona	66p.
Figura 13.	Especificidade para triancinolona na matriz polimérica.	67p.
Figura 14.	Especificidade para triancinolona na matriz biológica.	68p.
Figura 15.	Imagem de SEM das McCP	84p.
Figura 16.	Imagens de SEM das McCP depois da exposição à radiação gama.	85p.
Figura 17.	Distribuição do tamanho de partículas das McCP	86p.
Figura 18.	Distribuição do tamanho de partículas das McCP depois da exposição à radiação gama.	87p.
Figura 19.	Efeito da radiação gama no tamanho das McCP.	89p.
Figura 20.	Perfil cromatográfico do fármaco nas micropartículas antes e depois de exposição à radiação gama.	92p.
Figura 21.	Espectros de absorção na região do infravermelho do ciprofloxacino e do PLGA.	93p.

Figura 22. Espectros de absorção na região do infravermelho das McCP antes da exposição à radiação gama. 94p.
Figura 23. Espectros de IV das McCP depois da exposição à radiação gama. 95p.
Figura 24. Curvas de DSC e ATG/DTG das McCP. 97p.
Figura 25. Curvas de DSC e ATG/DTG das McCP após a exposição à radiação gama. 98p.
Figura 26. Curvas termoanalíticas de DSC e de TG/DTG das McCP. 99p.
Figura 27. Difratograma de raios-X obtido para o PLGA. 102p.
Figura 28. Difratograma de raios-X obtidos para o ciprofloxacino. 103p.
Figura 29. Difratogramas de raios-X obtidos para as McCP. 104p.
Figura 30. Imagem de SEM das McTr. 106p.
Figura 31 Imagens de SEM das McTr depois da exposição à radiação gama. 107p.
Figura 32. Distribuição do tamanho das McTr. 108p.
Figura 33. Distribuição do tamanho de partículas das McTr depois da exposição à radiação gama. 108p.
Figura 34. Efeito da radiação gama no diâmetro médio das McTr. 109p.
Figura 35. Perfil cromatográfico da triancinolona a partir das McTr. 110p.
Figura 36. Espectros de absorção na região do infravermelho da triancinolona e do PLGA. 113p.
Figura 37. Espectros de absorção na região do IV das McTr. 114p.
Figura 38. Espectros IV das McTr depois da exposição à radiação gama. 115p.
Figura 39. Curvas termoanalíticas de DSC e de ATG/DTG do PLGA. 116p.
Figura 40. Curvas termoanalíticas de DSC e ATG/DTG da triancinolona. 117p.
Figura 41. Curvas de DSC e de ATG/DTG das McTr. 118p.
Figura 42. Curvas de DSC e de ATG/DTG das McTr depois da a exposição à radiação gama. 119p.
Figura 43. Curvas de DSC e de ATG/DTG das McTr antes e depois da exposição à radiação gama. 120p.
Figura 44. Representação relação carga de radiação gama utilizada versus entalpia de recristalização do fármaco. 121p.

Figura 45. Relação da carga de radiação gama versus Tmax de fusão do fármaco presente nas micropartículas de PLGA. 123p.
Figura 46. Difratograma de raios-X obtido para o PLGA. 124p.
Figura 47. Difratograma de raios-X obtido para a triancinolona 126p.
Figura 48. Difratogramas de raios-X obtidos para as McTr. 127p.
Figura 49. Curva padrão da triancinolona em tampão Tris-HCl obtida por espectrofotometria de UV em 242nm. 128p.
Figura 50. Perfil de liberação da triancinolona a partir das micropartículas de PLGA. 130p.
Figura 51. Perfil de liberação da triancinolona a partir das McTr 131p.
Figura 52. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA e no HV após a administração do fármaco em micropartículas. 132p.
Figura 53. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA e no HV após a administração subtenoniana do fármaco em solução aquosa. 144p.
Figura 54. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA [fármaco em solução aquosa versus micropartículas]. 146p.
Figura 55. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA após a administração do colírio de ciprofloxacino 0,3%. 147p.
Figura 56. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA [colírio de ciprofloxacino 0,3% versus ciprofloxacino em micropartículas]. 148p.
Figura 57. Nível de concentração de triancinolona atingida no humor vítreo após a administração intravitreal da dose de 1mg de triancinolona em micropartículas. 149p.
Figura 58. Nível de concentração de triancinolona atingida no humor vítreo após a administração intravitreal da dose de 1mg de triancinolona em suspensão 153p.
Figura 59. Nível de concentração de triancinolona atingido no humor vítreo [suspensão convencional versus micropartículas]. 155p.

SUMÁRIO

RESUMO X

ABREVIATURAS XII

LISTA DE FIGURAS XV

I. INTRODUÇÃO 22

II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA 28

1. BARREIRAS PARA A LIBERAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS 28
2. FÁRMACOS UTILIZADOS 32
2.1. Triancinolona 32
2.2. Ciprofloxacino 33
3. MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM OFTALMOLGIA 36
3.1. Sistemas de liberação de fármacos para uso em oftalmologia 36
3.2. Secagem por atomização “spray drying” 39
3.3. Ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) 41
3.4. Esterilização de sistemas de liberação de fármacos para uso em oftalmologia 42

III. MÉTODOS DE ANÁLISE QUANTITATIVA 47

1. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE QUANTITATIVA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS 48
1.1. Especificidade e Seletividade 49
1.2. Linearidade e Alcance 49
1.3. Precisão 49
1.4. Exatidão 50
1.5. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) 50
1.6. Robustez 51
1.7. Estudos Realizados 52
2. OBJETIVOS 53
3. MATERIAL E MÉTODOS 54

3.1. Reagentes e solventes 54
3.2. Equipamentos e Acessórios 54
3.3. Instrumentação e condições cromatográficas do método CLAE para o ciprofloxacino. 55
3.4. Curvas analíticas padrão do ciprofloxacino 55
3.5. Instrumentação e condições cromatográficas do método CLAE para a triancinolona. 56
3.6. Curvas analíticas padrão da triancinolona 56
3.7. Estudo de validação 57
3.8. Análise estatística 59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60
4.1. Validação de método CLAE para análise quantitativa de ciprofloxacino em micropartículas de PLGA e a partir dos líquidos intraoculares 60
4.2. Validação de método CLAE para análise quantitativa de triancinolona em micropartículas de PLGA e a partir do humor vítreo. 66
5. CONCLUSÃO 72

IV. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MICROPARTÍCULAS 74

1. RADIAÇÃO GAMA COMO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO PARA MICROPARTÍCULAS DE PLGA 74
2. OBJETIVOS 75
3. MATERIAL E MÉTODOS 76
3.1. Reagentes e solventes 76
3.2. Equipamentos e Acessórios 76
3.3. Preparação das micropartículas de PLGA contendo ciprofloxacino 77
3.4. Preparação das micropartículas de PLGA contendo triancinolona 77
3.5. Exposição das micropartículas ao processo de radiação gama 77
3.6. Caracterização físico-química das micropartículas 78
3.7. Análise estatística 83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 84
4.1. Efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas de PLGA obtidas por “spray drying” carregadas com ciprofloxacino 85

4.2. Efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas de PLGA obtidas por “spray drying” carregadas com triancinolona. 106
5. CONCLUSÃO 134
V. ESTUDOS IN VIVO E FARMACOCINÉTICA OCULAR 136
1. USO DA TRIANCINOLONA E DO CIPROFLOXACINO EM OFTALMOLOGIA. 136
2. OBJETIVOS 137
3. MATERIAL E MÉTODOS 138
3.1. Reagentes e solventes 138
3.2. Equipamentos e Acessórios 138
3.3. Animais 139
3.4. Administração das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino e coleta de amostras 140
3.5. Eficácia das McCP frente à solução aquosa. 140
3.6. Eficácia das McCP frente ao colírio de ciprofloxacino 0,3%. 140
3.7. Administração das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona e coleta de amostras 141
3.8. Eficácia das McTr frente à suspensão aquosa. 141
3.9. Estudos farmacocinéticos 142
3.10. Análise estatística 143
4. RESULTADOS E DISCUSÃO 144
4.1. Estudos in vivo e farmacocinética ocular das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino 144
4.2. Estudos in vivo e farmacocinética ocular das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona 153
5. CONCLUSÃO 160
VI. CONCLUSÕES FINAIS DOS TRABALHOS DE PESQUISA 162
VII. REFENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 164

I. INTRODUÇÃO

Atualmente existem vários processos patogênicos e doenças oculares de relevância clínica e epidemiológica que não possuem ainda um tratamento farmacológico estabelecido. Esta dificuldade ocorre principalmente devido ao número reduzido de produtos farmacêuticos para uso em oftalmologia, e pela incapacidade dos medicamentos convencionais em vencer as barreiras oculares e fornecer níveis terapêuticos do fármaco administrado por período de tempo adequado.

No início da presente década, com o objetivo de preencher esta lacuna no tratamento das doenças oculares, pesquisadores de vários seguimentos como Universidades, Empresas, Hospitais e Institutos se reuniram e formaram o Grupo de Pesquisa em Tecnologia Farmacêutica e Farmacologia Ocular "Brazilian Research Group in Pharmaceutical Technology and Ocular Pharmacology" (BOPP), hoje cadastrado na plataforma Lattes como Grupo de Pesquisa em Medicamentos Oftálmicos, vinculado ao Departamento de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP.

Entre as atividades de pesquisa do referido grupo de pesquisa está a associação de conhecimentos farmacotécnicos e de farmacologia às necessidades clínicas mais relevantes na oftalmologia para geração de produtos farmacêuticos seguros, eficazes e viáveis para o tratamento de doenças e processo patogênicos, aproveitando dessa forma o potencial dos pesquisadores envolvidos.

Neste contexto, o Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, coordenador do Grupo de Pesquisa Sistemas Biomiméticos-Fármacos-Unesp, foi um dos responsáveis por disponibilizar os conhecimentos adquiridos em seu grupo de pesquisa e proporcionar esforços para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para o uso em oftalmologia.

Esta missão vem sendo desenvolvida e tem trazido resultados interessantes, fruto desta colaboração interdisciplinar. Além do conhecimento desenvolvido ao longo desta década para o desenvolvimento desta tecnologia, vários trabalhos foram desenvolvidos dentro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-Unesp e um bom fluxo de resultados tem sido conseguido em um intervalo de tempo cada vez menor.

Alguns destes trabalhos incluem:

- ✓ Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina para uso ocular (Dissertação de Mestrado, 2003).
- ✓ Obtenção e caracterização de pellets para liberação prolongada de triancinolona a partir de micropartículas de ácido polilático-co-glicólico (Dissertação de Mestrado de Elias José da Silva, 2004. 85p.).
- ✓ Complexos moleculares de indocianina com ciclodextrinas e encapsulação em lipossomas (Dissertação de Mestrado de Ângelo roncalli ª Silva, 2004. 112p).
- ✓ Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina veiculados em copolímero termosensível (dissertação de mestrado de Bruna Juliana Wanczinski, 2004. 106 p.).
- ✓ Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos (dissertação de mestrado de Arnóbio Antônio da Silva Júnior, 2005. 140p).
- ✓ Ciprofloxacino encapsulado em lipossomas revestidos com ácido poli láctico-co-glicólico ou veiculados em gel de copolímero de bloco 'pluronic® F-127' (Dissertação de Mestrado de Luana Cardoso de Oliveira, .2006. 102p).
- ✓ Micropartículas biodegradáveis obtidas por "spray drying" para liberação prolongada intra-ocular de cetorolaco de trometamina (dissertação de mestrado de Gustavo Rossanezi, 2008 [em andamento]).

Além dos trabalhos apresentados, existem vários outros estudos em fase de desenvolvimento envolvendo diferentes necessidades clínicas.

Entre as diferentes necessidades clínicas que não possuem ainda uma terapia estabelecida estão as doenças vitreoretinais como uveítes, edema de mácula diabético, neovascularização da coróide, degeneração de mácula relacionada à idade e outras doenças do seguimento posterior do olho. Todas estas doenças têm sido tratadas com o uso de antiinflamatórios esteroidais (AIEs), principalmente através do uso de injeções

oculares. No entanto, altas doses são necessárias e devido à rápida eliminação do fármaco dos líquidos intraoculares, repetidas injeções são realizadas em um intervalo de tempo relativamente curto, trazendo potenciais riscos ao paciente.

Entre os AIEs utilizados em oftalmologia, a triancinolona tem sido amplamente utilizada desde a década de 50 no tratamento de doenças vitreoretinais e no tratamento e prevenção da inflamação pós-cirúrgica. Neste contexto, foram iniciados os estudos para o desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada intraocular para triancinolona, os quais levaram ao desenvolvimento de implante do tipo “micropellet” biodegradável a base de ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) para liberação intraocular de triancinolona.

O sistema apresentou características tecnológicas interessantes e um perfil de liberação prolongada para a triancinolona. No entanto, a necessidade de procedimento cirúrgico para implantação e a incapacidade de flexibilização da dose administrada limitaram o avanço dos estudos. Pensando nestas limitações, o desenvolvimento de um sistema microparticulado capaz de liberar doses seguras e eficazes do fármaco por período de tempo prolongado, apresenta-se como o ideal, pois além da possibilidade de ser administrada por injeção intravitreal em suspensão aquosa, possibilita o controle da quantidade de fármaco administrada.

Um dos produtos desenvolvidos no presente trabalho foi as micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona (McTr) para administração intravitreal, como estratégia para proporcionar concentrações terapêuticas da triancinolona por período de tempo prolongado diminuindo assim a necessidade de procedimentos repetidos de administração do fármaco.

Outras necessidades clínicas de relevância epidemiológica contemplada no presente trabalho são o tratamento de endoftalmites e a antibiótico-profilaxia de pós-cirurgia de extração de catarata. Estudos recentes demonstram a incidência de 0,1% de endoftalmites pós-cirúrgicas, que apesar de ser um percentual baixo, torna-se epidemiologicamente importante devido ao alto número de cirurgias de extração de catarata realizadas no Brasil e em todo o mundo. Além disso, a Associação Brasileira de Oftalmologia e Academia Americana de oftalmologia recomendam a antibiótico-profilaxia pós-cirurgia.

Normalmente o tratamento e a profilaxia de endoftalmites são realizados utilizando o colírio como forma de administração do fármaco. No entanto, vários trabalhos demonstram a incapacidade desta via em proporcionar níveis de concentração seguros e eficazes por tempo prolongado, sendo solicitada muitas vezes a administração em curtos intervalos de tempo, o que diminui a qualidade de vida do paciente, provocando a não adesão ao tratamento estabelecido.

Quando a endoftalmite já está avançada, a alternativa mais utilizada é a injeção de antimicrobianos. Entre estes, os mais utilizados são as fluorquinolonas, muitas vezes até através da injeção intravitreal. No entanto, o fármaco é rapidamente eliminado do interior do globo ocular.

Pensando nesta importante lacuna, o desenvolvimento de um sistema microparticulado biodegradável capaz de fornecer, de forma segura e eficaz, níveis terapêuticos de ciprofloxacino por período de tempo prolongado para o tratamento ou profilaxia de endoftalmites (em torno de 7dias), fazendo com que o paciente possa sair da cirurgia sem a necessidade do uso de qualquer colírio representa um avanço significativo em oftalmologia.

Assim, o outro produto desenvolvido no presente trabalho foi as micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino (McCp) para administração sub-tenoniana, como estratégia para proporcionar concentrações terapêuticas do ciprofloxacino, por período de tempo suficiente para a profilaxia ou tratamento da endoftalmite.

É importante ressaltar que os estudos de pré-formulação das McCP e das McTr, como estudo das dos parâmetros de obtenção das micropartículas, determinação da eficiência de encapsulação e da melhor formulação, capacidade de liberação prolongada *in vitro* das diferentes formulações utilizadas foram realizados em trabalhos anteriores, fazendo parte dos estudos desenvolvidos durante minha dissertação de Mestrado em ciências Farmacêuticas (2003-2005).

Como principais contribuições para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos em oftalmologia, o presente trabalho apresenta dois produtos para uso em afecções oculares distintas e de grande relevância clínica e epidemiológica. Além disso, tenta demonstrar de forma sistemática, os estudos necessários a serem realizados durante o desenvolvimento das micropartículas

carregadas com fármacos e viabilização destes para os estudos clínicos. Os quais incluíram:

- ✓ Preparação e caracterização das micropartículas;
- ✓ Esterilização do sistema de liberação por radiação gama e caracterização do efeito da exposição das micropartículas à radiação gama em suas propriedades físico-químicas.
- ✓ Estudos *in vivo* utilizando o coelho albino sadio como modelo animal e determinação dos parâmetros farmacocinéticos.
- ✓ Os métodos de análise quantitativa utilizados para o controle de qualidade das micropartículas e nos estudos *in vivo* foram desenvolvidos e validados.

É esperado que os estudos realizados nesta tese forneçam suporte para os testes clínicos a serem realizados com as micropartículas de PLGA carregadas com o fármaco para as diferentes aplicações clínicas pretendidas e que sejam capazes de preencher estas lacunas dentro da tecnologia de medicamentos para uso em oftalmologia.

II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA

No desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é interessante observar a afirmação que, a magnitude da resposta terapêutica está relacionada com a concentração de fármaco que atinge o local de ação. Essa concentração depende da dose administrada, da quantidade absorvida, da distribuição no local e da velocidade e quantidade do fármaco eliminada pelo organismo. Para se aproximar com maior exatidão dos objetivos pretendidos é essencial observar três fatores:

- ✓ A fisiologia da célula, tecido, sistema ou organismo alvo.
- ✓ As propriedades físico-químicas e farmacológicas (farmacocinéticas e farmacodinâmicas) dos fármacos utilizados.
- ✓ Propriedades físico-químicas do sistema de administração escolhido.

1. BARREIRAS PARA A LIBERAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS

Anatomicamente, o olho está dividido em duas partes; segmento anterior e o segmento posterior. O primeiro inclui córnea, câmara anterior, íris, lente cristalino e corpo ciliar, enquanto o segmento posterior inclui o corpo vítreo, retina e a coróide (OGURA, 2001) (Figura 1).

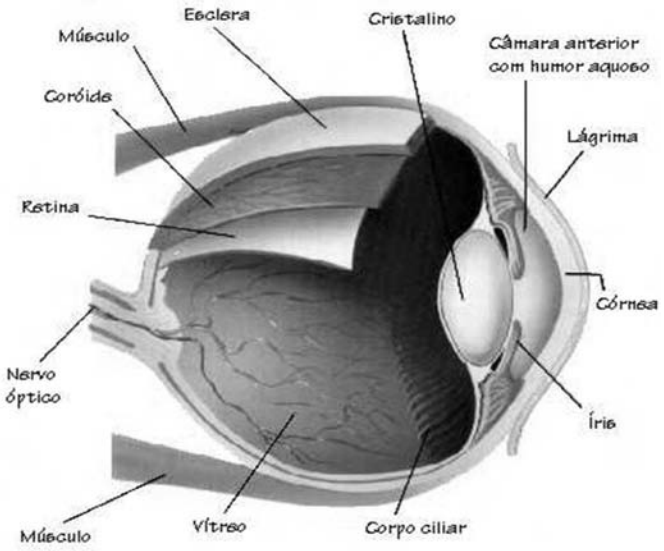

Figura 1. Representação esquemática da anatomia do olho humano.

O olho humano é um órgão sensorial especializado que está relativamente isolado por barreiras que dificultam bastante a biodisponibilidade dos fármacos administrados por via tópica. Devido à dinâmica do sistema lacrimal, o tempo de retenção de uma solução oftálmica na superfície do olho é curto e apenas uma fração da dose administrada é absorvida. Isso requer grande freqüência de administração, o que é inconveniente para o paciente, provocando a não cooperação e não uniformidade dos níveis terapêuticos do fármaco administrado (NADKARNI; YALKOWSKI, 1993).

Além do sistema lacrimal, a esclera e a córnea são barreiras epiteliais eficientes que revestem a superfície do globo ocular. A córnea apresenta-se como uma barreira constituída basicamente pela camada epitelial, e membrana Bowman, seguido logo após pelo estroma que constitui aproximadamente 90% da espessura da córnea e é uma camada hidrofílica organizada unicamente em lamelas de colágeno. Abaixo do estroma encontra-se a membrana de Descemet e posteriormente está localizado o endotélio que é uma monocamada de células que mantém principalmente a integridade corneal através de transporte ativo, servindo como uma barreira hidrofóbica (MORDI; LICHER, 2001) (Figura 2).

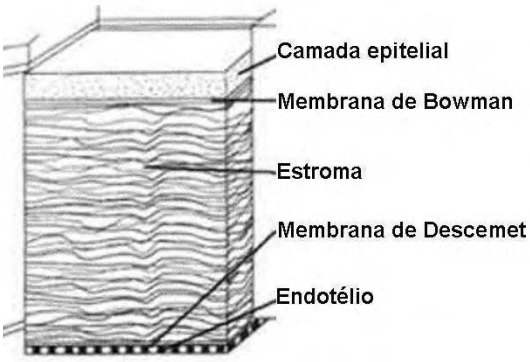

Figura 2. Representação esquemática das camadas histológicas que constituem a córnea.

A limitação da absorção de fármacos administrados devido a estas barreiras é tão eficiente que menos de 5% da dose administrada é absorvida. A maior porção da dose administrada por via tópica é absorvida sistemicamente através da conjuntiva por meio do estroma vascular conjuntival e através dos vasos marginais (LANG, 1995).

A penetração dos fármacos administrados sistemicamente também é limitada principalmente devida à barreira hematoretinal, que consiste num estreito complexo juncional de pigmentos epitélio retinais e do endotélio dos capilares retinais (MAURICE E MISHIMA, 1984; OGURA, 2001).

A Figura 3 apresenta de forma resumida, algumas das principais rotas de administração ocular de fármacos e rotas de eliminação do interior do globo ocular (AMO; URTTI, 2008).

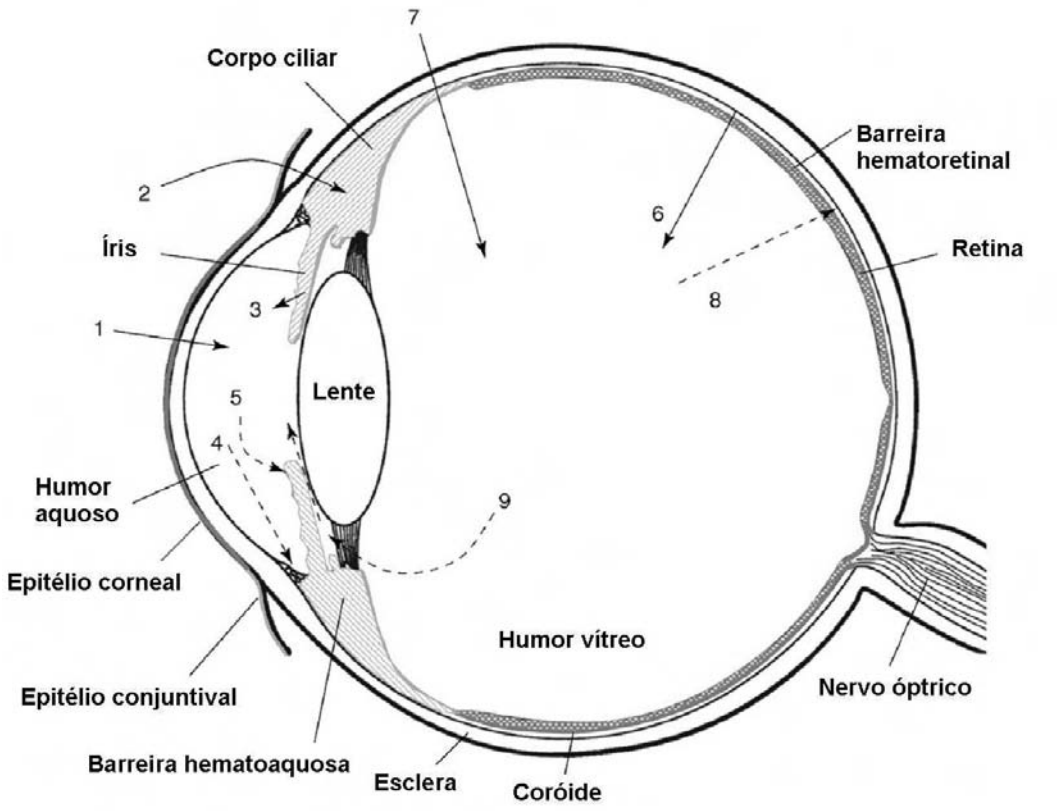

Figura 3. Representação esquemática das estruturas oculares e possíveis vias de acesso e eliminação para administração de fármacos [(1) permeação trans-corneal a partir do filme lacrimal; (2) permeação não corneal através da conjuntiva da esclera; distribuição do fármaco a partir do fluxo sangüíneo via barreira hematoaquosa; (4) eliminação do fármaco do humor aquoso através do retorno da malha trabecular e canal de Sclemm; (5) eliminação do fármaco do humor aquoso via circulação sistêmica úveo-escleral; (6) distribuição do fármaco a partir do sangue via barreira hematoretinal; (7) administração intravitreal; (8) Eliminação do fármaco do vítreo via barreira hematoretinal; (9) eliminação do fármaco via rota anterior] (AMO; URTTI, 2008).

Embora a administração sistêmica possa proporcionar que o fármaco atinja o segmento posterior do olho, a alta dose necessária irá ressaltar os efeitos colaterais e toxicidade potencial do fármaco (GEROSKI; EDELHAUSER, 2001; OGURA, 2001). Normalmente, tratamentos longos e com altas doses intravenosas são necessários para manutenção de concentrações terapêuticas do fármaco, podendo resultar em efeitos colaterais severos (HOLLAND et al., 1986; HENDERLY et al., 1987; JABS et al., 1987; OGURA, 2001).

As alternativas comumente utilizadas para alcançar concentrações terapêuticas do fármaco nos tecidos intra-oculares e principalmente no segmento posterior do olho incluem a injeção direta, normalmente por via intravitreal ou subconjuntival (PAGANELLI et al., 2004; COSTA et al., 2007; BONINI FILHO et al., 2007). No entanto, devido à rápida eliminação do fármaco do local de ação, procedimentos repetidos são necessários para manter a concentração terapêutica durante certo período de tempo (OGURA, 2001), trazendo riscos potenciais à saúde do paciente, incômodo e não-adesão ao tratamento estabelecido (OLMEZ et al., 2005; REICHLE et al., 2005).

Existem vários trabalhos demonstrando o sucesso experimental no tratamento de patogenias oculares através da utilização de fármacos já conhecidos na terapêutica, porém a dificuldade de proporcionar níveis terapêuticos destes quando administrados utilizando os medicamentos convencionais, dificulta o estabelecimento de produtos farmacêuticos seguros, eficazes e viáveis para o uso em oftalmologia.

2. FÁRMACOS UTILIZADOS

2.1. Triancinolona

Os Corticosteróides têm sido usados desde 1950 para suprimir inflamação intraocular, por reduzir a exudação inflamatória, inibir a proliferação de fibroblastos e formação de tecido granulo matoso (PEYMAN et al., 1974).

Entre os corticosteróides, a triancinolona tem sido utilizada em várias aplicações clínicas em oftalmologia como o tratamento de inflamações pós-cirúrgicas como a cirurgia de catarata e principalmente as doenças vitreoretinais como o edema de mácula diabético, degeneração de mácula relacionada à idade, neovascularização da coróide, uveítes entre outros (JAFFE et al., 2000; CHALLA, et al. 1998; YOUNG et al., 1998; SUCKLING; MASLIN, 1998; DANNIS et al., 2000; CONWAY et al., 2003; TRANOS et al., 2004; PAGANELLI et al., 2004; JONAS et al., 2005; JERMAK et al., 2007; EPERON et al., 2008; CUNNINGHAM et al., 2008).

A triancinolona (Figura 4) apresenta-se como um pó cristalino branco, praticamente insolúvel em água e pouco solúvel em metanol. Possui ponto de fusão entre 269 - 271℃ (BRITISH Pharmacopoeia, 2001). Po de ser utilizada como álcool livre ou esterificado geralmente na posição C17.

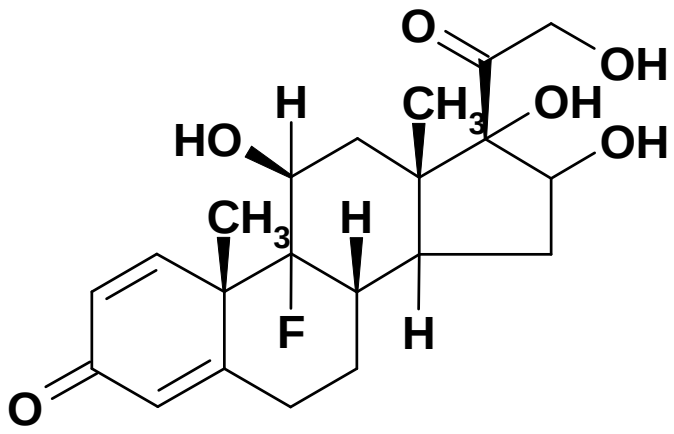

Figura 4. Representação esquemática da estrutura química do triancinolona.

Várias vias de administração ocular tem sido utilizadas para a triancinolona. Entre estas, a via tópica na forma de solução, via oral na forma de comprimidos, vias de administração parenteral como a intravenosa ou intramuscular e até mesmo o uso de injeções diretas como injeções subconjuntivais, parabulbar, retrobulbar e intravitreal (JONAS et al., 2001).

Há tempos, a administração via intravitreal de triancinolona tem sido realizada na prevenção e tratamento de doenças do segmento posterior do olho que persistem por muito tempo, como edema de mácula (RICHARD et al., 2001; MARTIDIS et al., 2002; CARDILLO et al., 2005) vitreoretinopatia proliferativa (TANO et a., 1980; JONAS et al., 2000), neovascularização retinal (ANTOSZYK et al., 1993; DANIS et al., 1996), neovascularização da coróide (CHALLA et al., 1998; DANNIS et al., 2000) e uveítes (YOUNG et al., 1998). No entanto, a rápida eliminação do fármaco do interior do globo ocular exige o uso de altas doses e de forma repetida, trazendo potenciais riscos como o aumento da pressão intraocular, endoftalmites, entre outros.

Uma das propostas do presente trabalho é desenvolver um sistema de liberação prolongada para a triancinolona que possa ser utilizado via intravitreal de forma segura e eficaz no tratamento das diversas patogenias as quais se aplica. O desenvolvimento deste sistema aplicado ao tratamento das doenças vitreoretinais apresenta-se como uma alternativa simples e viável de melhorar a eficácia do tratamento estabelecido e diminuir o número de injeções, trazendo assim além da maior eficácia, também uma maior segurança e qualidade de vida para o paciente tratado.

2.2. Ciprofloxacino

A endoftalmite consiste em uma infecção ocular que pode rapidamente levar o paciente a perda da visão se não diagnosticada e tratada adequadamente em tempo hábil. Existem basicamente dois tipos de endoftalmites, a primária que pode ser causadas por bactérias na comunidade, ou a exógena que ocorre principalmente após a realização de procedimentos cirúrgicos, normalmente causados por Streptococcus ou por Staphylococus (SCHIMER et al., 2007).

As causas mais freqüentes de endoftalmites exógenas estão relacionadas com os procedimentos de vitrectomia, implantação de lentes intraoculares e principalmente as cirurgias de extração de catarata (EIFRIG et al., 2002).

Trabalhos recentes (SCHIMER et al., 2007) apresentam dados epidemiológicos que demonstram que a incidência de endoftalmite pós-operativa em cirurgias de extração de catarata pode chegar a 0,1%. A morbidade desta patogenia e o grande número destes procedimentos cirúrgicos realizados no mundo traduzem a relevância deste processo, fazendo com que a Associação Brasileira de Oftalmologia e a Academia Americana de Oftalmologia recomendem a antibiótico-profilaxia em cirurgias oculares. Entre os fármacos mais utilizados para a profilaxia e tratamento das endoftalmites estão as fluoroquinolonas.

O ciprofloxacino (Figura 5) é um antimicrobiano derivado do ácido fluorquinolônico, bastante utilizado na profilaxia e tratamento de infecções oculares devido à sua comprovada baixa toxicidade, alta potência e amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Suas aplicações clínicas incluem o tratamento de endoftalmites, outras doenças infecciosas do segmento posterior do olho e no pós-operatório (OZTURK et al, 2000; YALVAC et al, 2003).

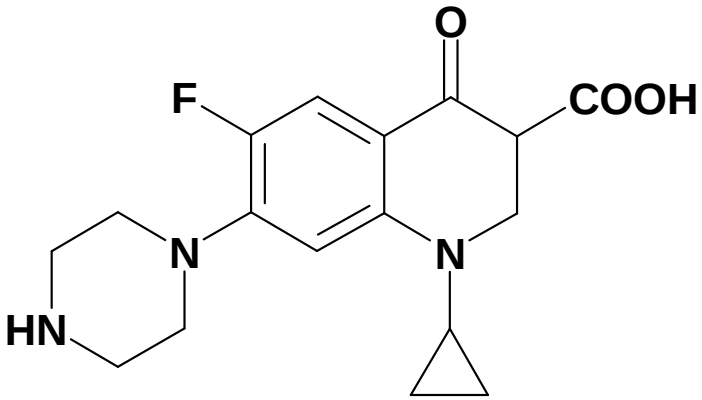

Figura 5. Representação esquemática da estrutura química do ciprofloxacino.

Assim como o ciprofloxacino, as fluoroquinolonas são administradas principalmente na forma de colírio. No entanto, vários trabalhos questionam a eficiência

na permeação do fármaco por esta via e a capacidade em proporcionar níveis de concentração terapêuticos por períodos de tempo adequado (OZTURK et al., 2000; FIRESTONE et al., YALVAC et al., 2003; BUCCI, JR., 2004; ROBERTSON et al., 2005).

Trabalhos anteriores demonstraram a dificuldade de atingir e manter a concentração inibitória mínima (MIC_{90}) do ciprofloxacino, utilizando as diferentes vias de administração disponíveis, para a maioria dos agentes causadores da endoftalmite (YALVAC et al, 2003).

As injeções intravitreais e subconjuntivais tem sido uma via de administração bastante utilizada para o tratamento de endoftalmites, normalmente associada à terapia tópica (OZTURK et al, 2000). No entanto, Bauman e Martel, (1988) estudaram a biodisponibilidade intraocular do ciprofloxacino após administração de doses terapêuticas pela via endovenosa e subconjuntival na região epibulbar e abaixo da conjuntiva do fórnix inferior de coelhos sadios. Em todas as vias utilizadas, concentrações do fármaco não foram detectadas decorridas 24 horas após a administração.

A outra proposta do presente trabalho aplica-se no desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada para o ciprofloxacino, que possa ser utilizado via subtenoniana de forma segura e eficaz no tratamento e profilaxia de endoftalmites. No caso da cirurgia de extração de catarata, o sistema apresenta-se como alternativa para administração no momento da cirurgia, excluído a necessidade do uso de qualquer colírio de antibiótico após este procedimento, aumentando assim ainda mais a segurança da antibiótico-profilaxia e a qualidade de vida do paciente.

3. MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM OFTALMOLGIA

3.1. Sistemas de liberação de fármacos para uso em oftalmologia

Numerosos sistemas de liberação têm sido desenvolvidos com o objetivo de prolongar a liberação de fármacos utilizados em oftalmologia. Dentre os novos dispositivos estão:

- ✓ **Lipossomas** (AKULA et al., 1994; WANCZINSKI, 2005; OLIVEIRA, 2006; BUDAI et al., 2007).
- ✓ **Hidrogéis e Géis termossensíveis** (CAO et al., 2007; QI et al., 2007; BUDAI et al., 2007; NANJAWADE et al., 2007; MA et al., 2008).
- ✓ **Emulsões e Microemulsões** (VANDAMME et al., 2002; DELANEZ et al., 2007)
- ✓ **Micelas e Micelas poliméricas** (GUPTA et al., 2000)
- ✓ **Sistemas de Liberação transescléricos** (HASHIZOE et al., 1994; BAEYENSA et al., 1998; YASUKAWA et al 2000; FELT-BAEYENS et al., 2006);
- ✓ **Implantes poliméricos biodegradáveis** (KIMURA et al., 1994, JAFFE et al., 2000; TAN et al., 2001; OKABE et. al, 2003; SILVA, 2004; CARDILLO et al., 2004, YASUKAWA et al., 2005; BOURGES et al., 2006).
- ✓ **Nanopartículas** (CALVO et al., 1997; CAMPOS et al., 2001; BARBAULT-FOUCHERA et al., 2002; PIGNATELLO et al., 2002; KOMPELLA et al., 2003; KASSEM et al., 2007; MOTWANI et al., 2008).
- ✓ **Micropartículas** (MORITERA et al., 1991; 1992; VELOSO et al., 1997, KOMPELLA et al., 2003; SAINSHIN et al., 2003; SILVA-JUNIOR, 2005; AYALASOMAYAJULA; KOMPELLA, 2005),

Os diferentes sistemas de liberação prolongada para administração ocular de fármacos apresentam características específicas para uma diversidade de doenças oculares. A escolha do sistema a ser administrado está relacionada diretamente com o tipo de processo patogênico a ser tratado. Características como o tempo e dificuldade do tratamento são fundamentais no desenho de um sistema que seja capaz de proporcionar níveis terapêuticos do fármaco por tempo adequado.

Entre estes dispositivos, as micropartículas biodegradáveis têm sido bastante investigadas objetivando a liberação de fármacos por tempo prolongado no interior do globo ocular, principalmente através da administração via intravitreal e subconjuntival no tratamento de doenças do segmento anterior e posterior do olho (GIUNCHEDI et al., 1999; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; SAISHIN et al., 2003; KOMPELLA et al., 2003; SILVA-JUNIOR, 2005; AYALASOMAYAJULA; KOMPELLA, 2005; HACHICHA et al., 2007).

As Micropartículas são partículas sólidas, geralmente esféricas, com dimensões da ordem de 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 a uma rede polimérica tridimensional ou por sistemas reservatórios (microcápsulas) nos quais o fármaco encontra-se encapsulado na forma sólida, líquida ou gasosa, separada do meio externo por uma membrana polimérica (FINCH, 1990; OLIVEIRA et al. 1992; ANDREO-FILHO; OLIVEIRA, 1999, SILVA-JÚNIOR, 2005) (Figura 6).

Neste contexto, as micropartículas biodegradáveis apresentam várias características interessantes como sistemas de liberação de fármacos:

- ✓ Possibilidade de reunir diferentes formulações na mesma dose e assim modular a resposta do sistema.
- ✓ Por serem administradas em suspensão, flexibilidade de dosagem em função da intensidade do processo patogênico.
- ✓ Dispensa qualquer procedimento cirúrgico para sua aplicação.
- ✓ Dispositivo biodegradável e biocompatível.
- ✓ Possibilidade de produção de forma precisa em grande escala.
- ✓ Possibilidade de esterilização com segurança.

- ✓ Possibilidade de aplicação em diferentes tecidos.
- ✓ Possibilidade de associação com outros sistemas.

Figura 6. Representação esquemática do tipo de estruturação das micropartículas (SILVA, 2004).

Durante o planejamento dos estudos de pré-formulação dos sistemas microparticulados a serem desenvolvidos, é de fundamental importância a escolha de um método de microencapsulação que proporcione o aproveitamento de todas as qualidades deste sistema, principalmente a viabilidade da produção industrial.

Ao longo destes anos, diferentes técnicas têm sido propostas para a produção de micropartículas. Entre elas, a técnica de secagem por atomização “spray drying” tem se destacado, devido às diversas vantagens apresentadas frente aos outros métodos, como rapidez, processo de única etapa, flexibilidade de uso em grande escala, condições brandas envolvidas durante o processo e pouco influenciável pelos parâmetros de solubilidade do fármaco e do polímero (MASTERS, 1985; JALIL; NIXON, 1990; TAKADA et al., 1995; GIUNCHEDI et al., 1998; FU et al., 2002; SILVA-JUNIOR, 2005; RÉ, BISCAN, 1999; RAFFIN et al., 2006; ALVES, SANTANA, 2004).

3.2. Secagem por atomização "spray drying"

A utilização da técnica de secagem por atomização na preparação de micropartículas poliméricas consiste basicamente em dispersar o polímero e o fármaco em um solvente ou sistema solvente adequado, e atomizar via aspersor para originar microgotas que ao entrarem em contato com o ar em temperatura próxima ou superior ao ponto de ebulição do solvente, proporciona a evaporação do mesmo de forma rápida e dinâmica, formando as micropartículas (MASTERS, 1985; FU et al., 2002, SILVA-JÚNIOR, 2005) (Figura 7).

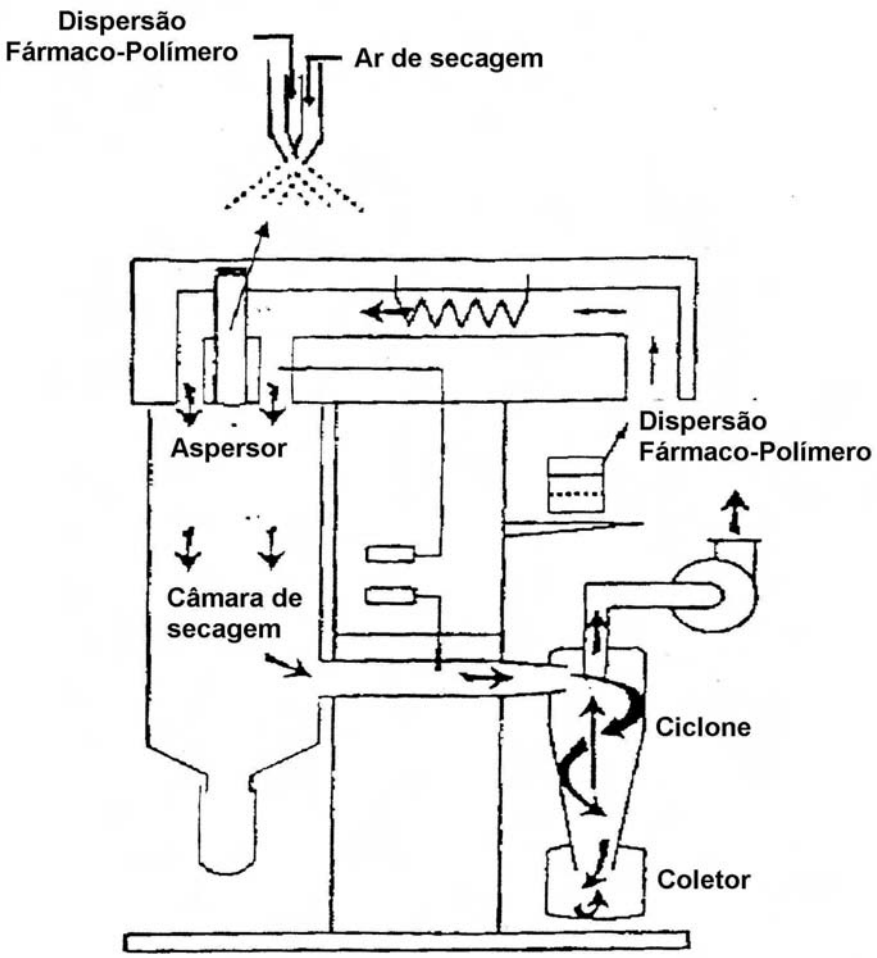

Figura 7. Representação esquemática do funcionamento de um aparelho de "spray dryer" de laboratório FU et al., 2002).

De acordo com os parâmetros selecionados, a secagem por atomização pode proporcionar a produção de micropartículas de forma esférica, com distribuição de tamanho de partículas uniforme e com alta eficiência de encapsulação. Estas características são extremamente importantes para a velocidade e uniformidade da liberação do fármaco que o sistema pode fornecer e facilitar sua administração evitando o entupimento da agulha no momento da administração, tornando-se muito interessante para o presente trabalho, principalmente devido à flexibilidade de uso em alta escala acompanhada de viabilidade da produção em escala industrial mantendo a propriedades interessantes das micropartículas como sistemas de liberação para uso ocular.

As características fundamentais das micropartículas para aplicação ocular incluem a capacidade de biodegradação, bioadesão, biocompatibilidade e baixa toxicidade (ANDERSON; SHIVE, 1997). A escolha de um polímero ou sistema polimérico que atenda a estas necessidades é essencial para o sucesso do sistema.

A seleção de polímeros para administração parenteral requer a observação de uma série de características específicas como biocompatibilidade, compatibilidade com o fármaco, velocidade de biodegradação adequada, propriedades mecânicas e processamento (WU, 1995; ANDERSON e SHIVE, 1997).

Além disso, o tipo de polímero utilizado determina o mecanismo de liberação do fármaco envolvido. Em matrizes biodegradáveis, a velocidade de erosão é um fator importante na exposição do fármaco ao meio de dissolução. Canais porosos podem estar presentes na rede polimérica permitindo a penetração do solvente com eventual dissolução e difusão do fármaco para o meio de liberação (OLIVEIRA et al, 1992; ANDREO FILHO e OLIVEIRA, 1999; VIVEK e KHOSLA, 1998).

Entre os polímeros biodegradáveis mais investigados para uso ocular está o ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) (ANDERSON; SHIVE, 1997; COLTHURST et al., 2000; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; OGURA, 2001).

3.3. Ácido poli lático-co-glicólico (PLGA)

O PLGA é um copolímero sintético biodegradável do grupo dos poliésteres alifáticos, que pode ser obtido pela co-polimerização do ácido lático e do ácido glicólico (UHRICH et al., 1999) (Figura 8).

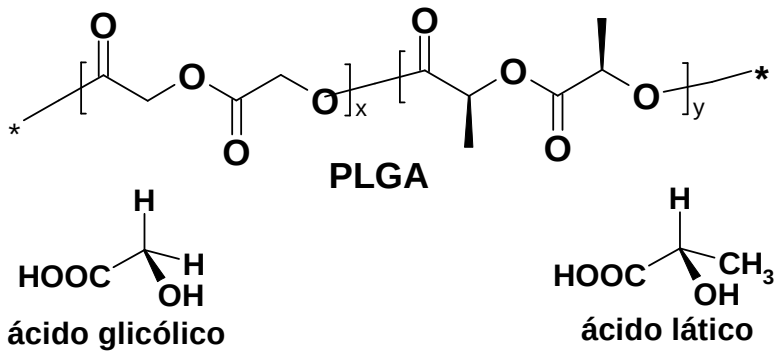

Figura 8. Representação esquemática da estrutura química do ácido glicólico, ácido lático e do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA).

No organismo, o PLGA se hidrolisa em ácido glicólico e ácido lático que é eliminado via ciclo do ácido cítrico em gás carbônico e água (JAIN et al., 1998; UHRICH et al., 1999; KUNOU et al., 2000). Devido às características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, o PLGA tem sido bastante utilizado para produção de sistemas de liberação prolongada de fármacos (ANDERSON; SHIVE, 1997; JAIN et al., 1998; KUNOU et al., 2000, HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; OGURA, 2001, SILVA-JUNIOR, 2005; HACHICHA et al., 2006; 2007; BIOND et al., 2008).

Vários sistemas de liberação controlada têm sido preparados usando polímeros biodegradáveis como veículo para liberação de vários tipos de fármacos, incluindo antibióticos (WEBBER et al., 1998; SILVA-JUNIOR, 2005; HACHICHA et al., 2006; 2007), agentes antineoplásicos (ELKHARRAZ et al., 2006; ZHANG; GAO, 2007) antinflamtórios esteroidais (ZHOU et al., 1998; McCARRON et al., 2000; SILVA-JUNIOR, 2005; BECK et al., 2007), peptídeos (ROTHEN-WEINHOLD et al., 1999; ALMEIDA; SOUTO, 2007) e proteínas (SINGH et al., 2001; XIE et al., 2008) entre outros.

Há décadas, 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.,1991,1992; AKULA et al.,1994; ; VELOSO et al., 1997; DING, 1998; YASUKAWA et al 2000; OGURA, 2001; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; KOMPELLA et al., 2003; AYALASOMAYAJULA; KOMPELLA, 2005; HACHICHA et al., 2006; 2007).

Entre as propriedades essenciais das micropartículas biodegradáveis para administração ocular de fármacos, a esterilidade é considerada extremamente importante para garantir a segurança de sua aplicação.

Entre os processos de esterilização disponíveis, a esterilização terminal é preferível, pois garante a esterilidade do produto após o processo de produção (HERRERO-VANRREL; REFOJO, 2001).

No início do planejamento das etapas de desenvolvimento do sistema de liberação de fármacos para uso em oftalmologia o procedimento de esterilização já deve ser escolhido, e os ensaios a serem utilizados devem ser estabelecidos para determinar a segurança do mesmo e para que não venha a comprometer a estabilidade dos componentes envolvidos ou as propriedades físico-químicas que comprometam o funcionamento do mesmo.

3.4. Esterilização de sistemas de liberação de fármacos para uso em oftalmologia

Entre as técnicas de esterilização disponíveis, a mais utilizada em oftlamologia é a filtração esterilizante, muito utilizada para lipossomas, microemulsões e outros sistemas coloidais. No entanto nem todos os produtos permitem a sua utilização.

A radiação gama é um processo bastante utilizado na esterilização de produtos farmacêuticos. Sistemas de liberação microparticulados para administração ocular fármacos podem ser esterilizados após o processo de produção com a utilização da radiação gama. No entanto, a eficiência e segurança devem ser determinadas experimentalmente (MONTANARI et al., 1998). A manutenção das propriedades físico-químicas das micropartículas biodegradáveis carregadas com o fármaco após qualquer

processo tecnológico industrial é de fundamental importância para a atividade terapêutica do sistema de liberação (SILVA-JÚNIOR et al., 2008a;2008b).

Estudos anteriores relatam que o processo de exposição das micropartículas biodegradáveis de PLGA à radiação gama, pode alterar o tamanho, a forma das partículas e a velocidade de degradação e liberação do fármaco de acordo com a carga utilizada no processo de esterilização (MONTANARI et al., 1998; HERRERO-VANRELL et al., 2000; CALIS et al., 2002; MONTANARI et al., 2003). A Farmacopéia Americana determina a dose de 25 kGy para esterilização de produtos farmacêuticos (USP, 2005).

Montanari e colaboradores (1998) estudaram o efeito da radiação gama utilizando cargas de radiação de 5, 15 e 25 kGy e foi verificada a perda de 25% da massa molecular do PLGA nas micropartículas decorridos 6 meses após a esterilização usando a carga de 25 kGy. No entanto, não foi verificada alteração significativa no perfil de liberação do fármaco a partir das microesferas para todas as cargas de radiação estudadas (MONTANARI et al., 1998; CALIS et al., 2002). Outros trabalhos também relatam a ausência do efeito da radiação gama (25kGy) no perfil de liberação de fármacos a partir de micropartículas de PLGA (SHAH et al., 1998; TSONG et al., 1996; HERRERO-VANRELL et al., 2000).

O Quadro 1 apresenta alguns estudos disponíveis na literatura sobre o efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas.

Quadro 1. Estudos sobre o efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas.

Estudo	Autores
Título: "gama- Irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine". **Técnica de preparo das micropartículas:** Emulsificação com evaporação de solvente **Efeito:** Não alterou as propriedades nem comprometeu o funcionamento do sistema	IGUARTUA et al., 2008
Título: "Effects of gamma-irradiation on trehalose-hydroxyethylcellulose microspheres loaded with vancomycin" **Técnica de preparo das micropartículas:** Emulsificação com evaporação de solvente **Efeito:** Não alterou as propriedades nem comprometeu o funcionamento do sistema	BARTOLOTTA et al., 2005
Título: "Gamma irradiation effects and EPR investigation on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine" **Técnica de preparo das micropartículas:** Secagem por atomização em "spray dryer" **Efeito:** Alterou as propriedades físicas, o teor de fármaco e a velocidade de liberação do fármaco.	MONTANARI et al., 2002
Título: "Gamma irradiation effects on poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres" **Técnica de preparo das micropartículas:** Secagem por atomização em "spray dryer" **Efeito:** Alterou as propriedades físicas e a estabilidade do material em função da dose de radiação usada.	MONTANARI et al., 1998
Título: "Gamma irradiation for terminal sterilization of 17b-estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles" **Técnica de preparo das micropartículas:** Secagem por atomização em "spray dryer" **Efeito:** Apresentou alguma ação radiolítica, mas não alterou a	MOHR et al., 1999

resposta *in vivo*.	
Título: "Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine: comparison between gamma and beta irradiation effects" **Técnica de preparo das micropartículas:** Secagem por atomização em "spray dryer" **Efeito:** Alterou a velocidade de liberação *in vitro.*	MONTANARI et al., 2003
Título: "An EPR and ENDOR study of γ- and β-radiation sterilization in PLGA polymers and microspheres" **Técnica de preparo das micropartículas:** Secagem por atomização em "spray dryer" **Efeito:** Alteração dependente da proporção dos monômeros e do tipo e carga de radiação utilizada.	BUSHELL et al., 2005
Título: "Radiation-induced free radical reactions in polymer/drug systems for controlled release: an EPR investigation" **Técnica de preparo das micropartículas:** Secagem por atomização em "spray dryer" **Efeito:** Presença de interação Fármaco-polímero	FAUCITANO et al., 2003

É interessante ressaltar que em trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório foram obtidas micropartículas de PLGA carregadas com cloridrato de ciprofloxacino em proporções de fármaco:polímero 1:1; 1:2; 1:3 e 1:5 massa/massa (m/m) e micropartículas de PLGA contendo triancinolona nas mesmas proporções (m/m), utilizando a técnica de secagem por atomização (SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JÚNIOR et al., 2008a; 2008b). Durante estes estudos foram realizados os ensaios pré-formulação necessários, a fim de investigar a eficiência do processo de microencapsulação, melhor formulação para os fármacos, e potência dos sistemas obtidos em fornecer, de forma eficaz e segura, um perfil de liberação prolongada para os fármacos escolhidos.

As micropartículas produzidas apresentaram forma esférica, distribuição do tamanho de partículas uniforme, e altos níveis de eficiência de encapsulação. As condições experimentais estabelecidas não afetaram a estabilidade físico-química dos componentes químicos da formulação (SILVA-JUNIOR et al., 2008a; SILVA-JUNIOR et al., 2008b), característica essencial para garantir a atividade terapêutica, além disso, apresentarem um perfil de liberação prolongada dos fármacos encapsulados quando comparados ao perfil de dissolução do fármaco livre (SILVA-JÚNIOR, 2005).

O presente trabalho apresenta resultados experimentais de estudos realizados com o objetivo de produzir dois sistemas microparticulados biodegradáveis à base de PLGA capazes de proporcionar níveis terapêuticos para o ciprofloxacino e para a triancinolona quando administrados por via sub-tenoniana e intravitreal respectivamente.

III. MÉTODOS DE ANÁLISE QUANTITATIVA

1. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE QUANTITATIVA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

No desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos nem sempre é fácil estabelecer quais os pontos críticos a serem controlados na etapa de pré-formulação. A utilização de metodologias analíticas e bioanalíticas capazes de conduzir a resultados precisos e exatos é de fundamental importância para garantir o sucesso terapêutico e a aplicação destes (SILVA-JÚNIOR, 2005).

A validação dos métodos de análise quantitativa constitui uma etapa essencial na pesquisa, desenvolvimento e produção de fármacos e medicamentos (BPFs), esta envolve uma série de estudos experimentais e determinação de alguns importantes parâmetros de análise (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; ANVISA, 2003b USP 28, 2005).

Entre os parâmetros analíticos a serem determinados em um processo de validação estão:

- ✓ Especificidade
- ✓ Seletividade
- ✓ Linearidade
- ✓ Alcance
- ✓ Precisão
- ✓ Exatidão
- ✓ Limite de detecção (LOD)
- ✓ Limite de quantificação (LOQ)
- ✓ Robustez

1.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade de um método analítico quantificar exatamente o fármaco em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP 28, 2001).

1.2. Linearidade e Alcance

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra dentro de um intervalo especificado (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP 28, 2001).

O alcance consiste no intervalo entre os limites de quantificação superior e inferior do método de análise que apresenta precisão, exatidão e linearidade (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP 28, 2001)

1.3. Precisão

A precisão consiste na avaliação da variação dos resultados obtidos em uma série de análises quantitativas (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP 28, 2001). Este parâmetro pode ser expresso como repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade pode ser determinada testando um número suficiente de alíquotas de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de análise em um tempo reduzido e é normalmente expressa pelo desvio padrão relativo (coeficiente de variação). O valor máximo aceitável para o coeficiente de variação (CV) depende do tipo de análise, o qual para amostras simples é de 1%, para amostras biológicas pode ser maior do que 15% e para para amostras ambientais pode variar entre 2 e 20% (SALGADO, 2006).

A precisão intermediária refere-se a qualquer variação inserida dentro do procedimento de análise quantitativa, diferentes analistas, dias, reagentes,

equipamentos entre outros. Enquanto a reprodutibilidade pode ser determinada pela análise de amostras homogêneas em diferentes laboratórios (SALGADO, 2006).

1.4. Exatidão

A exatidão de um método de análise quantitativa pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP, 2005). Os Compêndios oficiais e a legislação vigente prevêem que o ensaio de determinação da exatidão pode ser realizado para análise quantitativa de fármacos, formas farmacêuticas e para impurezas (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP, 2005).

Para análise quantitativa do fármaco em medicamentos, a exatidão pode ser determinada pelo método da recuperação, a qual consiste em verificar o percentual analiticamente recuperado de uma quantidade de padrão adicionado em uma amostra. Existe basicamente duas formas de se realizar este ensaio, o primeiro consiste em analisar uma amostra a qual foi adicionado quantidade conhecida de fármaco (padrão de referência) à forma farmacêutica e o segundo consiste em adicionar quantidade conhecida de fármaco (padrão de referência) a uma mistura dos excipientes da forma farmacêutica (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP, 2005).

A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de fármaco adicionado à amostra, ou como a diferença entre as médias e o valor verdadeiro aceito acrescido dos intervalos de confiança. Deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta em triplicata cada e pode ser expressa pela Equação 1(ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP 28, 2001).

$$\text{Exatidão} = \left[\frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \right] \text{x}\, 100 \qquad \text{Equação 1.}$$

1.5. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, no método de análise empregado sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto o limite de quantificação (LOQ) representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas.

Podem ser visualmente determinados, em que é observada concentração de analito que proporciona a relação sinal:ruído de 3:1 para o LOD e de 10:1 para o LOQ respectivamente. Também podem ser matematicamente calculados pelo método que se baseia no desvio padrão médio (DPm) da resposta de diferentes concentrações próximas ao suposto limite de detecção e na inclinação (S) da curva padrão, conforme as Equações 2 e 3 (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP, 2005).

$$LD = \left[\frac{3xDPm}{S} \right] \qquad \text{Equação 2.}$$

$$LQ = \left[\frac{10xDPm}{S} \right] \qquad \text{Equação 3.}$$

1.6. Robustez

A robustez determina a resistência do método de análise quantitativa e consiste em verificar o efeito da variação de parâmetros operacionais, como a temperatura, pH, fluxo da fase móvel entre outros (ICH, 1996; BP, 2001; ANVISA, 2003a; USP, 2005).

1.7. Estudos Realizados

No presente trabalho, foram desenvolvidas as metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise quantitativa do teor de ciprofloxacino e de triancinolona incorporados nas micropartículas de PLGA, assim como para a determinação do nível de concentração de fármaco proporcionado nos líquidos intraoculares após a administração dos referidos sistemas de liberação nos estudos *in vivo* realizados em coelhos.

Para validação das metodologias CLAE utilizadas foram determinados os parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade e alcance, precisão, exatidão e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Todos os ensaios foram planejados de acordo com os critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (ANVISA, 2003a).

2. OBJETIVOS

- ✓ Desenvolver e validar um método de análise quantitativa por CLAE para o ciprofloxacino a ser empregado:
    - ➢ No controle de qualidade das micropartículas de PLGA contendo ciprofloxacino.
    - ➢ Nos estudos farmacocinéticos de monitorização da concentração de fármaco atingida no humor aquoso e no humor vítreo após a administração subconjuntival das mesmas e dos respectivos tratamentos controle utilizados.

- ✓ Desenvolver e validar um método de análise quantitativa por CLAE para o a triancinolona a ser empregado:
    - ➢ No controle de qualidade das micropartículas de PLGA contendo triancinolona.
    - ➢ Nos estudos farmacocinéticos de monitorização da concentração de fármaco atingida no humor vítreo após a administração intravitreal das mesmas e dos respectivos tratamentos controle utilizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

- Ciprofloxacino comprado da Galena (Brasil).
- Triancinolona comprado da Galena (Brasil).
- D, L-PLGA 50:50 (viscosidade intrínseca de 0,63dL/g) Birmingham polymers Inc. (USA).
- Acetonitrila grau HPLC, J.T Baker (México).
- Acetona LABSYNT. (Brasil).
- Ácido acético glacial LABSYNT (Brasil).
- Água preparada com sistema purificador de água (Millipore) com resistividade de 18.2 MΩ-cm.
- Outros reagentes de grau analítico.

3.2. Equipamentos e Acessórios

- Balança analítica, METTLER®, modelo H 51.
- Lavadora ultra-sônica TRANSTEK SYSTEMS®, modelo soniclean.
- HPLC Waters® modelo alliance 2695.
- Detector UV com arranjo de diodos Waters®, modelo 2996.
- Detector UV Waters® modelo 2487.
- Coluna analítica SYMETRY® C18 150 x 4,0 mm e 5 μm de tamanho de partículas
- Pré-colunas SYMETRY® C18 10 x 4,0 mm e 5 μm de tamanho de partículas.
- Medidor de pH QUIMIS®
- Filtro de teflon 0,45 μm MILLEX®.
- Filtro de acetato de celulose 0,45 μm MILLEX®
- Purificador de água (Milli-Q Plus - Millipore®)
- Vidraria e outros acessórios.

3.3. Instrumentação e condições cromatográficas do método CLAE para o ciprofloxacino.

O sistema CLAE utilizado consistiu em equipamento Waters®, modelo alliance 2695 com sistema de injeção automática, equipado com detector UV com arranjo de diodos Waters® modelo 2996. A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura volumétrica de (a) acetonitrila e (b) ácido fosfórico (2,4g.L^{-1} pH = 3,0, equilibrado com trietanolamina) na proporção de 13:87 (a:b), com fluxo isocrático de 1,5mL.min^{-1}. A coluna analítica usada foi C_{18}(150mm x 4,0mm) com diâmetro de partícula de 5 µm protegida com pré-coluna, SYMETRY Waters®. Durante os ensaios foi utilizado o volume de injeção de 50µL no sistema equilibrado à temperatura de 30 $\pm$ 2ºC e o comprimento de onda selecionado para integração dos picos cromatográficos foi de 278nm.

3.4. Curvas analíticas padrão do ciprofloxacino

Para análise quantitativa do CP nas micropartículas de PLGA a curva padrão foi construída em ácido acético 0,1M. Para isso, a solução estoque de fármaco foi preparada em ácido acético glacial na concentração de 500µg.mL^{-1} e diferentes soluções-padrão, com concentração na faixa de 1 a 50µg.mL^{-1} foram preparadas por diluição da solução estoque em balões volumétricos de 10 mL com ácido acético 0,1 M. As soluções-padrão foram injetadas no sistema CLAE equilibrado em triplicata. A equação de regressão linear foi obtida através da regressão linear entre a média da área determinada (µV.s^{-1}) para os pontos da curva e a concentração de fármaco em µg.mL^{-1}.

Para análise quantitativa da concentração de CP atingida nos líquidos intraoculares, a curva padrão foi construída diretamente na matriz biológica obtida pela diluição (1:5V/V) de humor vítreo obtido de coelhos albinos sadios com solução tampão Tris-HCl (0,01M; pH=7,4). Para isso, uma solução estoque de CP foi preparada em solução tampão Tris-HCl (0,01M; pH 7,4) na concentração de 20µg.mL^{-1}. Diferentes alíquotas desta solução foram adicionadas em matriz biológica e agitadas em vortex por

1 minuto para obter diferentes soluções com concentração na faixa de 0,1 a 15,0 $\mu g.mL^{-1}$. Após ultra centrifugação a 15000xg durante 15minutos, o sobrenadante foi injetado no sistema CLAE equilibrado. As análises foram realizadas em triplicata e a equação de regressão linear foi obtida através da regressão linear entre área média determinada ($\mu V.s^{-1}$) para os pontos da curva e a concentração do fármaco em $\mu g.mL^{-1}$.

3.5. Instrumentação e condições cromatográficas do método CLAE para a triancinolona.

O sistema CLAE utilizado consistiu em equipamento Waters®, modelo alliance 2695 com sistema de injeção automática, equipado com detector UV Waters® modelo 2485. A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura volumétrica de (a) acetonitrila e (b) água na proporção de 30:70 (a:b), com o fluxo isocrático de $1mL.min^{-1}$. A coluna analítica usada foi C_{18} (150mm x 4,0mm) com diâmetro de partícula de 5µm protegida com pré-coluna, SYMETRY Waters®. Durante os ensaios foi injetado o volume de amostra de 100µL no sistema CLAE equilibrado à temperatura de 25 $\pm$ 2ºC e o comprimento de onda selecionado foi 242nm.

3.6. Curvas analíticas padrão da triancinolona

Para análise quantitativa da Tr nas micropartículas, a curva padrão foi construída em fase móvel. Para isso, uma solução estoque de fármaco foi preparada em acetonitrila na concentração de 250 $\mu g.mL^{-1}$. Diferentes soluções padrão com concentração na faixa de 1 a 50 $\mu g.mL^{-1}$ foram preparadas por diluição da solução estoque com fase móvel em balões de 10 mL. As soluções padrão foram injetadas no sistema CLAE equilibrado em triplicata. A equação de regressão linear foi obtida através da regressão linear entre a média da área determinada ($\mu V.s^{-1}$) para os pontos da curva e a concentração de fármaco em $\mu g.mL^{-1}$.

Para determinação da concentração de TR atingida no humor vítreo a curva padrão foi construída diretamente na matriz biológica obtida pela diluição (1:5V/V) de humor vítreo obtido de coelhos albinos sadios com solução tampão Tris-HCl (0,01M;

pH=7,4). A solução estoque foi preparada em solução tampão Tris-HCl (0,01M; pH 7,4) na concentração de 50μg.mL^{-1}. Diferentes alíquotas desta solução foram adicionadas na matriz biológica e agitadas em vortex por 1 minuto, para obter diferentes soluções com concentração na faixa de 0,05 a 20 μg.mL^{-1}. Após ultra centrifugação a 15000xg durante 15 minutos, o sobrenadante foi injetado no sistema CLAE equilibrado. A equação de regressão foi extraída da regressão linear entre área média determinada (μV.s^{-1}) para os pontos da curva e a concentração de fármaco em μg.mL^{-1}.

3.7. Estudo de validação

3.7.*1. Seletividade/Especificidade*

Para a análise quantitativa dos fármacos nas micropartículas, este parâmetro foi determinado através da comparação dos cromatogramas obtidos das micropartículas inertes (placebo) com os cromatogramas da matriz polimérica (micropartículas inertes) adicionada com diferentes quantidades de fármaco, em diferentes níveis de concentração. Enquanto que para a análise do fármaco *in vivo,* foi realizada a comparação dos cromatogramas obtidos da matriz biológica com aqueles obtidos da matriz biológica adicionada com diferentes quantidades de fármaco, em diferentes níveis de concentração.

3.*7.2. Linearidade e alcance*

A linearidade dos métodos CLAE foi determinada através da obtenção do coeficiente de correlação da curva padrão do fármaco (r^2), enquanto o alcance correspondeu à faixa de concentração considerada linear e compreendida na curva padrão.

3.7.3. Precisão

A repetividade foi determinada analisando o coeficiente de variação (CV) de determinações sucessivas de amostras padrão, em diferentes níveis de concentração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A precisão intermediária foi determinada analisando o coeficiente de variação (CV) das determinações quantitativas realizadas durante o ensaio da exatidão em 3 dias diferentes.

A precisão foi investigada para cinco níveis de concentração (sendo 2 abaixo, 1 no meio e 2 acima do meio da curva padrão).

3.7.4. Exatidão

A exatidão do método de análise quantitativa foi calculada como a porcentagem de recuperação de diferentes quantidades de fármaco adicionado à matriz polimérica no caso da análise quantitativa do CP nas micropartículas de PLGA. Para determinação da concentração de fármaco na matriz biológica, esta foi calculada como a porcentagem de recuperação de diferentes quantidades de fármaco adicionado à matriz biológica. O ensaio foi realizado em cinco níveis de concentração (sendo 2 abaixo, 1 no meio e 2 acima do meio da curva padrão) e todas as análises foram realizadas em triplicata em três diferentes dias.

3.7.5. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

Os LOD e LOQ foram matematicamente calculados, através da análise quantitativa de três amostras em triplicata, cada uma, em concentrações baixas, usando as Equações 3 e 4.

3.8. Análise estatística

Os dados 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). Quando necessário, os valores foram transformados em Rank.

Para confronto dos valores médios estatisticamente diferentes foi utilizado quando apropriado, o Student-Newman-Kews (SNK) para comparações dos pares, sendo considerados significativamente diferentes os valores de $p<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ciprofloxacino é amplamente utilizado em oftalmologia. A validação do método CLAE, além de garantir a segurança dos resultados da determinação do teor de fármaco incorporado nas micropartículas de PLGA, proporciona a disponibilização de uma ferramenta de análise segura e precisa para a realização dos estudos de farmacocinética ocular deste sistema de liberação.

4.1. Validação de método CLAE para análise quantitativa de ciprofloxacino em micropartículas de PLGA e a partir dos líquidos intraoculares

A Figura 9 apresenta as curva padrão do ciprofloxacino em (a) ácido acético e na (b) matriz biológica.

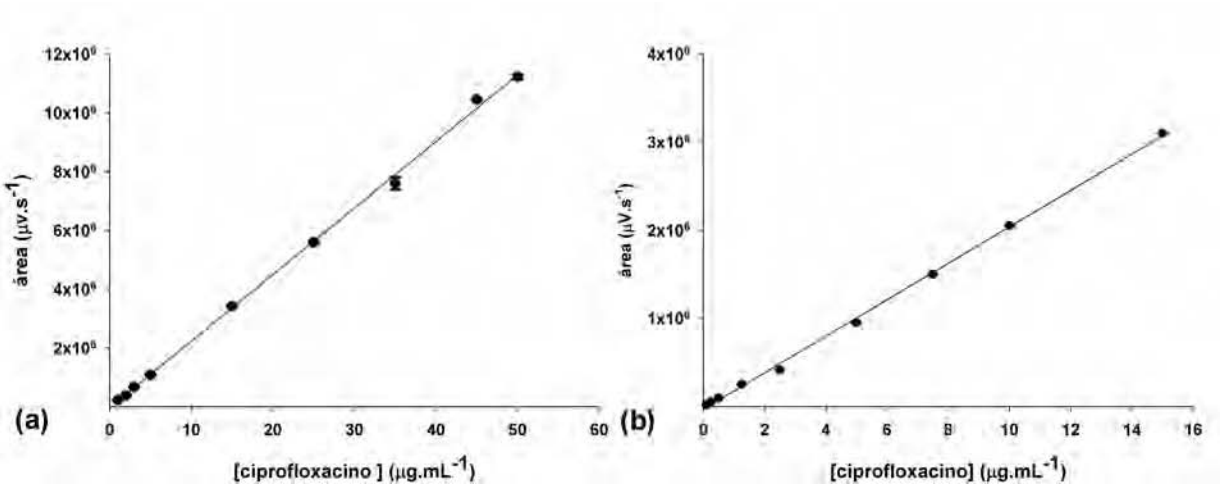

Figura 9. Curva padrão do ciprofloxacino obtida em (a) ácido acético e em (b) matriz biológica obtidas por CLAE em 278nm.

A equação linear representativa obtida para curva padrão para análise quantitativa do CP nas micropartículas foi de $y = 226606x - 36686$, enquanto que para a análise na matriz biológica foi $y = 207137x - 32588$. Ambas as curvas apresentaram valores para o coeficiente de correlação maiores que 0,999, indicando a linearidade do

método para análise quantitativa do fármaco nas micropartículas e nos líquidos intraoculares na faixa de concentração investigada.

A Figura 10 apresenta os cromatogramas obtidos do placebo (micropartículas inertes), e do placebo adicionado com diferentes quantidades de solução padrão de fármaco.

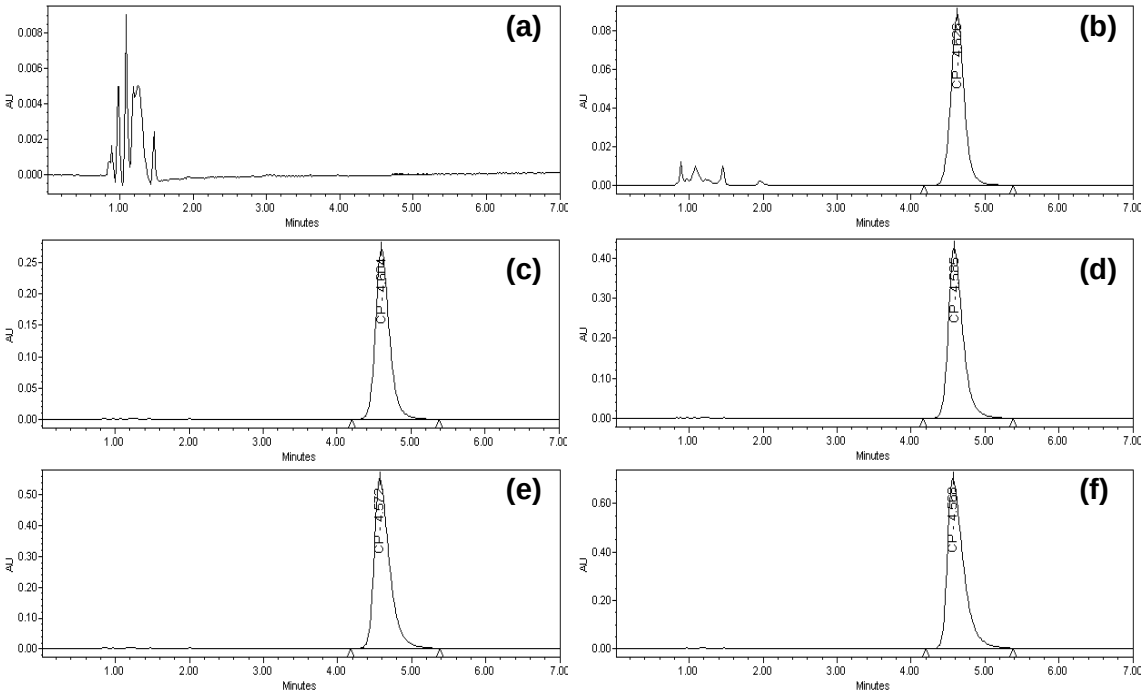

Figura 10. Cromatogramas obtidos para (a) micropartículas inertes antes de depois de adicionado fármaco nas concentrações de (b) 5μg.mL^{-1}; (c) 15 μg.mL^{-1};(d) 25 μg.mL^{-1};(e) 35μg.mL^{-1} e (f) 45 μg.mL^{-1}.

O fármaco apresentou tempo de retenção de ± 4,5 minutos e não foi identificado qualquer impureza ou componente da matriz que apresentasse sinal próximo desta faixa de tempo, indicando que o presente método de CLAE pode ser considerado específico e seletivo para a análise quantitativa do CP incorporado nas micropartículas.

A Figura 11 apresenta os cromatogramas obtidos da matriz biológica e da matriz biológica adicionada com diferentes quantidades de solução padrão de fármaco, onde o fármaco apresentou tempo de retenção de ± 4,6 minutos.

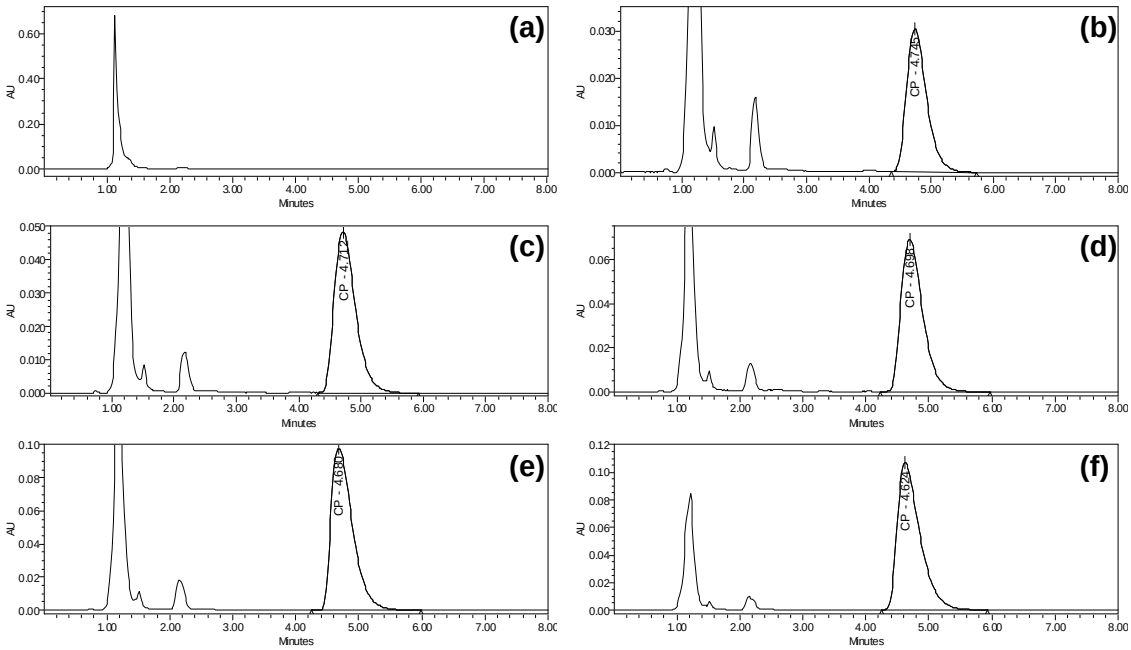

Figura 11. Cromatogramas (a) matriz biológica e matriz biológica adicionada com as concentrações (b) 2,5µg.mL^{-1}; (c) 5µg.mL^{-1};(d) 7,5 µg.mL^{-1};(e) 10µg.mL^{-1} e (f) 12,5µg.mL^{-1}.

De acordo com o ensaio realizado, o método pode ser considerado específico para análise quantitativa do fármaco nos líquidos intraoculares. Não houve diferença estatística (p<0,05) entre os tempos de retenção identificados na análise do fármaco na matriz polimérica, daqueles observados na análise da matriz biológica, indicando a robustez do método quanto a este aspecto.

A precisão (repetividade) foi determinada analisando o coeficiente de variação (CV%) das análises quantitativas sucessivas de amostras em diferentes níveis de concentração (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do teste de precisão (repetividade) do método CLAE para determinação analítica do ciprofloxacino em micropartículas de PLGA e a partir dos líquidos intraoculares.

Análise quantitativa do ciprofloxacino	Concentração Teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	Concentração Analítica ($\mu g.mL^{-1}$)	Repetibilidade CV (%)
Micropartículas de PLGA	5,0	4,97 ± 0,12	2,35
	15,0	15,28 ± 0,01	0,10
	25,0	24,88 ± 0,05	0,21
	35,0	34,27 ± 0,01	0,04
	45,0	46,29 ± 0,1	0,21
Matriz biológica	2,5	2,15 ± 0,01	0,65
	5,0	4,75 ± 0,02	0,36
	7,5	7,40 ± 0,01	0,19
	10,0	10,07 ± 0,01	0,15
	15,0	15,13 ± 0,02	0,13

De acordo com o teste de repetividade realizado, o método de CLAE utilizado pode ser considerado preciso tanto para determinação analítica do CP nas micropartículas de PLGA, quanto a partir da matriz biológica. Os valores de *CV%* calculados para os diferentes níveis de concentração estudados encontram-se dentro dos limites estabelecidos (ANVISA, 2003a).

A exatidão foi determinada como o percentual de recuperação identificado na análise quantitativa do placebo e da matriz biológica antes e depois de adicionado quantidades diferentes de fármaco para fornecer diferentes níveis de concentração. As análises foram realizadas (n=3) em dias diferentes com intervalo de um dia para permitir a determinação da precisão intermediária. Os resultados obtidos para determinação da precisão intermediária e da recuperação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do teste de precisão intermediária e de exatidão do método CLAE para determinação analítica do ciprofloxacino em micropartículas de PLGA e a partir dos líquidos intraoculares.

Análise quantitativa do ciprofloxacino	Concentração Teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão intermediária CV (%)
Micropartículas de PLGA	5,0	102,02 ± 0,44	0,43
	15,0	104,22 ± 0,299	0,28
	25,0	104,66 ± 0,15	0,14
	35,0	105,80 ± 0,26	0,24
	45,0	102,30 ± 0,03	0,21
Matriz biológica	2,5	89,17 ± 0,45	0,5
	5,0	80,59 ± 0,19	0,25
	7,5	87,06 ± 0,05	0,05
	10,0	86,32 ± 0,54	0,63
	15,0	85,35 ± 0,58	0,67

Os resultados obtidos para o teste de recuperação indicam que o método pode ser considerado exato. Apesar dos valores de recuperação identificados para a análise do fármaco na matriz biológica ser estatisticamente menores ($p<0,05$) daqueles identificados no placebo, para todos os níveis de concentração investigados os valores de recuperação determinados encontram-se dentro dos limites estabelecidos (80-110%) (ANVISA, 2003a; ICH, 1996).

Os valores de CV% identificados no teste de precisão intermediária foram menores que 1% e não foi observada diferença estatística ($p<0,05$) entre os dois tipos de análise realizada, demonstrando a boa exatidão e boa precisão intermediária do método.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do fármaco na matriz biológica.

Tabela 3. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação do fármaco nos líquidos intraoculares.

Amostra	Área identificada para as diferentes concentrações de fármaco		
	0,1 μg.mL^{-1}	***0,25 μg.mL^{-1}***	***0,5 μg.mL^{-1}***
1	19667	52346	97544
2	19590	52624	96560
3	20186	53329	99475
Média	***19814,33***	***52766,33***	***97859,67***
DP	***324,17***	***506,72***	***1482,92***

Desvio padrão médio (DPm) = 771,27

Inclinação da curva padrão (S) = 207137

LOD = 0,0123 μg/mL ***LOQ= 0,03723 μg/mL***

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são valores matematicamente calculados, no entanto pode-se concluir através dos resultados que o limite inferior da curva padrão pode ser utilizado para o cálculo da concentração do fármaco presente nas micropartículas, embora seja preferida a escolha de regiões próximas ao centro da curva padrão (SILVA-JÚNIOR et al., 2006).

O estudo dos parâmetros de validação para metodologia CLAE comprova que o método apresenta especificidade, linearidade, precisão e exatidão, indicando que o mesmo pode ser empregado com segurança na determinação analítica do ciprofloxacino nas micropartículas de PLGA e a partir dos líquidos intraoculares.

4.2. Validação de método CLAE para análise quantitativa de triancinolona em micropartículas de PLGA e a partir do humor vítreo.

A Figura 12 apresenta as curvas padrão da triancinolona em (a) fase móvel e na (b) matriz biológica.

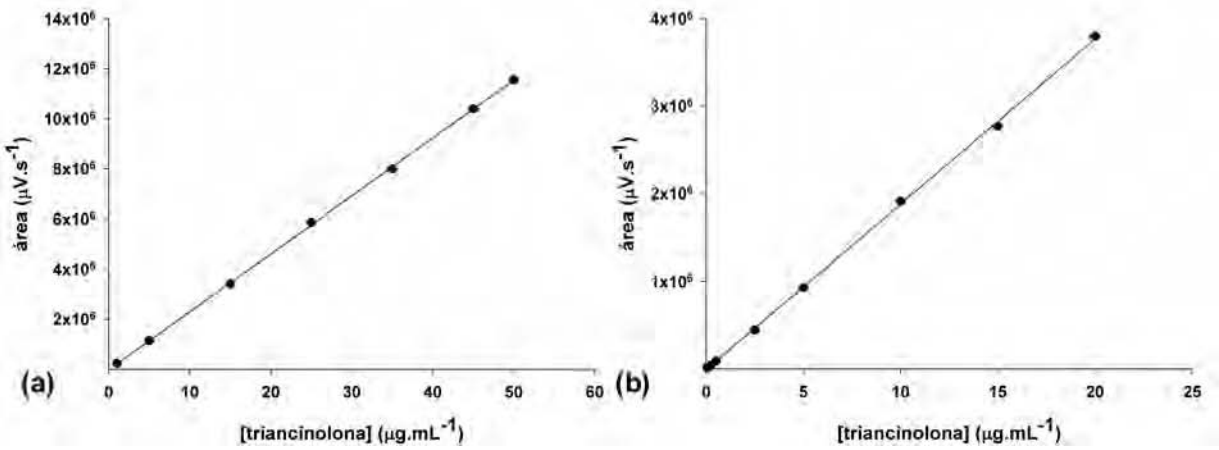

Figura 12. Curvas padrão da triancinolona obtida em (a) fase móvel e em (b) matriz biológica obtidas por CLAE em242nm.

A equação linear representativa obtida para curva padrão para análise quantitativa da Tr nas micropartículas foi de y= 231103x - 9057, enquanto para a análise na matriz biológica foi y = Y = 188608x - 4902. Ambas as curvas apresentaram valores para o coeficiente de correlação maiores que 0,999 demonstrando a linearidade do método para análise quantitativa do fármaco nas micropartículas e nos líquidos intraoculares na faixa de concentração estudada.

A Figura 13 apresenta os cromatogramas obtidos das micropartículas isentas de fármaco antes e depois de adicionada diferentes quantidades de solução padrão de fármaco.

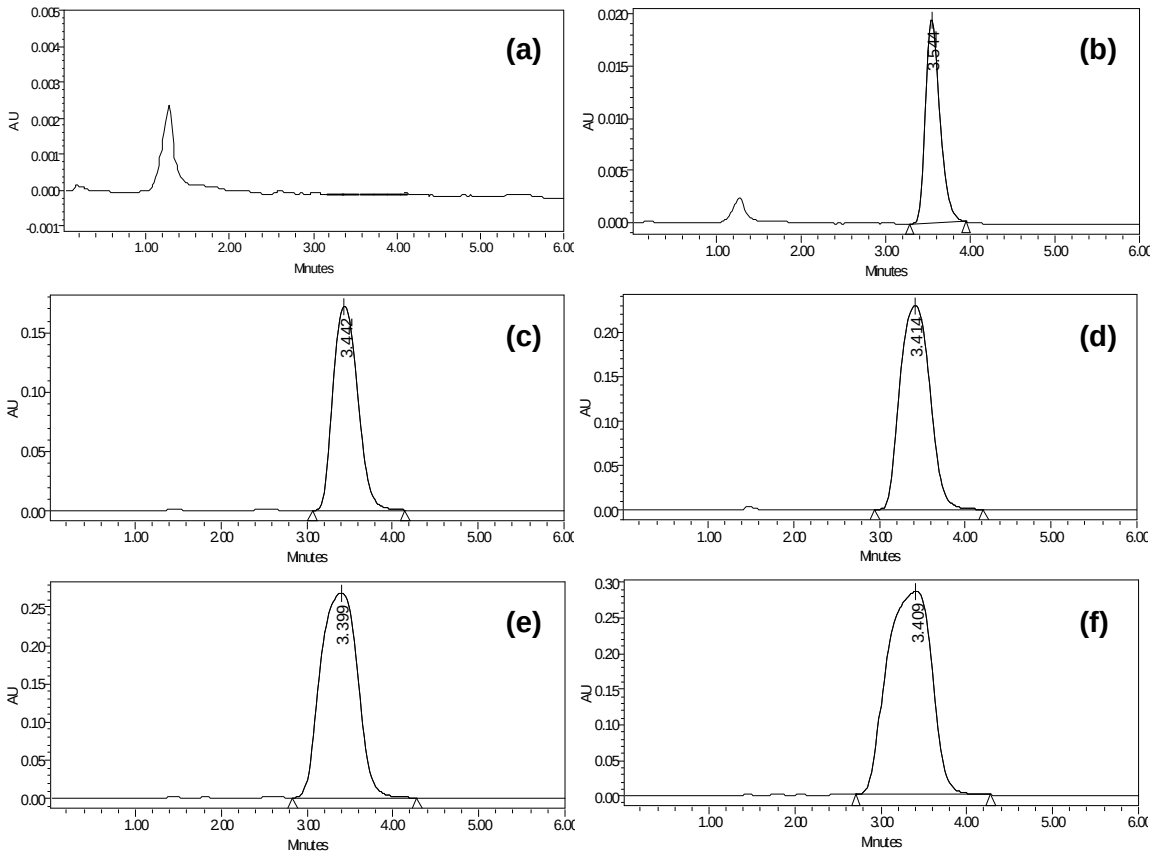

Figura 13. Cromatogramas (a) micropartículas inertes antes de depois de adicionado fármaco nas concentrações (b) 5µg.mL^{-1}; (c) 15 µg.mL^{-1};(d) 25 µg.mL^{-1};(e) 35µg.mL^{-1} e (f) 45 µg.mL^{-1}.

Através da Figura 13 pode ser observado que o fármaco apresentou o tempo de retenção de ± 3,5 minutos. De acordo com o ensaio realizado, o método pode ser considerado específico para análise quantitativa do fármaco nas micropartículas de PLGA.

Também foi observada a especificidade do método para a determinação analítica da triancinolona na matriz biológica. A Figura 14 apresenta os cromatogramas da matriz biológica antes e depois de adicionado quantidades crescentes de fármacos para fornecer diferentes níveis de concentração.

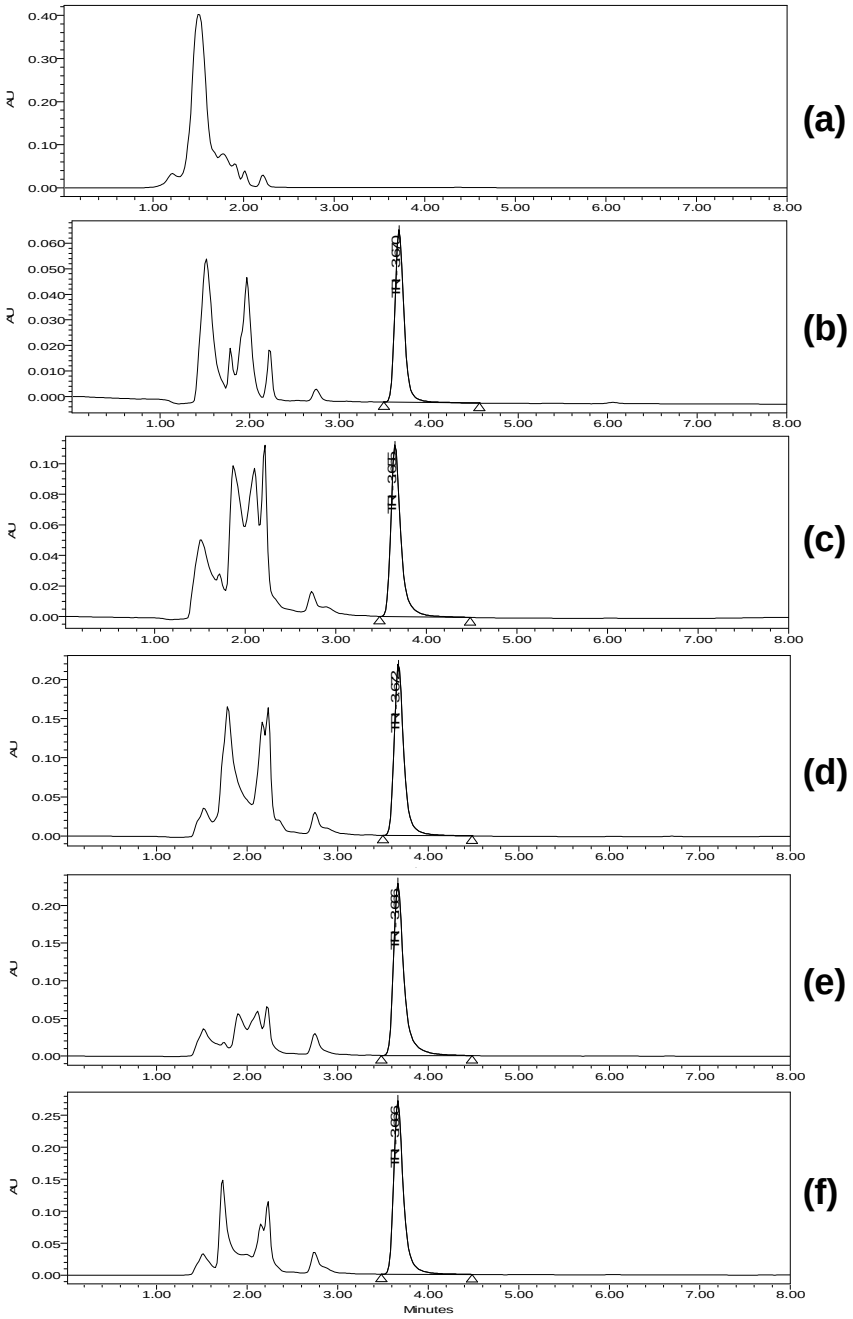

Figura 14. Cromatogramas (a) matriz biológica antes de depois de adicionada com as concentrações (b) 2,5µg.mL^{-1}; (c) 5µg.mL^{-1};(d) 7,5 µg.mL^{-1};(e) 10µg.mL^{-1} e (f) 12,5µg.mL^{-1}.

O fármaco apresentou o tempo de retenção de ± 3,5 minutos e de acordo com o ensaio realizado, o método pode ser considerado específico para análise quantitativa da triancinolona no segmento posterior do olho.

Através do ensaio de seletividade realizado, pode ser observado que não houve diferença estatística (p<0,05) no tempo de retenção do fármaco (± 3,5 minutos), indicando a robustez do método quanto a esta alteração.

A repetividade do método foi determinada analisando o coeficiente de variação (CV%) de análises quantitativas sucessivas de amostras em diferentes níveis de concentração realizadas no mesmo dia (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados do teste de precisão (repetividade) do método CLAE para determinação analítica da triancinolona em micropartículas de PLGA e a partir da matriz biológica.

Análise quantitativa da triancinolona	Concentração teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	Concentração analítica ($\mu g.mL^{-1}$)	Repetividade CV (%)
Micropartículas de PLGA	5,0	4,99 ± 0,005	0,10
	15,0	14,78 ± 0,009	0,06
	25,0	25,47 ± 0,002	0,01
	35,0	34,61 ± 0,009	0,03
	45,0	45,00 ± 0,008	0,02
Matriz biológica	2,5	2,58 ± 0,026	1,01
	5,0	5,11 ± 0,003	0,07
	7,5	7,97 ± 0,005	0,07
	10,0	10,66 ± 0,122	1,14
	15,0	14,96 ± 0,005	0,03

Os resultados obtidos no ensaio de repetividade (CV%) estão de acordo com os limites estabelecidos. Em todos os níveis de concentração investigados para determinação analítica do fármaco nas micropartículas, assim como a partir da matriz biológica foram determinados valores de CV% < 1.5%. Não foi observada diferença estatística (p< 0,05) entre o nível de precisão obtido para os dois tipos de análise quantitativa da TR, indicando a robustez do método quanto a esta variação e que o método pode ser considerado repetitivo para os fins pretendidos.

A exatidão foi determinada como o percentual de recuperação identificado na análise quantitativa do placebo e de matriz biológica adicionados com solução padrão

de fármaco em diferentes níveis de concentração. As análises foram realizadas (n=3) em dias diferentes com intervalo de um dia para permitir a determinação da precisão intermediária. Os resultados obtidos para determinação da precisão intermediária e da recuperação estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados do teste de precisão intermediária e de exatidão do método CLAE para determinação analítica da triancinolona em micropartículas de PLGA e a partir da matriz biológica.

Análise quantitativa da triancinolona	Concentração teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	Concentração analítica ($\mu g.mL^{-1}$)	Repetividade CV (%)
Micropartículas de PLGA	5,0	99,96 ± 0,09	0,09
	15,0	102,02 ± 0,03	0,03
	25,0	97,51 ± 0,02	0,03
	35,0	101,35 ± 0,05	0,05
	45,0	99,61 ± 0,08	0,08
Matriz biológica	2,5	101,89 ± 3,78	3,31
	5,0	101,94 ± 3,49	3,42
	7,5	97,35 ± 1,36	1,39
	10,0	102,52 ± 3,09	3,01
	15,0	100,37 ± 1,27	1,27

Os valores de recuperação identificados para todos os níveis de concentração investigados no teste de exatidão estão de acordo com os limites estabelecidos. Não foi identificada diferença estatística (p<0,05) entre os valores de recuperação do fármaco no placebo (97,51-102,02%) daqueles identificados a partir da matriz biológica (97,35-102,52%), demonstrando a robustez do método quanto a esta variação e que o método pode ser considerado exato para os objetivos pretendidos.

Os valores de CV% identificados no teste de precisão intermediária foram menores que 3,5%; indicando que a variação de dias inserida no ensaio não foi capaz de alterar a precisão da metodologia CLAE para análise quantitativa da TR nas micropartículas de PLGA e na matriz biológica.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) da triancinolona na matriz biológica.

Tabela 6. Resultados obtidos para o cálculo de LOD e de LOQ da triancinolona na matriz biológica.

Amostra	Área identificada para as diferentes concentrações de fármaco		
	0,05 μg.mL^{-1}	***0,1 μg.mL^{-1}***	***0,25 μg.mL^{-1}***
1	11810	22423	52992
2	11643	26591	51859
3	12071	23811	52196
Média	***11841,33***	***24275***	***52349***
DP	***215,71***	***2122,39***	***581,79***

Desvio padrão médio (DPm)= 973,30

Inclinação da curva padrão (S)= 188607,89

LOD = 0,0155 μg/mL ***LOQ= 0,052 μg/mL***

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram matematicamente calculados utilizando as Equações 2 e3.

Depois de determinar os parâmetros de validação para a metodologia CLAE, pode ser verificado que esta pode ser considerada específica, precisa e exata, podendo ser utilizada com segurança para a análise quantitativa da triancinolona nas micropartículas de PLGA e a partir da matriz biológica.

5. CONCLUSÃO

Após a realização do estudo de validação, ficou comprovado que as metodologias CLAE propostas podem ser empregadas de forma segura na análise quantitativa do ciprofloxacino e da triancinolona em micropartículas de PLGA e a partir dos líquidos intraoculares.

O presente estudo permitiu o desenvolvimento de métodos CLAE simples, rápidos, específicos, precisos e exatos para os objetivos pretendidos.

A conclusão do presente estudo constitui parte de uma etapa fundamental no desenvolvimento das micropartículas biodegradáveis para a liberação prolongada intraocular de ciprofloxacino e de triancinolona.

A validação das metodologias CLAE propostas permite o controle de qualidade das micropartículas e a monitorização da concentração de fármaco atingida nos líquidos intraoculares após a administração das mesmas, de forma segura e eficiente.

IV. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MICROPARTÍCULAS

1. RADIAÇÃO GAMA COMO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO PARA MICROPARTÍCULAS DE PLGA

No capítulo II já foi apresentado à importância do processo de esterilização para o sucesso terapêutico das micropartículas como sistema de liberação de fármacos para uso em oftalmologia.

Para esterilização dos sistemas obtidos foi escolhido o método de irradiação gama. Antes disso foi investigado o efeito da exposição das micropartículas de PLGA carregadas com fármaco a diferentes cargas de radiação.

Na presente etapa do desenvolvimento dos sistemas microparticulados a base de PLGA para liberação intraocular prolongada de ciprofloxacino e para triancinolona, foi investigado o efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas mais relevantes para a qualidade dos sistemas.

Embora a carga de radiação preconizada para esterilização de produtos farmacêuticos seja de 25kGy, como o objetivo de investigar o real efeito deste processo na tecnologia de produção dos sistemas, foi investigado o efeito da exposição às cargas de 5, 10, 15 e 25kGy.

2. OBJETIVOS

- ✓ Produzir micropartículas de PLGA contendo ciprofloxacino para administração na cápsula sub-tenoniana inferior-posterior na forma de suspensão.
- ✓ Produzir micropartículas de PLGA contendo triancinolona para administração intravitreal na forma de suspensão.
- ✓ Estudar o efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas de PLGA carregadas com fármaco.
  - ➢ No presente estudo foi realizado a caracterização físico-química das micropartículas carregadas com o fármaco depois de expostas à diferentes cargas de radiação gama (5, 10, 15 e 25 kGy). Como controle foram utilizadas as micropartículas carregadas com o fármaco antes da exposição ao processo de radiação gama.
  - ➢ A caracterização físico-química incluiu:
    - o Morfologia e Forma das Partículas.
    - o Análise Granulométrica.
    - o Análise quantitativa do teor de fármaco incorporado nas micropartículas.
    - o Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.
    - o Análise térmica
    - o Análises por difração de raios X
    - o Velocidade de liberação do fármaco *in vitro* a partir das micropartículas de PLGA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

- ✓ Ciprofloxacino comprado da Galena (Brasil).
- ✓ Triancinolona comprado da Galena (Brasil).
- ✓ D,L-PLGA 50:50 (viscosidade intrínseca de 0,63dL/g) Birmingham polymers Inc. (USA).
- ✓ Acetonitrila grau HPLC, J.T Baker (México).
- ✓ Acetona LABSYNT. (Brasil).
- ✓ Ácido acético glacial LABSYNT (Brasil).
- ✓ Água preparada com sistema purificador de água (Millipore) com resistividade de 18.2 MΩ-cm. e outros reagentes de grau analítico.

3.2. Equipamentos e Acessórios

- ✓ Spray Dryer de laboratório, BÜCHI modelo B191.
- ✓ Balança analítica, METTLER®, modelo H 51.
- ✓ Lavadora ultra-sônica TRANSTEK SYSTEMS®, modelo soniclean.
- ✓ HPLC Waters® modelo alliance 2695.
- ✓ Detector UV com arranjo de diodos Waters®, modelo 2996.
- ✓ Detector UV Waters® modelo 2487.
- ✓ Coluna analítica SYMETRY® C18 150 x 4,0 mm e 5 μm de tamanho de partículas e Pré-colunas SYMETRY® de mesma composição.
- ✓ Microscópio eletrônico de varredura - JEOL modelo JSM T330A
- ✓ Software leika quiwn®
- ✓ Espectrofotômetro UV-VIS, Hewlett Packard, modelo kayak xa.
- ✓ Espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu modelo FTIR 8300.
- ✓ Célula calorimétrica Shimadzu, modelo DSC-50.
- ✓ Termobalança Shimadzu, modelo TGA-50.
- ✓ Difratometro Rikugu® modelo Dmax 2500PC
- ✓ Ultracentrífuga HITASHI modelo himac 80β.

3.3. Preparação das micropartículas de PLGA contendo ciprofloxacino

Quantidades pré-estabelecidas de PLGA foram dissolvidas em acetona, e adicionado à solução de ciprofloxacino em ácido acético sob agitação a fim de obter solução final de proporção massa:massa de 1:2 (fármaco:polímero). A solução de fármaco:polímero foi devidamente atomizada em aparelho de “spray dryer”, utilizando fluxo de alimentação de 6-8mL/min, atomizador de 0,7mm; fluxo de ar de secagem de 450NL/h; temperatura de entrada de 80-90ºC e de saída de 50-55ºC e rendimento de aspiração de 100%. As micropartículas foram diretamente coletadas do ciclone e armazenadas a temperatura ambiente sob vácuo pelo período de tempo mínimo de 48 horas.

3.4. Preparação das micropartículas de PLGA contendo triancinolona

Quantidades pré-estabelecidas de PLGA e triancinolona foram dissolvidas em acetona a fim de obter solução final de proporção fármaco:polímero (1:1). A solução de fármaco:polímero foi devidamente atomizada em aparelho de “spray dryer”, utilizando fluxo de alimentação de 6mL/min, atomizador de 0,7mm; fluxo de ar de secagem de 450NL/h; temperatura de entrada de 70-80ºC e de saída de 45-50ºC e rendimento de aspiração de 100%. As micropartículas foram diretamente coletadas do ciclone e armazenadas a temperatura ambiente sob vácuo pelo período de tempo mínimo de 48 horas.

3.5. Exposição das micropartículas ao processo de radiação gama

O processo de exposição das microparticulas foi realizado pela Empresa Brasileira de Radiações-EMBRAD. Depois de produzidas, as micropartículas de PLGA carregadas com o fármaco 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 foi utilizado o cobalto 60 e foram investigadas diferentes doses de 5, 10; 15 e 25 kGy.

3.6. Caracterização físico-química das micropartículas

Com o objetivo de determinar o efeito das diferentes cargas de radiação gama, foi realizada a caracterização físico-química das micropartículas de PLGA carregadas com o fármaco antes e depois de serem submetidas ao processo de irradiação utilizando as cargas de 5, 10, 15 e 25kGy.

3.6.1. Morfologia

A forma das partículas foi observada utilizando as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

3.6.2. Análise do tamanho de partículas

Utilizando as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e com auxílio do software analisador de imagens leika Qwin®, foi medido o diâmetro de Feret a *0º* das partículas. Durante o ensaio foi utilizada a amostragem mínima de 300 partículas. A distribuição do tamanho de partículas e sua análise comparativa foram realizadas a partir dos gráficos de freqüência porcentual dos diâmetros medidos expressados em micrômetros. O diâmetro médio das micropartículas foi calculado através da determinação da média ponderada em função da freqüência dos valores de diâmetro medidos.

3.6.3. Análise quantitativa do fármaco nas micropartículas de PLGA

Com o objetivo de determinar o efeito da radiação gama no teor de fármaco incorporado nas micropartículas, a análise quantitativa do fármaco contido nas micropartículas foi realizada antes e depois do processo de exposição às diferentes cargas de radiação investigadas. Para isso, foi utilizado o método de análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) antes desenvolvida e validada.

3.6.3.1 Análise quantitativa do ciprofloxacino nas micropartículas de PLGA

A quantidade de micropartículas equivalente a 10mg de ciprofloxacino foi dissolvida volumetricamente em 10mL de ácido acético glacial. Alíquotas de 250µL desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado com ácido acético 0,1M para obter soluções amostra de concentração teórica de 25µg.mL-^{1}, que após filtradas, foram devidamente analisadas pelo método CLAE específico.

3.6.3.2. Análise quantitativa da triancinolona nas micropartículas de PLGA

A quantidade de micropartículas equivalente a 10mg de triancinolona foi dissolvida volumetricamente em 10mL de acetonitrila. Alíquotas de 250µL desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado com a fase móvel para obter soluções amostra de concentração teórica de 25µg.mL-^{1}, que após filtradas, foram devidamente analisadas pelo método CLAE específico.

O teor de fármaco contido nas micropartículas foi determinado com auxílio da Equação 4 (SILVA-JUNIOR, 2005).

$$TF\ (\%) = \left[\frac{MFRD}{MM} \right] \text{x}\ 100 \qquad \text{Equação 4.}$$

TF (%)= Teor de fármaco

MFRD = Massa de fármaco analíticamente determinada no sistema polimérico.

MM = Massa de micropartículas utilizada no ensaio analítico.

3.6.4. Análise de espectroscopia na região do infravermelho

Com o objetivo de determinar a ocorrência de possíveis interações químicas entre o fármaco e o polímero ou alterações químicas dos componentes das micropartículas durante o processo de exposição à radiação gama, foram obtidos os espectros de absorção na região do infravermelho do fármaco puro, do PLGA e das micropartículas de PLGA carregadas com o fármaco antes e depois de serem submetidas às diferentes cargas de radiação gama. Durante o ensaio foi utilizado cerca de 2mg de amostra misturada com 325mg de brometo de potássio utilizando grau com pistilo. Após exsicação, as pastilhas foram obtidas em prensa hidráulica (FU et al., 2002; SILVA-JUNIOR, 2005).

3.6.5. Análise térmica

A análise térmica das amostras foi realizada em colaboração com o laboratório de análise térmica "Professor Ivo Giolito (LATIG)" sob a coordenação do professor Dr. Jivaldo Rosário de Matos do departamento de química fundamental da Universidade de São Paulo-SP.

A análise térmica foi realizada com o objetivo de determinar a ocorrência de possíveis interações físico-químicas entre o fármaco e o polímero ou de determinar possíveis alterações físico-químicas dos componentes das micropartículas durante o processo de irradiação. Para isso, foram obtidas as curvas termoanalíticas (DSC e ATG/DTG) dos componentes puros e das micropartículas de PLGA carregadas com o fármaco antes e depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

3.6.5.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas na faixa de 25 - 500ºC, sob atmosfera de N_2 ($100mL.min^{-1}$), com razão de aquecimento de $10ºC.min^{-1}$, utilizando cápsulas de alumínio fechadas contendo aproximadamente 1mg de amostra. A célula de DSC foi

calibrada antes dos experimentos utilizando padrão de índio ($T_{fusão}$= 156ºC e $\Delta H_{fusão}$= 28,4J.g^{-1}) e zinco ($T_{fusão}$= 419,4ºC).

3.6.5.2. Análise termogravimétrica/ termogravimetria derivada (ATG/DTG).

As curvas de ATG/DTG foram obtidas na faixa de 25-600ºC, sob atmosfera de N_2 (50mL.min^{-1}), com a razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}. Durante os ensaios, foi utilizado o cadinho de platina contendo cerca de 5mg de amostra.

3.6.6. Difração de Raios X (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 anglo 2 θ, variando de 5º a 50º, usando radiação CuKa de λ=1,5406 Å.

3.6.7. Liberação in vitro do fármaco a partir das micropartículas

A fim de determinar possíveis alterações no empacotamento da microestrutura das micropartículas de PLGA carregas com o fármaco, foi determinado o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas antes e depois da exposição as diferentes cargas de radiação gama.

3.6.7.1. Liberação "in vitro" do fármaco a partir das micropartículas

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados utilizando o modelo estático, no qual as micropartículas contendo o equivalente a 1mg de fármaco foram incubadas em tubos com 3mL de solução tampão Tris 0,01M pH 7,4 e mantidas em banho de agitação termostatizado à 37ºC $\pm$ 0,2ºC Em intervalos de tempo pré-determinados os tubos foram centrifugados 11000xg durante 10 minutos e o sobrenadante foi retirado e analisado por espectrofotometria de UV (BLANCO-PRIETO et al., 1999; MU; FENG,

2001; RAHMAN; MATHIOWITZ, 2004; SILVA-JÚNIOR, 2005). Novo volume de solução tampão foi adicionado aos tubos, os quais as micropartículas foram ressuspendidas e novamente incubadas até o próximo tempo de coleta (SILVA-JÚNIOR, 2005).

As análises quantitativas foram realizas em 242nm no caso da triancinolona, enquanto para o ciprofloxacino foi em 271nm. Todas as análises foram realizadas (n=4) utilizando cubeta de quartzo de 1cm e como branco, foi utilizado o volume de meio retirado da dissolução da mesma massa de micropartículas isentas de fármaco (placebo) utilizadas nas mesmas condições do ensaio.

O teor de fármaco liberado foi calculado com auxílio da curva padrão contruída utilizando as mesmas condições do ensaio, utilizando a Equação 5.

$$MFL\,(\%) \quad = \quad \sum \left[\frac{Ct.V}{MF} \right] x100 \qquad \text{Equação 5.}$$

MFL (%) = Percentual de massa de fármaco liberada

Ct = Concentração de fármaco determinada no tempo "t"

V = Volume do meio de liberação

MF = Massa de fármaco utilizada no experimento

3.6.7.2. Construção da curva padrão para análise da quantidade de ciprofloxacino liberada

A solução estoque de ciprofloxacino foi preparada em solução tampão Tris-HCl 0,01M; pH= 7,4 na concentração de 40μg.mL^{-1}. Diferentes soluções-padrão com concentração na faixa de 0,5 a 20,0μgmL^{-1} foram obtidas pela diluição da solução estoque com a solução tampão Tris-HCli 0,01M; pH= 7,4. As soluções-padrão foram analisadas em triplicata por espectrofotometria de UV em 271nm, usando cubeta de quartzo de 1cm e solução tampão Tris 0,01M pH 7,4 como branco. A equação de regressão linear foi obtida através da regressão linear entre os valores médios de absorbância obtidos e a concentração de fármaco em μg.mL^{-1} utilizada.

3.6.7.3. Construção da curva padrão para análise da quantidade de triancinolona liberada

A solução estoque de triancinolona foi preparada em solução tampão Tris-HCl 0,01M; pH= 7,4 na concentração de 50μg.mL^{-1}. Diferentes soluções-padrão com concentração na faixa de 1,25 a 50μg.mL^{-1} foram obtidas pela diluição da solução estoque. As soluções-padrão foram analisadas em triplicata por espectrofotometria de UV em 242nm, usando cubeta de quartzo de 1cm e solução tampão Tris 0,01M pH 7,4 como branco. A equação de regressão linear foi obtida através da regressão linear entre os valores médios de absorbância obtidos e a concentração de fármaco em μg.mL^{-1} utilizada.

3.7. Análise estatística

Os dados 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). Quando necessário, os valores foram transformados em Rank.

Para confronto dos valores médios estatisticamente diferentes foram utilizados, quando apropriado, os testes de Dunn's e teste de Dunnet para comparações múltiplas em relação ao grupo controle, sendo considerados significativamente diferentes os valores de $p<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas de PLGA obtidas por "spray drying" carregadas com ciprofloxacino.

Os parâmetros selecionados para a técnica de secagem por atomização "spray drying" conduziram a obtenção das micropartículas de PLGA contendo ciprofloxacino com sucesso. Isto se deve aos estudos de pré-formulação realizados em trabalhos anteriores (SILVA JÚNIOR, 2005; SILVA JÚNIOR et al., 2008a). O material particulado obtido foi um pó de cor amarela palha, fino, de aspecto morfológico e granulométrico uniforme, característica esta que foi confirmada na análise da forma e do tamanho das micropartículas.

4.1.1. Morfologia

A forma das partículas foi observada utilizando as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). A Figura 15 apresenta a imagem das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino (McCp) antes de serem expostas à radiação gama.

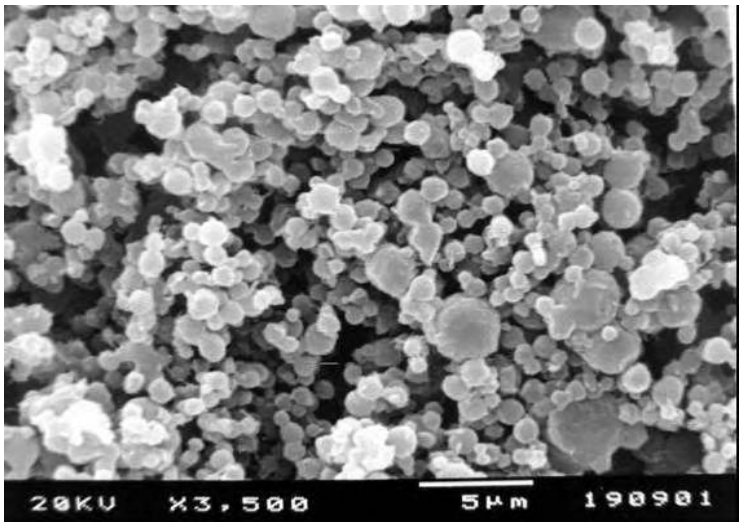

Figura 15. Imagem de SEM das McCp antes da exposição à radiação gama.

A Figura 15 apresenta partículas de forma predominantemente esférica, de superfície aparentemente lisa. A manutenção destas características após o processo de exposição à radiação gama é de fundamental importância para a uniformidade da velocidade de liberação do fármaco que o sistema pode fornecer.

A Figura 16 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino (McCP) depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

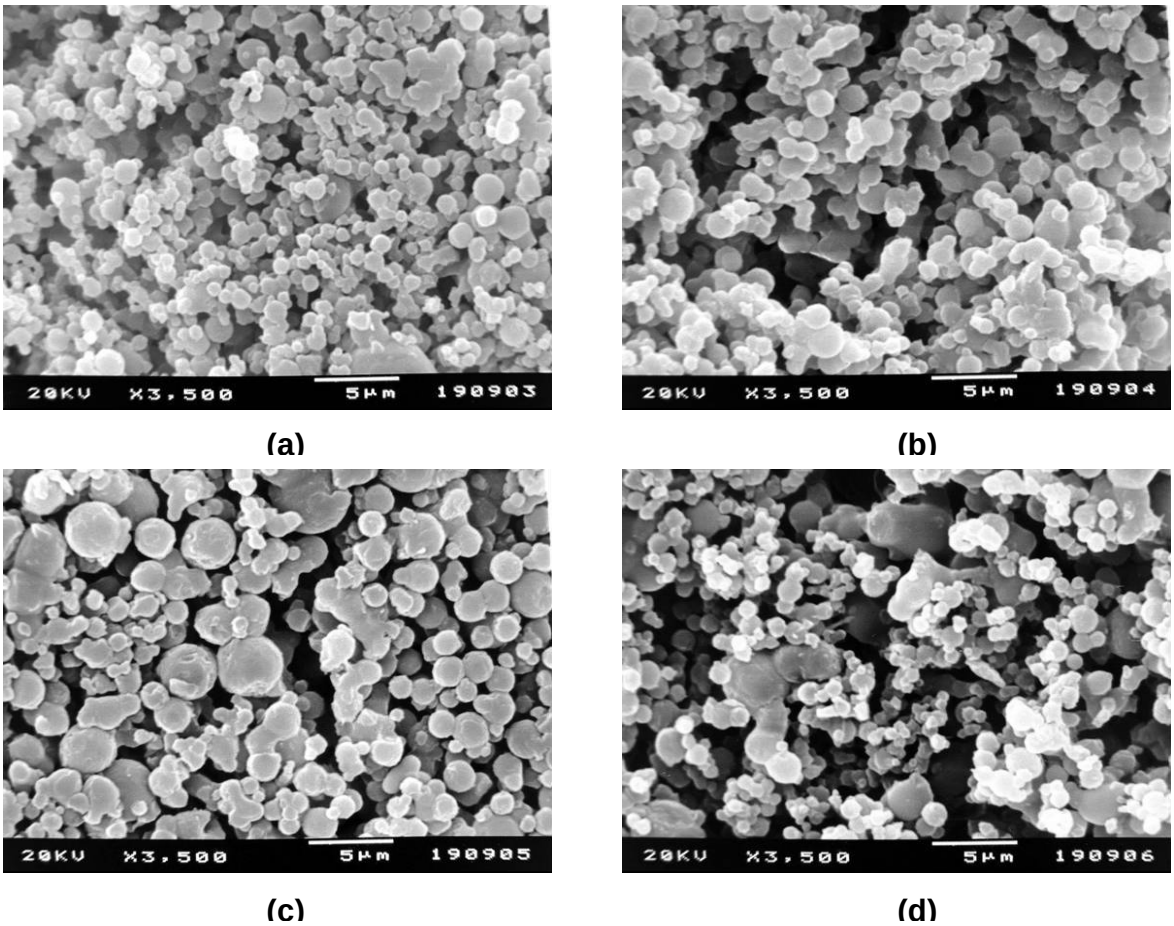

Figura 16. Imagens de SEM das McCp depois da exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy; (b) 10kGy; (c) 15kGy e (d) 25kGy.

Depois de analisar as imagens SEM das McCp após a exposição às diferentes cargas de radiação gama, foi verificado inicialmente que não ocorreu alteração

relevante no aspecto e na forma das partículas. No entanto, alguma alteração foi observada nas amostras submetidas às cargas de 15 e 25kGy.

4.1.2. Análise do tamanho de partículas

A Figura 17 apresenta a distribuição do tamanho de partículas das McCP antes da exposição à radiação gama.

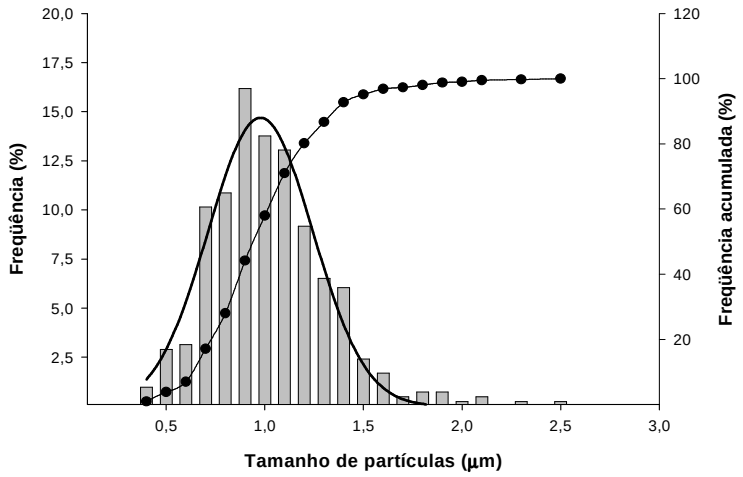

Figura 17. Distribuição do tamanho de partículas das McCp antes da exposição à radiação gama.

As McCp apresentaram características físicas bastante interessantes. O tamanho de partículas obtido foi bastante reduzido com mais de 40% do material com diâmetro abaixo de 1µm. O material particulado apresentou a distribuição do tamanho de partículas compreendida entre 0,4 e 2,5µm, na qual um perfil de distribuição normal foi identificado e mais de 90% do material particulado está compreendido entre 0,4 e 2,0 µm.

O tamanho de partículas é uma característica física importante, pois está relacionado diretamente com a área de superfície das partículas e conseqüentemente com a velocidade de difusão do fármaco a partir da matriz polimérica, alterando assim diretamente a velocidade de liberação do fármaco a partir do sistema microparticulado (QUAGLIA et al., 2003; SILVA-JÚNIOR, 2005). Qualquer alteração relevante no tamanho e na forma das partículas ocorrida depois da exposição das McCP à radiação

gama, possivelmente comprometeria a uniformidade da velocidade de liberação do fármaco, tornando-se essencial caracterizar este efeito.

A Figura 18 apresenta a distribuição do tamanho de partículas das McCP depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

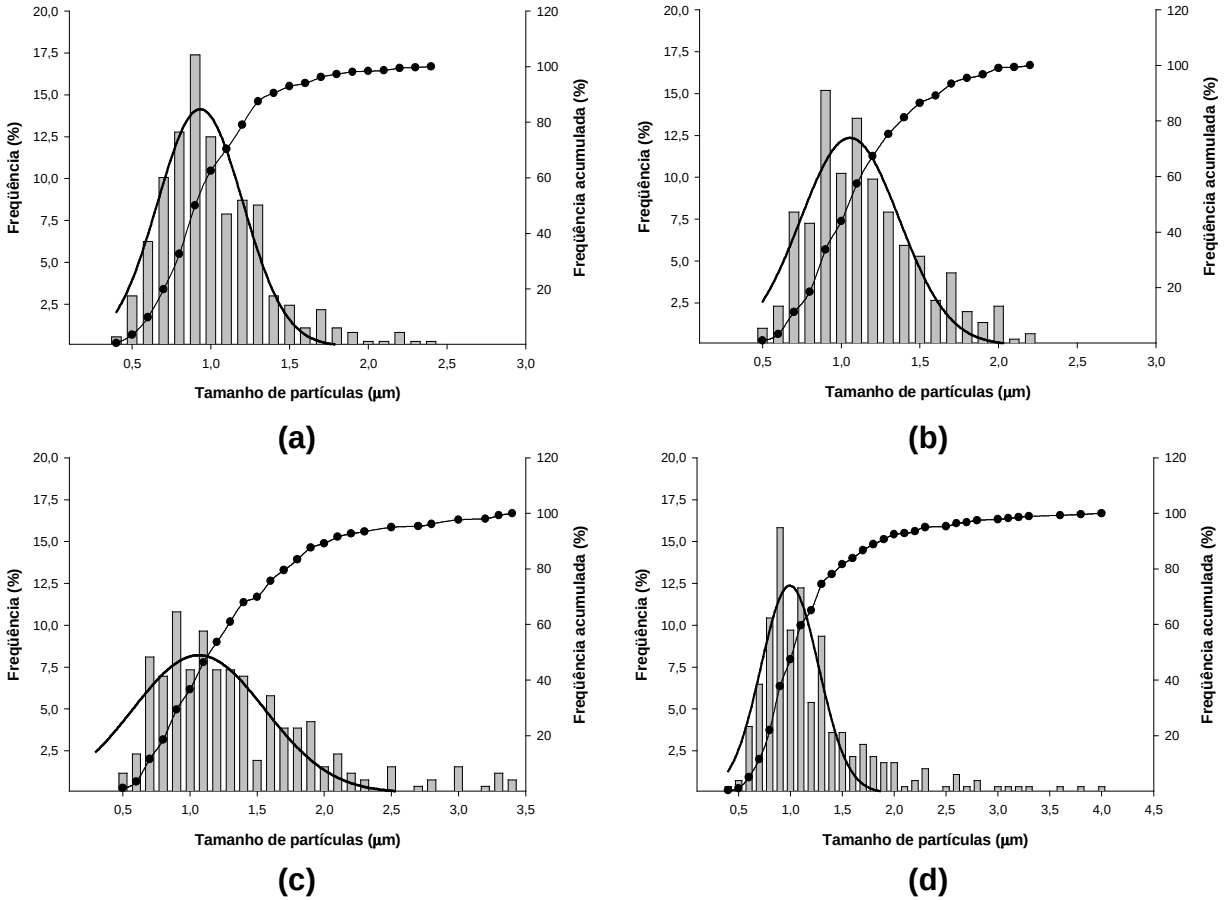

Figura 18. Distribuição do tamanho de partículas das McCp depois da exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy; (b) 10kGy; (c) 15kGy e (d) 25kGy.

Depois de observar a Figura 18, foi verificado que as McCp submetidas às cargas de radiação gama de 5 e 10kGy mantiveram a distribuição do tamanho de partículas entre 0,4 e 2,5µm. O mesmo não ocorreu com as amostras submetidas a 15 e 25kGy. No entanto, todas as amostras apresentaram perfil de distribuição normal, com mais de 90% do material particulado entre 0,4 e 2,0µm, indicando que as cargas

de radiação gama estudadas não provocaram alterações no perfil de distribuição do tamanho das micropartículas.

Os resultados da análise granulométrica podem ser melhor observados através dos valores das medidas de tendência central (média, mediana e moda) calculados para as McCp, antes e depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama (Tabela 1).

Tabela 7. Efeito da radiação gama na granulometria das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino.

Carga de radiação utilizada	Diâmetro médio (μm)	Diâmetro mediano (μm)	Diâmetro modal (μm)
Não irradiadas	1,03 ± 0,30	1,0	0,90
5kGy	1,02 ± 0,34	1,0	0,9
10kGy	1,13 ± 0,38*	1,2	0,9
15kGy	1,34 ± 0,60*	1,2	0,9
25kGy	1,21 ± 0,56*	1,1	0,9

* Estatisticamente diferente das McCp não irradiadas (P<0,05)

As diferentes amostras apresentaram valores de diâmetro médio e de medianos muito próximos, onde a moda identificada para todas as amostras foi 0,9μm. No entanto, após submeter os valores de diâmetro medidos para as diferentes amostras a uma análise de variância ANOVA foi identificada diferença estatística entre os valores (p<0,05). Após o teste *post hoc* de Dunn´s com confronto dos valores em relação às McCP antes da exposição à radiação gama (controle) foi verificada que as amostras submetidas às cargas de radiação gama de 10, 15 e 25kGy apresentaram diferença estatística na distribuição do tamanho de partículas (P<0,05) em relação às amostras de McCP não irradiadas.

A Figura 19 ilustra graficamente o efeito da radiação gama no tamanho médio de partículas granulometria das McCP.

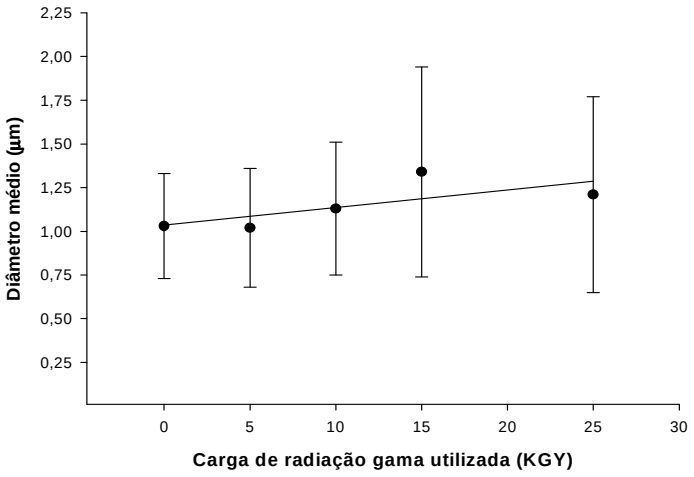

Figura 19. Efeito da radiação gama na granulometria das McCp.

Através da Figura 19 pode ser observado um efeito levemente positivo da carga de radiação gama no diâmetro médio determinado das McCP.

Trabalhos anteriores relatam ausência de efeito da radiação gama (25kGy) na forma e na distribuição de tamanho de partículas em micropartículas de PLGA carregadas com diversos princípios ativos como anti-retrovirais (MARTINEZ-SANCHO et al., 2004) e vacinas (IGARTUA et al., 2007); indicando ausência da alteração da forma ou de qualquer agregação após o processo de irradiação. No entanto, Calis e colaboradores (2002) investigaram o efeito de diferentes cargas de radiação gama (5, 15 e 25 kGy) nas propriedades biofarmacêuticas de micropartículas de PLGA contendo antiinflamatórios não esteroidais e verificou diferenças na morfologia e granulometria das partículas após o processo de radiação, principalmente nas partículas irradiadas com a carga de 25kGY.

A diversidade de resultados encontrados na literatura demonstra que não se pode estabelecer um efeito intrínseco direto do processo de irradiação gama na morfologia e tamanho das micropartículas de PLGA carregadas com fármacos, sugerindo que este efeito possa está mais relacionado com a composição química, com os processos de obtenção e solventes utilizados na microencapsulação dos fármacos (MONTANARI et al., 1998; HERRERO-VANRELL et al., 2000; CALIS et al., 2002; MONTANARI et al., 2003; MARTINEZ-SANCHO et al., 2004; IGARTUA et al., 2007).

A realização do presente estudo permitiu identificar que após a exposição das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino à radiação gama não foi identificado alteração da forma ou do perfil de distribuição do tamanho de partículas. No entanto, os valores de diâmetro de Feret para as amostras de McCP submetidas às cargas de 10, 15 e 25kGy apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Para saber o impacto desta alteração sobre as propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas e possível comprometimento do funcionamento das McCP após a exposição à radiação gama é necessário realizar estudos que sejam capazes de complementar e melhor avaliar estes resultados.

4.1.3. Análise quantitativa do teor fármaco nas micropartículas

O teor de fármaco incorporado foi determinado utilizando a metodologia CLAE antes desenvolvida e validada para a análise quantitativa do ciprofloxacino nas micropartículas de PLGA (metodologia descrita no capítulo III). A Tabela 8 apresenta o teor de fármaco presente nas diferentes amostras.

Tabela 8. Efeito da carga de radiação utilizada no teor de ciprofloxacino incorporado nas micropartículas.

Amostra	**Teor de fármaco identificado para as diferentes amostras (% massa/massa)**				
	McCP	***McCP 5 kGy***	***McCP 10 kGy***	***McCP 15 kGy***	***McCP 25 kGy***
1	32,95082	30,44154	30,73799	33,64952	28,65903
2	32,58072	30,55488	32,04154	33,676	29,23959
3	32,31465	30,05301	31,6975	34,42005	29,09653
Média	**32,6154**	***30,34981****	***31,49235****	***33,91519****	***28,99839****
DP	**0,3195**	***0,263208***	***0,675561***	***0,437423***	***0,302467***
CV%	***0,98***	***0,867249***	***2,145158***	***1,289756***	***1,043049***

*Estatisticamente diferente das McCp não irradiadas (P<0,05)

Depois de submeter os dados à análise de variância (ANOVA), foi identificada diferença estatística entre os valores de teor de fármaco contido nas diferentes amostras. Após submeter os dados ao teste *post hoc* de Dunnet para confronto dos valores em relação ao grupo controle (McCp não expostas à radiação gama), foi identificada diferença estatística (p<0,05) para todas as amostras, indicando que a radiação gama provocou uma leve alteração no teor de fármaco contido nas micropartículas de PLGA. Não foi identificada qualquer relação entre as cargas de irradiação utilizadas com o teor de fármaco, embora este tenha sido mais considerável para a amostra submetida à carga de 25kGy.

A alteração do teor de fármaco pode indicar alguma degradação radiolítica do fármaco (MOHR et al., 1999; MONTANARI et al., 2002). Qualquer produto de degradação possivelmente formado poderia ser identificado na análise de CLAE, e com o objetivo de identificar possíveis alterações químicas do fármaco ocorridas depois da exposição das micropartículas às diferentes cargas de radiação gama, foi observado o perfil cromatográfico e espectro de absorção UV do fármaco obtidos nas análises quantitativas das diferentes amostras (Figura 20).

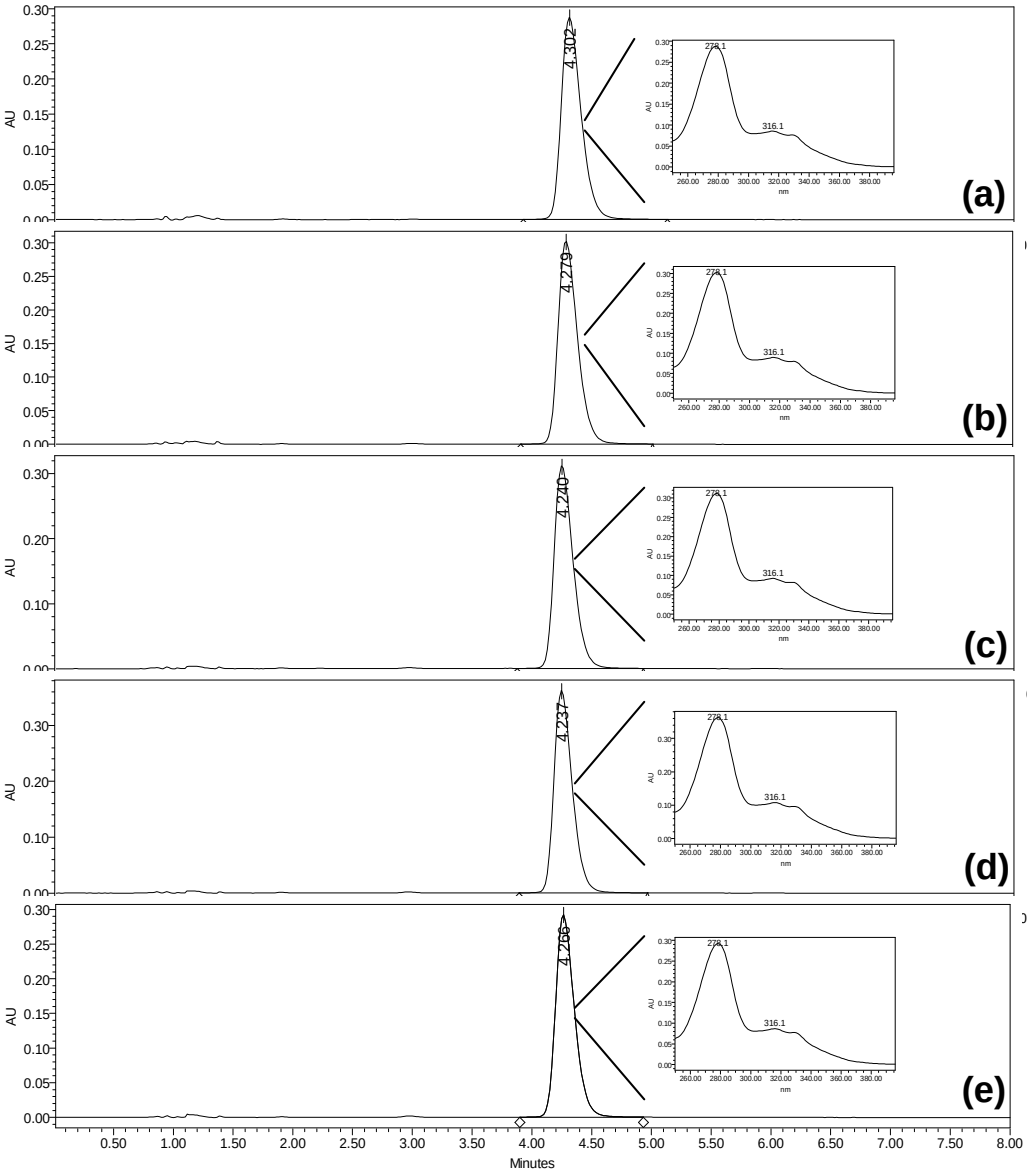

Figura 20. Perfil cromatográfico obtido das análises quantitativas do fármaco nas micropartículas de PLGA (A) antes e depois da exposição às cargas de radiação gama de (B) 5 kGy; (C) 10 kGy; (D) 15kGy e de (E) 25 kGy. Os "inserts" apresentam o espectro de absorção UV do fármaco.

Através da Figura 20 pode ser observado que as diferentes cargas de radiação gama estudadas não alteraram o perfil cromatográfico do ciprofloxacino incorporado nas micropartículas de PLGA. Não foi identificado o surgimento de qualquer pico relacionado a algum produto de degradação, indicando ausência de alguma degradação do fármaco ou possível não detecção do produto de degradação.

4.1.4. Análise de espectroscopia na região do infravermelho

A análise do teor de fármaco nas micropartículas revelou que a radiação gama alterou de forma estatisticamente significativa ($p<0,05$) o teor de ciprofloxacino presente nas micropartículas de PLGA após a exposição à radiação gama. No entanto não foi encontrada uma relação entre a carga de radiação gama utilizada e o teor de fármaco identificado na amostra e também não foi observada alteração do perfil cromatográfico do fármaco ou surgimento de qualquer produto de degradação após exposição à radiação gama. Com o objetivo de investigar qualquer alteração dos componentes das McCP depois da exposição à radiação gama foi realizada a análise de espectroscopia na região do infravermelho das diferentes amostras. A Figura 21 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ciprofloxacino e do PLGA.

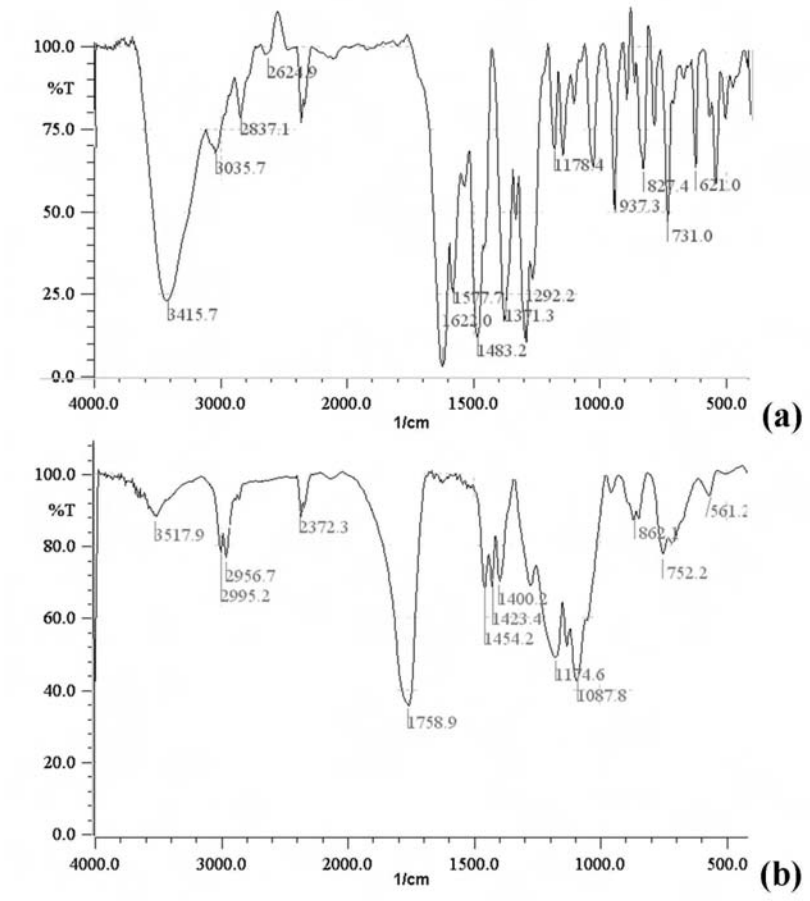

Figura 21. Espectros de absorção na região do infravermelho do (a) ciprofloxacino e do (b) PLGA.

O espectro de absorção na região do infravermelho do ciprofloxacino (Fig. 21a) apresenta as bandas características dos grupos funcionais OH de ácido carboxílico na região de 2500-3500cm^{-1}, amina terciária em 3415 cm^{-1}, deformação axial dos carbonos sp_3e sp_2 na região de 2900 cm^{-1}, estiramento CH_2-N em 2624cm^{-1}, ligações C=C de aromático em 1622, 1577 e 1483 cm^{-1} e o estiramento C-F na região de 1100-1300.

No espectro IV do PLGA (Fig. 21b), foi possível identificar a absorção de bandas de grupo OH de grupos carboxila terminais do polímero, do grupo funcional C=O éster em 1759cm^{-1}. Também foi possível identificar as bandas próximas à região de 2900-3000 cm^{-1} referentes à deformação axial de carbonos sp2 e sp3.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho pode fornecer informações importantes sobre a compatibilidade fármaco-excipiente ou favorecimento da ocorrência de reações entre as espécies químicas envolvidas durante ou após qualquer processo físico e tem sido utilizada em estudos de pré-formulação de sistemas de liberação e de medicamentos (SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JÚNIOR et al., 2008a;2008b).

A Figura 22 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho das McCP antes da exposição às diferentes cargas de radiação gama investigadas.

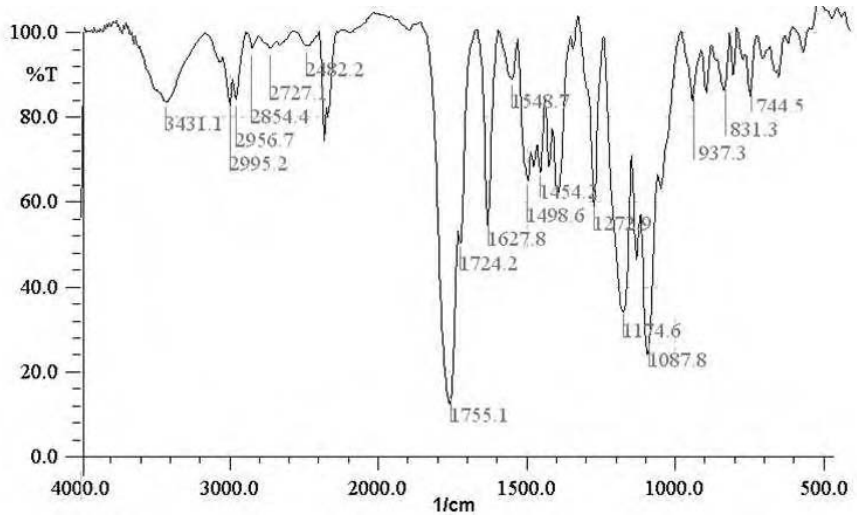

Figura 22. Espectros de absorção na região do infravermelho das McCP antes da exposição à radiação gama.

O espectro de absorção na região do infravermelho das McCP apresenta as bandas de absorção características do ciprofloxacino e do PLGA.

A Figura 23 apresenta os espectros de absorção das McCp depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

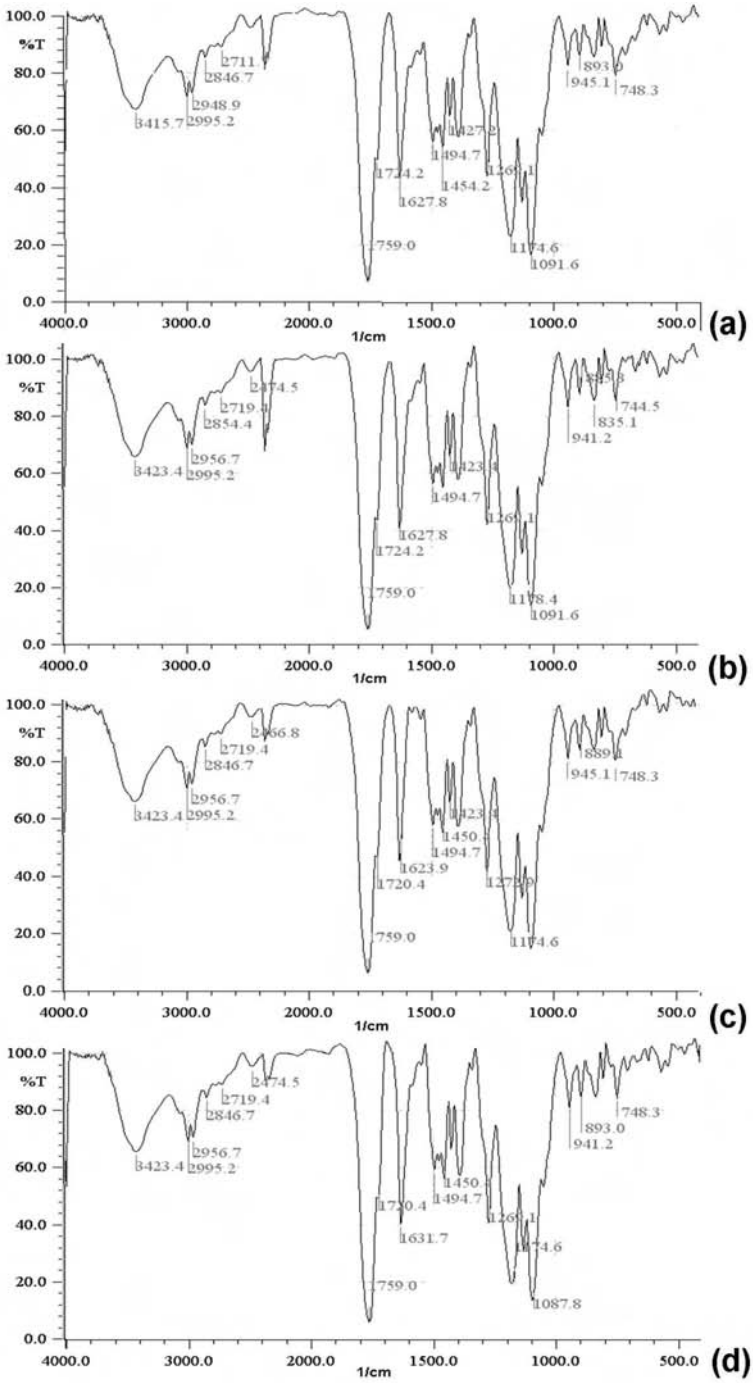

Figura 23. Espectros de IV das McCP depois da exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy, (b) 10kGy, (c) 15kGy e de (d) 25kGy.

As bandas de absorção referentes aos grupos funcionais do ciprofloxacino e do PLGA características nas McCp (Fig. 22), foram identificadas nos espectros das McCp depois da exposição às diferentes cargas de radiação (Fig. 23). Os resultados obtidos no presente estudo permitem observar a ausência da formação de qualquer espécie química nova após a exposição das McCp às cargas de radiação gama estudadas, sugerindo inicialmente que as cargas de radiação gama estudadas não provocaram alterações das espécies químicas envolvidas

4.1.5. Análise térmica

A manutenção da estabilidade química dos componentes estruturais das micropartículas após qualquer processo físico é de fundamental importância para a manutenção da capacidade dos fármacos em proporcionar o efeito farmacológico desejado. No entanto, no caso de sistemas poliméricos de liberação fármacos, a manutenção das propriedades físicas é essencial para garantir a segurança e eficiência na velocidade de liberação do fármaco encapsulado (SILVA-JÚNIOR, 2005; SILVA-JÚNIOR et al., 2008a; 2008b).

A análise espectroscópica na região do infravermelho não revelou alteração dos componentes das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino. A análise térmica das McCP foi realizada com o objetivo principal de caracterizar qualquer efeito da radiação na microestruturação da matriz polimérica, assim como a estabilidade térmica do material.

A Figura 24 apresenta as curvas termoanalíticas de DSC e ATG/DTG das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino antes da exposição à radiação gama.

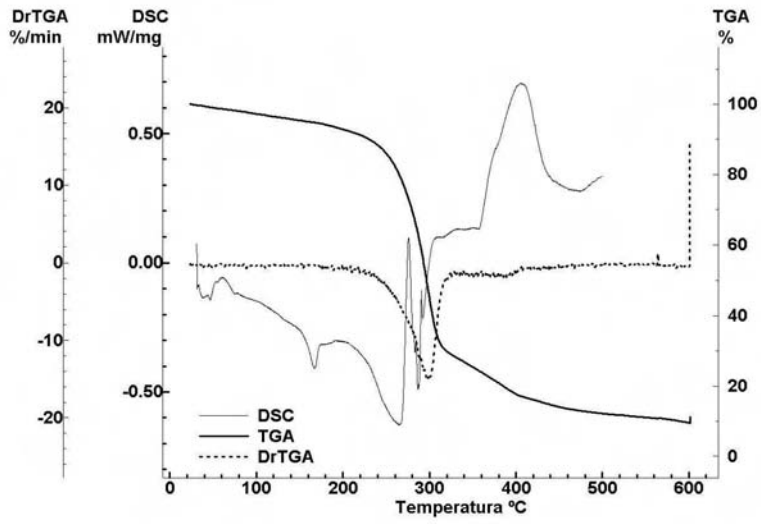

Figura 24. Curvas de DSC e ATG/DTG das McCP em atmosfera dinâmica de N_2 a 100 e 50mL.min^{-1} respectivamente, com razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}.

A partir da curva de DSC das McCP antes da exposição à radiação gama pode ser observado basicamente 4 eventos térmicos. Entre 43,9-51,2ºC (ΔH= -0,05mW/mg) ocorreu um evento de relaxação térmica devido à temperatura de transição vítrea (Tg) do PLGA. O primeiro evento endotérmico ocorreu entre 154,4 - 172,9ºC (Tmax= 167,3ºC; ΔH = -5,67J/g) provavelmente devido à eliminação de algum resíduo de ácido acético presente na matriz polimérica. O segundo evento endotérmico ocorreu entre 221,4 - 275,9ºC (Tmax= 264,8; ΔH= -114,8J/g) devido ao início da fusão do fármaco seguida rapidamente pelo início da decomposição térmica do material. O terceiro evento endotérmico ocorreu entre 275,9 - 301,6ºC (Tmax= 286,7; ΔH= -39,07J/g) devido à decomposição térmica do restante da massa polimérica seguida por uma série de eventos exotérmicos referentes à decomposição do material.

A partir das curvas de ATG/DTG foi possível observar que o primeiro evento de perda de massa ocorreu entre 211,1 - 321,8ºC (Δm = - 62,3%) e o segundo ocorreu entre 321,8-402,3ºC (de Δm= - 12,2%). Após este evento a decomposição térmica do material se processou lentamente com provável eliminação de material carbonáceo.

A Figura 25 apresenta as curvas termoanalíticas de DSC e ATG/DTG das McCP depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

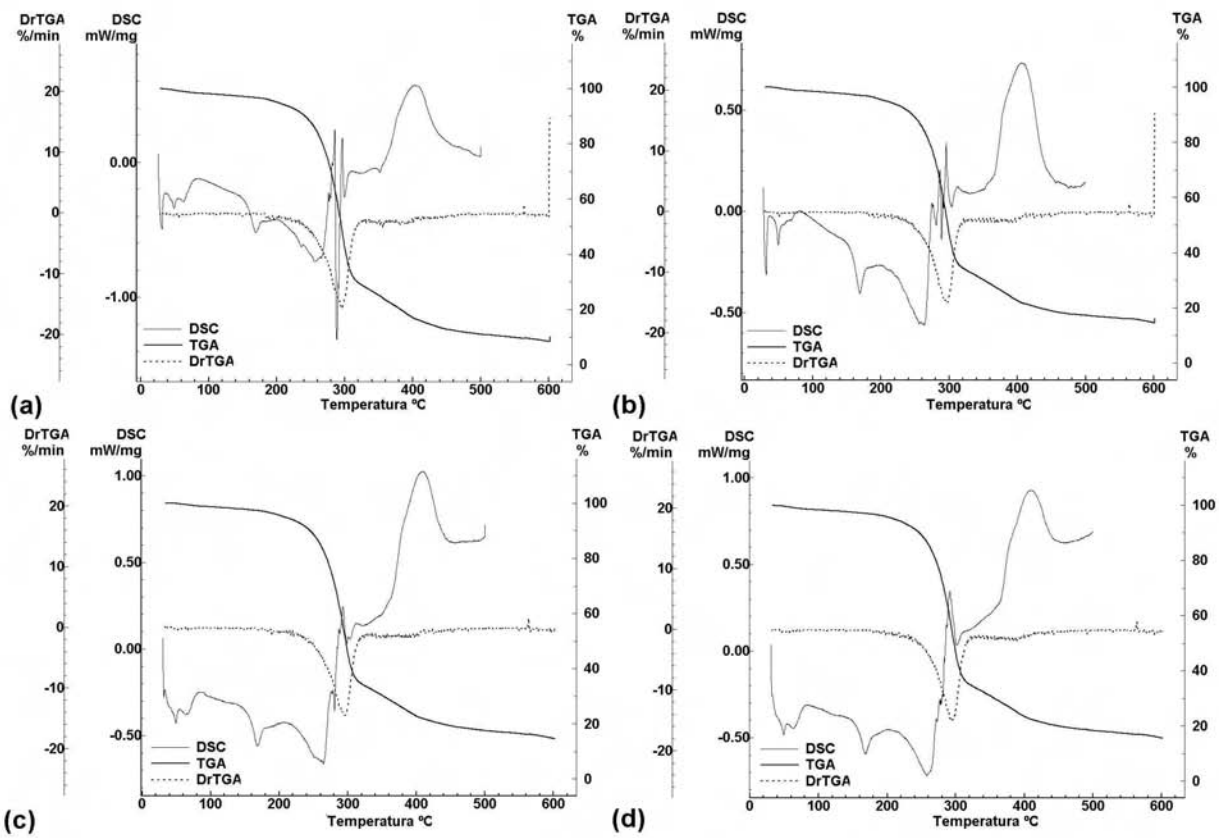

Figura 25. Curvas de DSC e ATG/DTG das McCp após a exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy, (b) 10kGy; (c) 15kGy e de (d) 25kGy obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 a 100 e 50mL.min^{-1} respectivamente, com razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}.

A partir das curvas termoanalíticas das McCp apresentadas na Figura 25, não foi identificado alteração do perfil termoanalítico depois da exposição das micropartículas às diferentes cargas de radiação gama investigadas. No entanto, foi verificada uma alteração da intensidade de energia envolvida nos eventos térmicos. Esta indicação pode ser melhor observada na Figura 26.

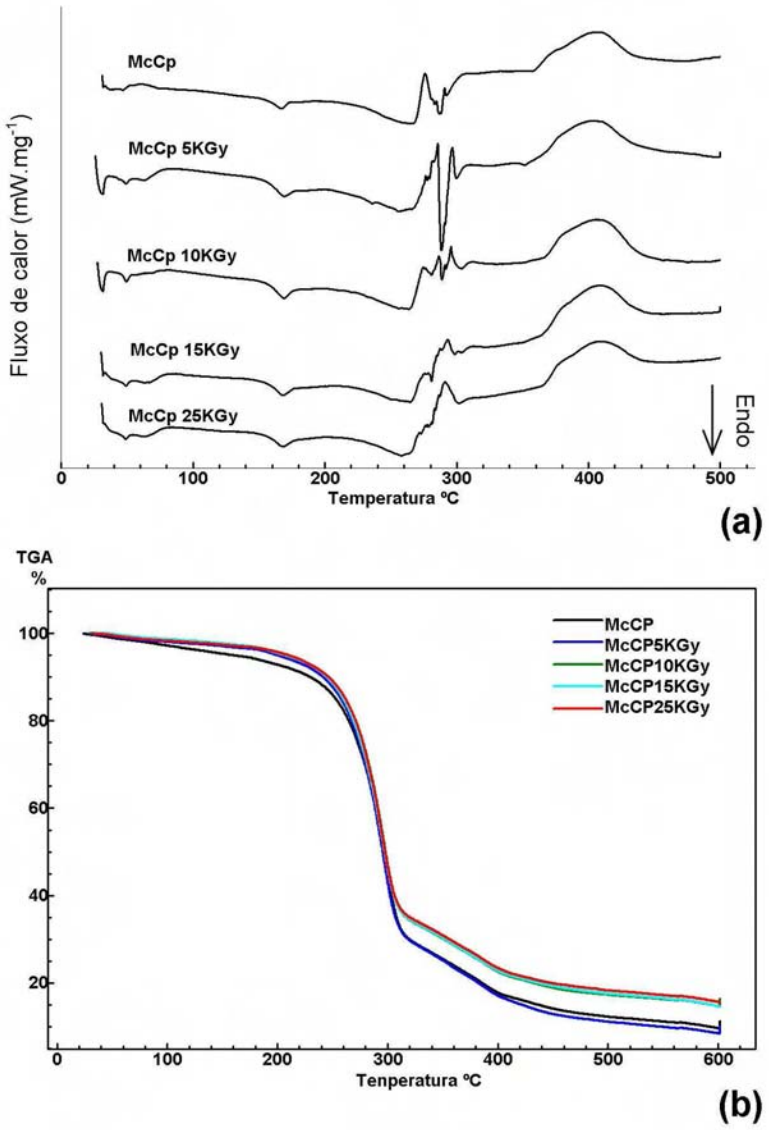

Figura26. Curvas termoanalíticas de (a) DSC e de (b) ATG/DTG das McCP antes e depois da exposição às diferentes cargas da radiação gama.

As técnicas de análise térmicas têm sido bastante utilizadas na determinação do efeito de excipientes (ROY et al., 2002; ARAÚJO et al., 2003), processos de microencapsulação (SILVA-JÚNIOR et al., 2008a; 2008b) e de processos de esterilização por radiação gama na estabilidade físico-química dos componentes da formulação (WOO et al., 1998; MONSHI et al., 1999; SULJOVRUJIĆ et al., 2007; MILICEVIC et al., 2007).

A manutenção do perfil termoanalítico dos componentes envolvidos em condições de estresse químico ou físico indica a ausência de alteração química ou física dos componentes durante o processo. A semelhança identificada entre o perfil termoanalítico das McCp antes e depois da exposição às diferentes cargas de radiação investigadas indica a ausência ou alteração mínima dos componentes estruturais.

Através da Figura 26a é possível observar sensíveis alterações nas curvas de DSC, especificamente na intensidade do terceiro evento endotérmico relacionado a processo de decomposição endotérmica de parte do material, nas amostras irradiadas com as cargas de radiação gama de 15 e 25 kGy, sugerindo que a carga de energia recebida pelo material durante o processo de exposição à radiação gama possa levar a diminuição da energia de ativação necessária para este evento, isto pode ser mais bem observado na Tabela 9.

Tabela 9. Estudo do efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (DSC) das McCp.

Amostra	***Evento 1***	***Evento 2***	***Evento 3***	***Evento 4***
McCp	43,9-51,2ºC -0,05mW/mg	154,4-172,9ºC Tmax= 167,3ºC ΔH = -5,67J/g	221,4-275,9ºC Tmax= 264,8ºC ΔH = -114,8J/g	275,9-301,6ºC Tmax= 286,7 ΔH = -39,07J/g
McCp 5kGy	44,9-52,9ºC -0,04mW/mg	155,6-177ºC Tmax= 169,3ºC ΔH = -7,86J/g	209,3-284,6ºC Tmax= 256,6ºC ΔH= -164,5J/g	284,9-296,9ºC Tmax = 288,3 ΔH= - 44,10J/g
McCp 10kGy	45,6-52,5ºC -0,04mW/mg	155,2-177,4ºC Tmax= 168,8ºC ΔH = -9,82J/g	217,9-273,5ºC Tmax= 263,5ºC ΔH = -91,10J/g	277-296ºC Tmax = 288,6 ΔH= - 15,41J/g
McCp 15kGy	45,2-52,3 -0,02mW/mg	154,7-177ºC Tmax= 168,9ºC ΔH = -8,64J/g	223,5-274,5ºC Tmax= 264,5ºC ΔH = -58,56J/g	278,8-309,5ºC Tmax= 280,8 ΔH = -6,7J/g
McCp 25kGy	42,5-51,9ºC 0,04mW/mg	155,2-179,5ºC Tmax = 168,7 ΔH = -10,14J/g	226,3-270,7ºC Tmax= 258,4 ΔH = -41,2J/g	291,1-308,7ºC Tmax = 302,02 ΔH = -9,27J/g

A análise dos dados indica que realmente não houve alteração da estabilidade térmica do material e esta alteração seria apenas na quantidade de energia (ΔH) envolvida durante o evento. O resumo dos dados obtidos na análise termogravimétrica está apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Estudo do efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (ATG/DTG) das McCp.

Amostras	***Evento 1***	***Evento 2***
McCp	211,1-321,8ºC Δm = - 62,3%	321,8-402,3ºC Δm = - 12,2%
McCp 5KGy	214,3-324,2ºC Δm = - 64,9%	324,2-431,7,3ºC Δm = - 14,9%
McCp 10KGy	216,3-323,7ºC Δm = - 60,4%	323,7-409,2ºC Δm = - 12,3%
McCp 15KGy	207,3-324,9ºC Δm = - 61,2%	321,8-402,3ºC Δm = - 12,2%
McCp 25KGy	211,1-321,8ºC Δm = - 62,3%	321,8-407 ºC Δm = - 11,9%

A análise dos dados apresentados na Tabela 10 permite estabelecer que as diferentes cargas de radiação gama não alteraram a estabilidade térmica das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino. Estes resultados sugerem que as sensíveis alterações observadas no estudo realizado por DSC estão relacionadas apenas à alteração da quantidade de energia envolvida no processo, pois qualquer espécie química nova provocaria possivelmente alterações relevantes nas curvas termogravimétricas.

4.1.6. Difração de Raios-X (DRX)

O estudo termoanalítico demonstrou que não houve alteração da estabilidade térmica das micropartículas após a exposição às diferentes cargas de radiação gama. Trabalhos anteriores demonstram que a alteração da intensidade de energia observada

durante alguns eventos térmicos pode está relacionada com a organização estrutural dos componentes na matriz polimérica (SILVA-JÚNIOR et al., 2008a; 2008b).

As análises de difração de raios-X foram realizadas com o objetivo de determinar o efeito das cargas de radiação gama na microestrutura das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino.

A Figura 27 apresenta o difratograma de raios-X obtido para o $_{D,L}$-PLGA 50:50.

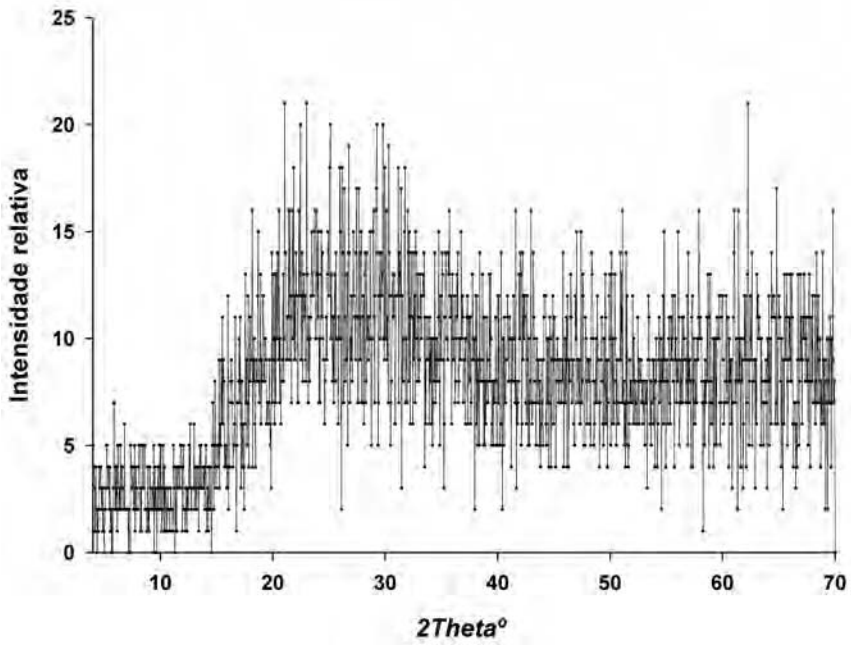

Figura 27. Difratograma de raios-X obtido para o $_{D,L}$-PLGA 50:50 em 2θ 4º<70º.

O PLGA é um copolímero sintético biodegradável que pertence ao grupo dos poliésteres alifáticos. Pode ser obtido pela co-polimerização do ácido poli lático (PLA) e do ácido poli glicólico (PGA) (UHRICH et al, 1999). De acordo com o tipo de PLA ($_{L}$-PLA ou $_{DL}$-PLA) podem ser originados os $_{L}$-PLGA e $_{DL}$-PLGA (WU, 1995).

O PLGA utilizado para a obtenção das McCP foi o $_{D,L}$-PLGA 50:50, que é um copolímero amorfo, característica esta que foi a apresentada nos estudos termoanalíticos na análise por DSC (Tab. 9) devido à ausência de pico de fusão e com *Tg* aproximadamente entre 43-53º. Esta característica pode ser confirmada através da observação do difratograma de raios-X do $_{D,L}$-PLGA 50:50 (Fig. 46), onde pode ser

observada uma banda larga de amorfização entre 10º e 40º, com ausência de qualquer pico característico de cristalinidade da amostra.

A Figura 28 apresenta difratograma de raios-X obtido para o ciprofloxacino.

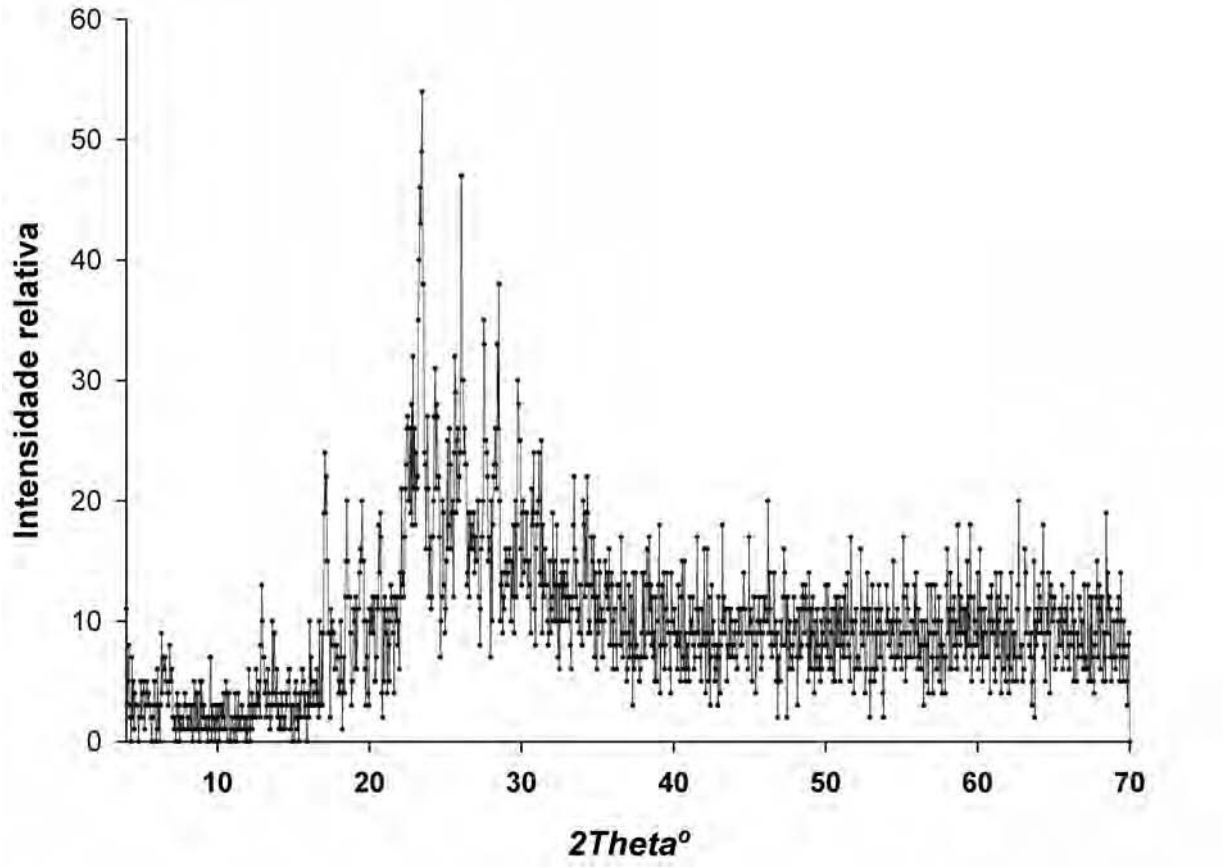

Figura 28. Difratograma de raios-X obtido para o ciprofloxacino em 2θ 4º<70º.

Estudos realizados por Li e colaboradores (2007) sobre a microestruturação do ciprofloxacino em fase sólida com diferentes excipientes mostram dois tipos de padrão de difração de raios-X para o ciprofloxacino, sendo um na forma hidratada e outro na forma anidra, que além de mais solúvel que o primeiro, quando em contato com a água converte-se na forma hidratada.

O difratograma de raios-X confirma que o fármaco utilizado no presente trabalho foi a forma anidra do ciprofloxacino, apresentando os picos característicos na região entre 2θ= 5-30º (LI et al., 2007).

A Figura 29 apresenta os DRX obtidos para as micropartículas de PLGA contendo ciprofloxacino antes e depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

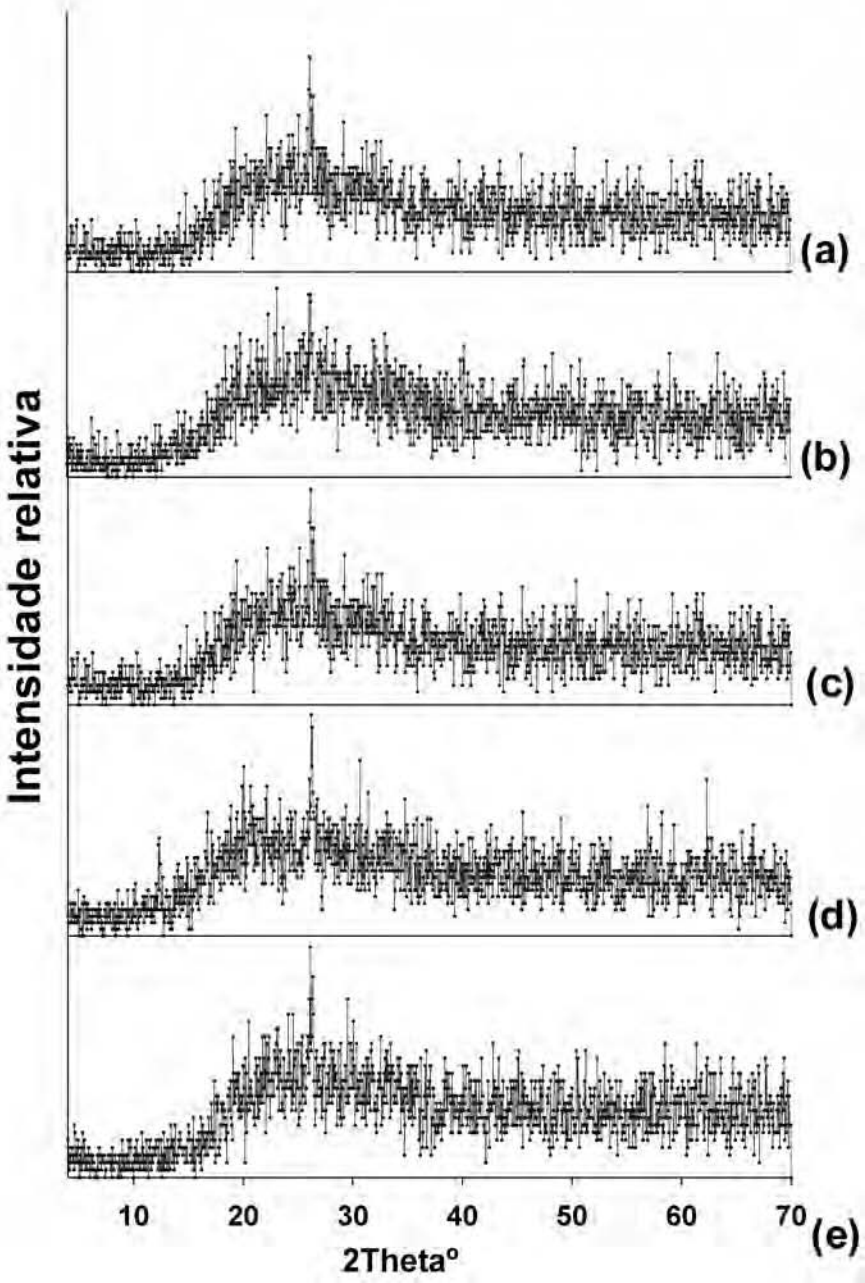

Figura 29. Difratogramas de raios-X obtidos para as (a) McCp; (b) McCp 5kGy; (c) McCp10kGy; (d) McCp15kGy; (e) McCp25kGy em 2θ 5º<75º.

Através das análises de DRX para as micropartículas após a exposição às diferentes cargas de radiação gama não foi possível identificar alterações relevantes no perfil de difração de raios-X, indicando que a microestrutura das micropartículas foi mantida, e o estado de agregação do fármaco na matriz polimérica foi mantido após a irradiação. Estes resultados podem ser mais bem observados através da Tabela 11.

Tabela 11. Resumo dos dados obtidos durante o estudo do efeito da radiação gama na microestrutura das McCP por DRX.

Região investigada em *2θ*	ciprofloxacino	McCP	McCP 5 kGy	McCP 10 kGy	McCP 15kGy	McCP 25kGy
≈ 6.5	7,0	3,0	6,0	5,0	4,0	3,0
≈ 6.85	8,0	4,0	7,0	5,0	5,0	4,0
≈ 12,9	13,0	5,0	5,0	6,0	7,0	5,0
≈ 13,6	10,0	8,0	7,0	6,0	7,0	5,0
≈ 17,2	15,0	15,0	12,0	9,0	14,0	10,0
≈ 18,5	20,0	11,0	20,0	13,0	13,0	11,0
≈ 19,5	20,0	19,0	18,0	14,0	19,0	14,0
≈ 22,85	32,0	23,0	22,0	14,0	18,0	17,0
≈ 23,45	54,0	18,0	18,0	15,0	16,0	17,0
≈ 26,05	47,0	29,0	28,0	28,0	24,0	24,0

É interessante observar que as diferentes cargas de radiação gama utilizadas não alteraram de forma relevante o perfil de difração de raios-X das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino, indicando a manutenção da microestruturação do sistema e confirmando os dados obtidos na análise térmica.

A manutenção das propriedades físico-químicas das micropartículas indica que a as condições investigadas durante a exposição das micropartículas não alteraram a estabilidade do sistema.

4.2. Efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas de PLGA obtidas por "spray drying" carregadas com triancinolona.

Os parâmetros operacionais utilizados para obtenção das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona foram estudados e padronizados em trabalhos anteriores (SILVA-JÚNIOR, 2005; SILVA-JÚNIOR et al., 2008b). O material particulado obtido foi um pó branco fino de aspecto morfológico e granulométrico uniforme, característica que foi confirmada através da análise morfológica e granulométrica das micropartículas.

4.2.1. Morfologia

A forma das partículas foi observada utilizando as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). A Figura 30 apresenta a imagem das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona (McTr) antes da exposição ao processo de radiação gama.

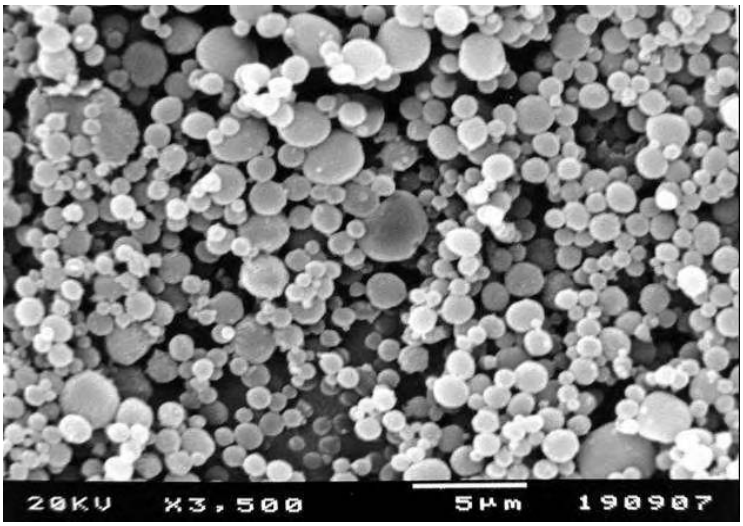

Figura 30. Imagem de SEM das McTr antes da exposição ao processo de radiação gama.

Assim como na obtenção das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino, as McTr foram obtidas com sucesso. As partículas apresentaram a forma

predominantemente esférica e de superfície aparentemente lisa. A manutenção destas características após o processo de exposição à radiação gama é de fundamental importância devido à uniformidade e velocidade de liberação do fármaco que o sistema pode fornecer.

Devido à importância biofarmacêutica da forma das partículas, foi realizado o estudo da forma das partículas depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama (Figura 31).

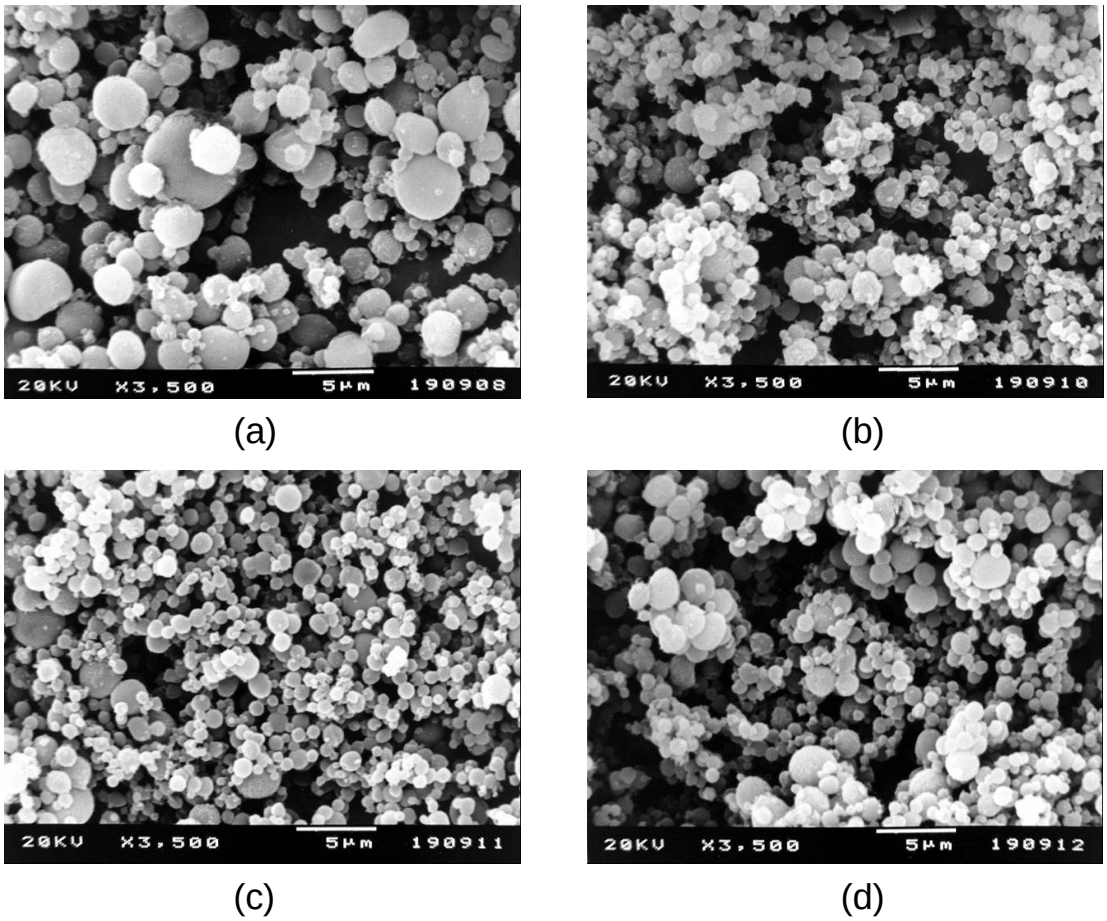

Figura 31. Imagens de SEM das McTr depois da exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy (b) 10kGy; (c) 15kGy e (d) 25kGy.

Assim como ocorreu com as McCP, a exposição às diferentes cargas de radiação gama não provocou alteração no aspecto e na forma das partículas. Todas as

amostras apresentaram núcleos particulados individualizados e de forma esférica, não apresentando qualquer agregação.

4.2.2. Análise do tamanho de partículas

A Figura 32 apresenta a distribuição do tamanho de partículas das McTr antes da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

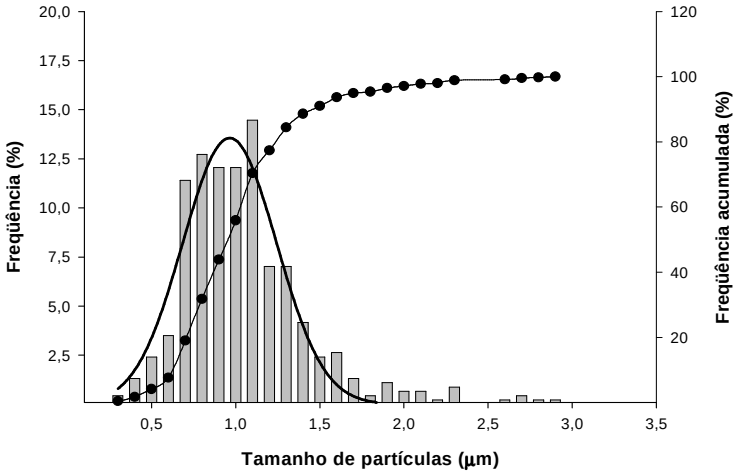

Figura 32. Distribuição do tamanho de partículas das McTr antes da exposição à radiação gama.

As McTr apresentaram o tamanho de partículas bastante reduzido com mais de 50% do material particulado com diâmetro de partícula $\leq$ 1,0 µm. As micropartículas apresentaram perfil de distribuição normal, com o material particulado compreendido entre 0,25 e 3,0µm e de 90% do material particulado compreendido entre 0,4 e 2,0µm.

Trabalhos anteriores têm demonstrado o efeito da radiação gama na morfologia e principalmente relacionado à agregação dos núcleos de micropartículas de PLGA carregadas com fármacos após a exposição à radiação gama, com a conseqüente alteração da distribuição do tamanho de partículas (MONTANARI et al., 1998; CALIS et al., 2002).

A Figura 33 apresenta a distribuição do tamanho de partículas das McTr depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

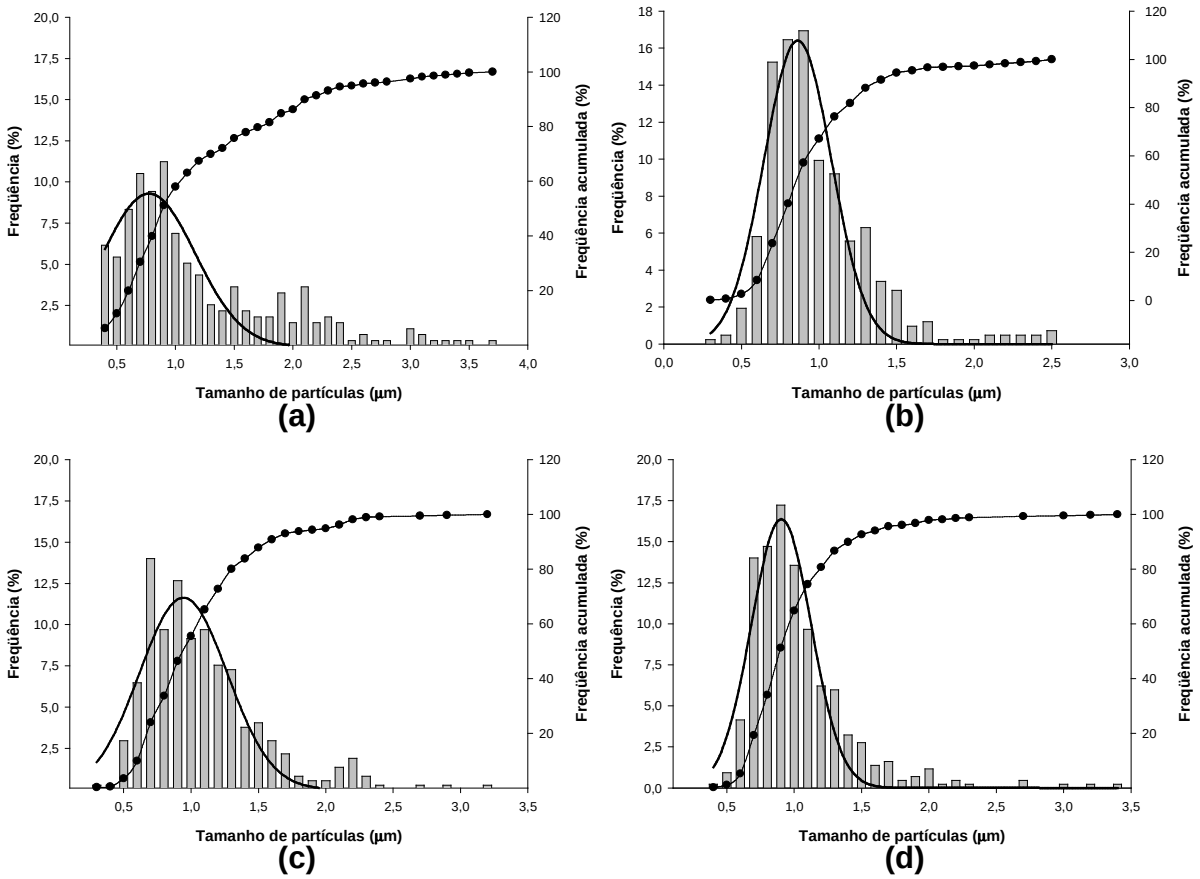

Figura 33. Distribuição do tamanho de partículas das McTr depois da exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy; (b) 10kGy; (c) 15kGy e de (d) 25kGy.

A análise do tamanho de partículas (Figura33) revelou que o perfil de distribuição normal foi mantido após a exposição à radiação gama. As amostras também apresentaram tamanho reduzido das partículas (mais de 50% do material particulado $\leq$ 1,0µm) com mais de 90% do material particulado compreendido entre 0,5 e 2,0 µm.

Estes resultados podem ser melhor observados através das medidas de tendência central calculadas para as McTr antes e depois da exposição à radiação gama (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito da radiação gama no tamanho das McTr.

Carga de radiação utilizada	Diâmetro médio (μm)	Diâmetro mediano (μm)	Diâmetro modal (μm)
Não irradiadas	1,04 ± 0,36	1,0	1,1
5kGy	1,18 ± 0,69	0,9	0,9
10kGy	0,98 ± 0,33*	0,9	0,9
15kGy	1,03 ± 0,38	0,9	0,7
25kGy	1,08 ± 0,43	1,0	0,9

*Estatisticamente diferente das McTr não irradiadas (P<0,05)

Além da forma das partículas e distribuição de tamanho de partículas, as diferentes amostras apresentaram valores diâmetro médio, medianos e modal muito semelhantes. Após submeter os dados à análise de variância (ANOVA) foi observada diferença estatística (*p*< 0,05) entre os valores de diâmetro de Feret*0* para as diferentes amostras. Após o teste *post hoc* de Dunn´s com confronto dos valores em relação ao grupo controle (McTr não irradiadas) foi observada que apenas as McTr submetidas à carga de radiação gama de 10kGy apresentaram diferença estatística na distribuição do tamanho de partículas (P<0,05). Não foi identificada qualquer correlação entre a carga de radiação utilizada e o diâmetro médio das micropartículas de PLGA carregadas com a triancinolona. Esta indicação pode ser observada na Figura 34.

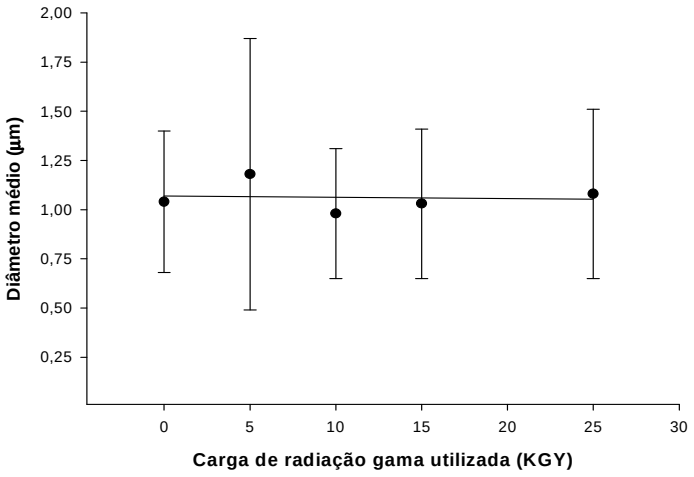

Figura 34. Efeito da radiação gama no diâmetro médio das McTr.

Qualquer alteração mais relevante na forma e no tamanho de partícula ocorrida durante a exposição das McTP ao processo de irradiação, possivelmente comprometeria a uniformidade e a velocidade de liberação do fármaco (MONTANARI et al., 1998; HERRERO-VANRELL et al., 2000; CALIS et al., 2002; MONTANARI et al., 2003). É conhecido que a área de superfície das partículas está diretamente relacionada à velocidade de dissolução que o sistema pode fornecer. Os resultados indicam que as cargas de radiação gama estudadas não provocaram alterações relevantes na granulometria do material.

4.2.3. Análise quantitativa do teor de triancinolona nas micropartículas

A análise quantitativa do teor de triancinolona incorporada nas micropartículas de PLGA depois da exposição às cargas de radiação gama investigadas foi realizada utilizando a metodologia CLAE específica desenvolvida e validada, conforme descrita no capítulo III. Os dados das análises quantitativas estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Efeito da radiação gama no teor de triancinolona incorporada nas micropartículas de PLGA.

Análise	**Teor de fármaco identificado para as diferentes amostras (% massa/massa)**				
	McTp	***McTp 5 kGy***	***McTP 10 kGy***	***McTp 15 kGy***	***McTp 25 kGy***
1	48,6635	49,0037	48,3031	46,3726	46,8985
2	48,6892	48,3459	50,6530	47,0632	45,6285
3	49,6351	48,6801	47,9231	46,9660	44,8968
Média	**48,9960**	***48,6766***	***48,9597***	***46,8006****	***45,8079****
DP	**0,5537**	***0,3289***	***0,1,4786***	***0,3738***	***1,0129***
CV%	***1,13***	***0,6757***	***3,0201***	***0,7988***	***2,2111***

*Estatisticamente diferente das McTr (P<0,05)

Após submeter os dados a uma análise de variância (ANOVA) foi observada diferença estatística ($p<0,05$) entre os valores de teor de fármaco analiticamente determinados para as McTr.

Após submeter os dados ao teste *post hoc* de Dunnet para confronto dos valores em relação às McTr não expostas à radiação gama, foi identificado que o teor de fármaco identificado para as McTr após a exposição às cargas de 15 e 25kGy foi estatisticamente menores ($p<0,05$), no qual assim como no estudo realizado com as McCP, este efeito foi mais considerável para a amostra submetida à carga de 25kGy.

A fim de identificar possíveis alterações químicas do fármaco ocorridas após a exposição das micropartículas a radiação gama ou formação de qualquer produto de degradação, foi investigada possíveis alterações no perfil cromatográfico do fármaco a partir das micropartículas de PLGA após a exposição às diferentes cargas de radiação (Figura 35).

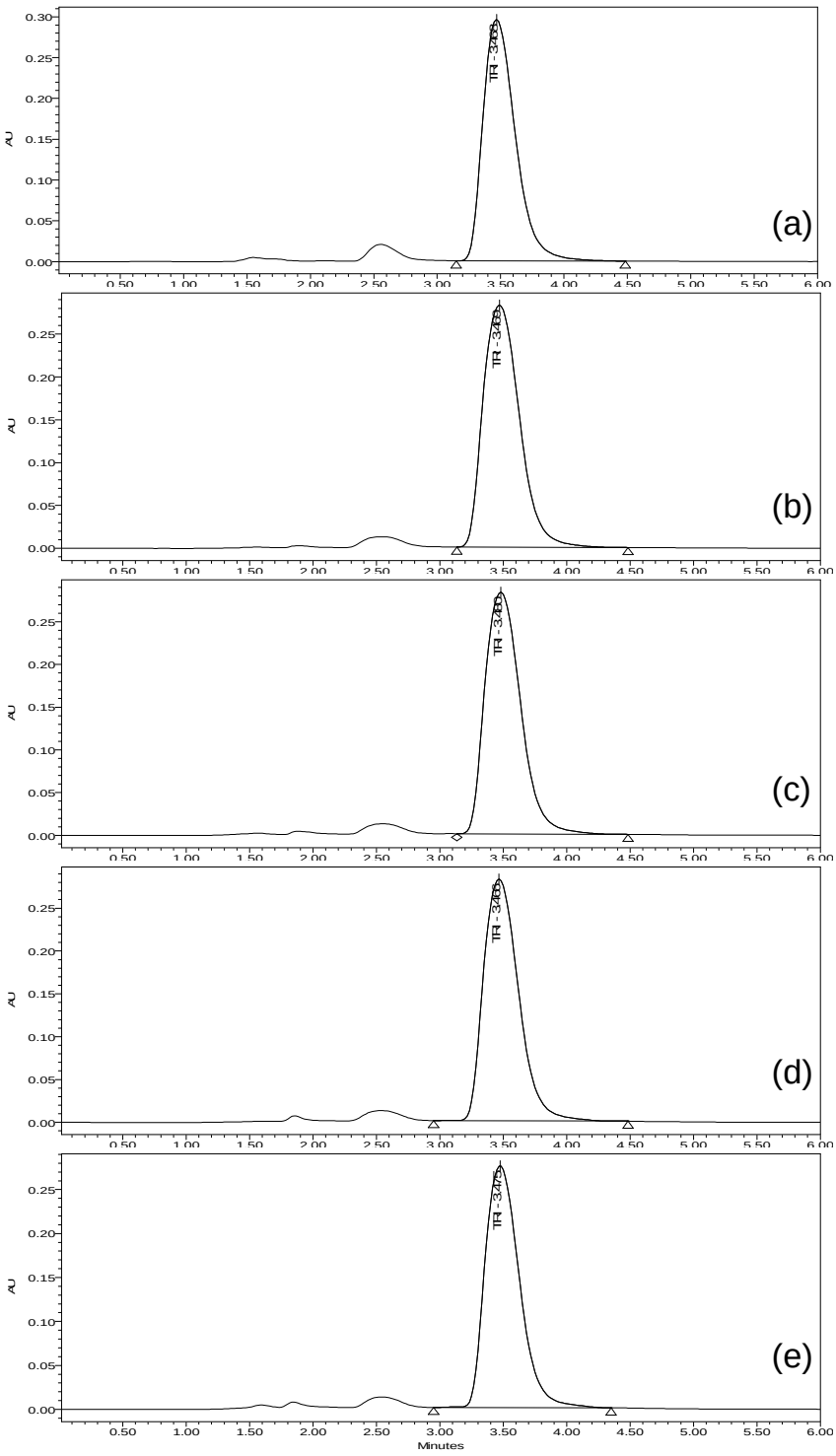

Figura 35. Perfil cromatográfico da triancinolona a partir das McTr na concentração de 25µg/mL (a) antes e depois de submetidas às cargas de radiação gama de (b) 5kGy; (c) 10kGy; (c) 15kGy; (e) 25kGy.

A partir da Figura 35 pode ser observado que as diferentes cargas de radiação gama investigadas não alteram o perfil cromatográfico da triancinolona contida nas micropartículas de PLGA. Assim como no estudo realizado com as McCP, não foi identificado o surgimento de qualquer pico de algum produto de degradação, indicando ausência de alguma degradação do fármaco após a exposição à radiação gama.

4.2.4. Análise espectrofotométrica na região do infravermelho

Assim como no estudo realizado com as McCP, foi realizada a análise de espectroscopia na região do infravermelho das diferentes amostras, com o objetivo de investigar qualquer alteração dos componentes das McTr depois da exposição à radiação gama. A Figura 36 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho (IR) da triancinolona e do PLGA.

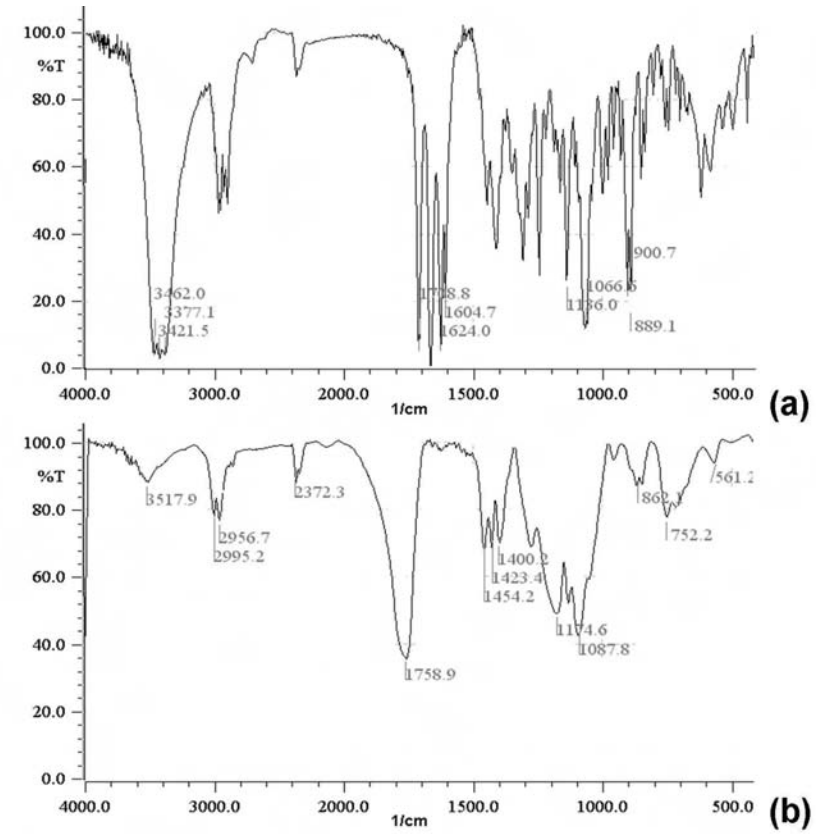

Figura 36. Espectros de absorção na região do infravermelho da triancinolona (a) e do PLGA (b).

O espectro IV de absorção na região do infravermelho da triancinolona apresenta as bandas características dos grupos funcionais OH em cerca de 3380-3462, C=O de cetona em 1708, ligações C=C presentes no anel do núcleo esteróide que absorvem em aproximadamente 1660 e 1620. As bandas próximas de 3000 e 2900 correspondem à deformação axial dos carbonos sp_3 e sp_2 respectivamente. A banda de absorção presente em 1200 corresponde à deformação da ligação CO.

No espectro IV do PLGA (Fig. 36b), foi possível identificar a absorção de bandas de grupo OH de grupos carboxila terminais do polímero, do grupo funcional C=O éster em 1759cm^{-1}. Também foi possível identificar as bandas próximas à região de 2900-3000 cm^{-1} referentes à deformação axial de carbonos sp2 e sp3.

Antes de realizar a análise espectroscópica na região do infravermelho das McTr após a exposição à radiação gama, foi obtido os espectros de IV das McTr antes da exposição à radiação gama (Figura 37).

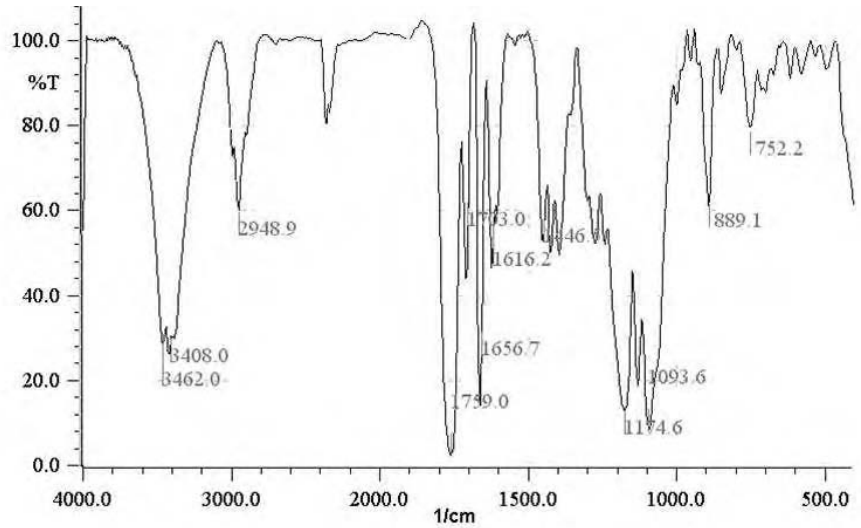

Figura 37. Espectros de absorção na região do infravermelho das McTr antes da exposição à radiação gama.

O espectro de absorção na região do infravermelho das McTr apresenta as bandas de absorção características da triancinolona e do PLGA.

A Figura 38 apresenta os espectros de absorção das McTr depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

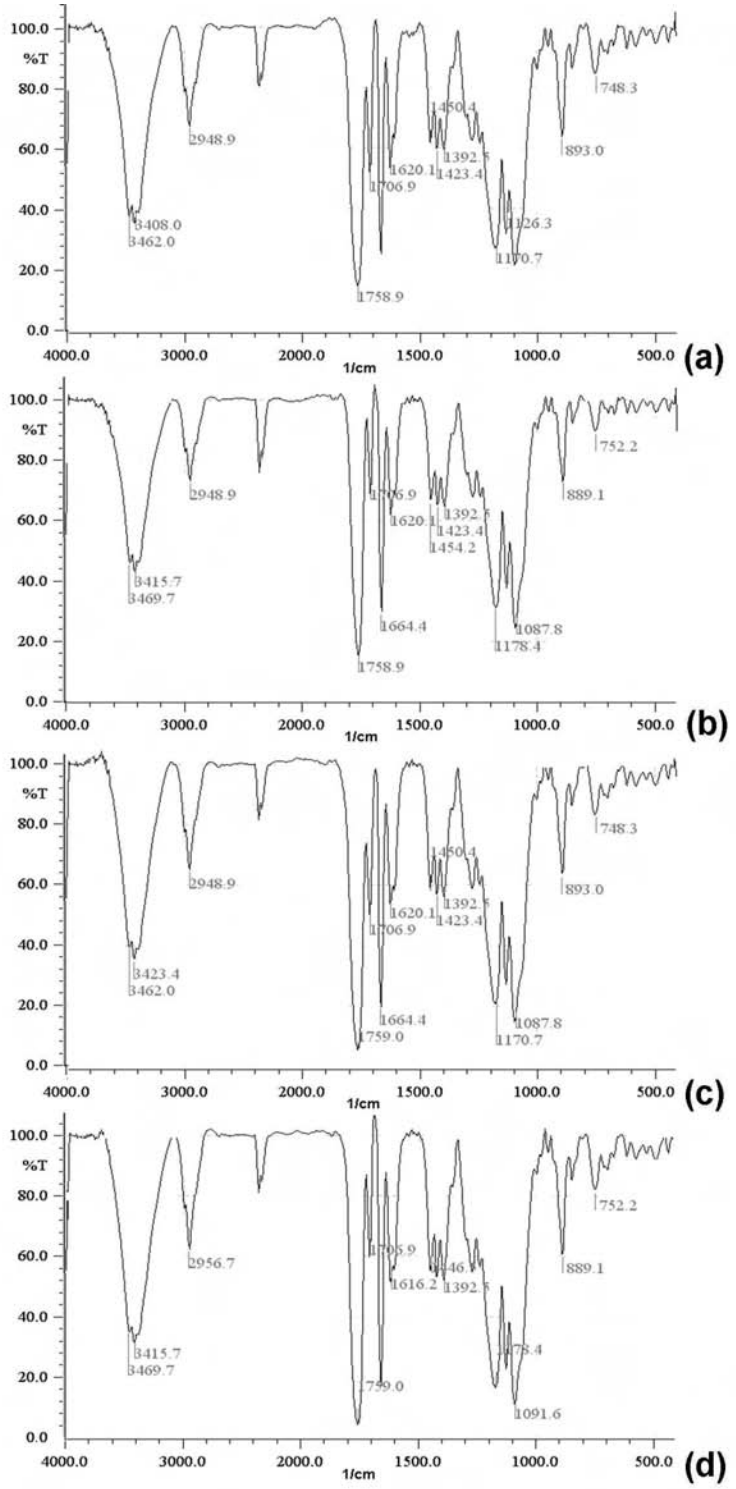

Figura 38. Espectros IR das McTr depois da exposição às cargas de radiação gama de (a) 5 kGy, (b) 10 kGy, (c) 15 kGy e de (e) 25 kGy.

As bandas de absorção referentes aos grupos funcionais do fármaco e do PLGA características das McTr (Fig. 37), foram identificadas nos espectros das McTr depois da exposição às diferentes cargas de radiação (Fig. 38). Os resultados obtidos no presente estudo permitem observar a ausência da formação de qualquer espécie química nova após a exposição das micropartículas às cargas de radiação gama estudadas, sugerindo inicialmente que as cargas de radiação gama estudadas não provocaram alterações das espécies químicas envolvidas.

4.2.5. Análise térmica

No presente estudo foram realizadas as análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC); análise termogravimétrica e termogravimetria derivada (ATG/DTG), para determinar o possível efeito das diferentes cargas de radiação gama investigadas na estabilidade térmica McTr ou possíveis alterações nas propriedades térmicas do material.

A Figura 39 apresenta as curvas termoanalíticas de DSC e ATG/DTG do PLGA.

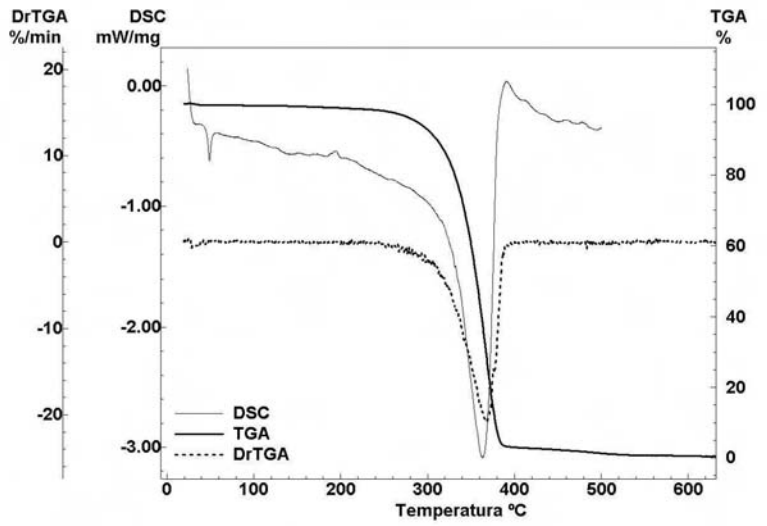

Figura 39. Curvas termoanalíticas de DSC e de ATG/DTG do PLGA em atmosfera dinâmica de N_2 a 100 e 50mL.min^{-1} respectivamente com razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}.

A partir da curva de DSC do PLGA é possível observar basicamente dois eventos térmicos. A transição vítrea do polímero, que ocorreu entre 45,5-52,4 com entalpia de relaxação de 0,05 $mW.mg^{-1}$ e a degradação predominantemente endotérmica do polímero, que ocorreu entre 309,2-381,0ºC (ΔH = 550,6 $J.g^{-1}$) com a perda de massa Δm= 90,1%.

A Figura 40 apresenta as curvas termoanalíticas de DSC e ATG/DTG da triancinolona.

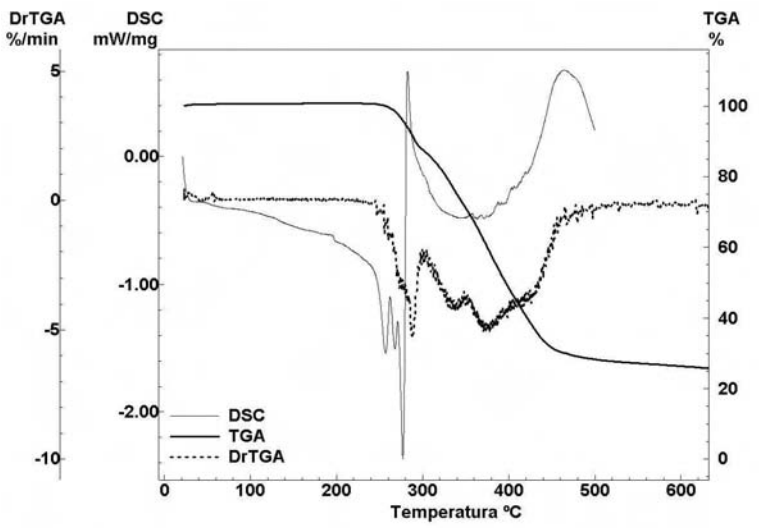

Figura 40. Curvas termoanalíticas de DSC e ATG/DTG da triancinolona em atmosfera dinâmica de N_2 a 100 e 50$mL.min^{-1}$ respectivamente com razão de aquecimento de 10ºC$.min^{-1}$.

A curva de DSC da triancinolona mostra inicialmente três picos endotérmicos ocorridos na região entre 242-280 característicos do polimorfo B (SUITCHMEZIAN et al., 2007). O primeiro ocorreu entre 242,7-262,1ºC (ΔH= -4.7$J.g^{-1}$), devido à transição para o polimorfo A, enquanto o segundo e o terceiro evento ocorridos entre 262,1-271 ºC (-1.5 $J.g^{-1}$) e 271,1-280ºC (-7.5 $J.g^{-1}$) deve-se à fusão do fármaco que foi rapidamente seguida pelo quarto evento endotérmico na faixa de 280,1-330,4ºC (- 37.1 $J.g^{-1}$) devido o início da decomposição do fármaco.

A partir das curvas ATG/DTG foi possível confirmar que a degradação térmica somente ocorreu após 265ºC dividido em duas etapas, na qual a primeira ocorreu entre

265-298.1 com a perda de massa de 12.3% e o segundo entre 298,2-468,3 com uma perda de massa de cerca de 58%.

A Figura 41 apresenta as curvas termoanalíticas de DSC e de ATG/DTG das McTr antes de serem expostas à radiação gama.

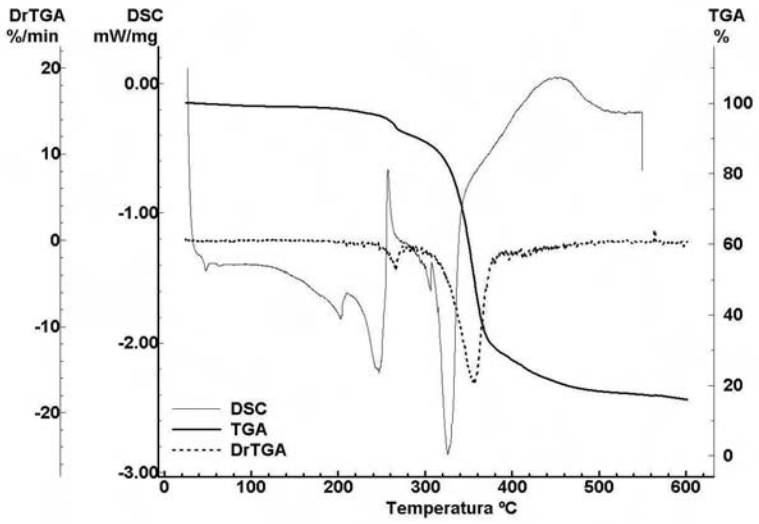

Figura 41. Curvas termoanalíticas de DSC e de ATG/DTG das McTr não irradiadas em atmosfera dinâmica de N_2 a 100 e 50mL.min^{-1} respectivamente com razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}.

A partir da curva de DSC das McTr antes da exposição à radiação gama é possível observar basicamente 5 eventos térmicos. A transição vítrea do PLGA ocorreu entre 44,1-51,2ºC (ΔH= -0,07mW.mg^{-1}). O primeiro evento endotérmico ocorreu entre 184,6-208,7ºC (Tmax= 203,2ºC; ΔH= -10,99J/g) provavelmente devido à transição para o polimorfo A enquanto a fusão do fármaco ocorreu entre 221,1-257ºC (Tmax= 247,2ºC; ΔH= -158,5J/g), seguida rapidamente pelo início da decomposição endotérmica do fármaco, seguida por um evento exotérmico de decomposição térmica do fármaco ocorrida entre 256,3 - 263,9ºC (Tmax= 257,1ºC; ΔH=+18,46J/g). É interessante ressaltar a ocorrência destes eventos em faixas de temperaturas mais baixas, quando comparadas ao fármaco puro, pois é comum quando em presença de polímeros que possuem a temperatura de transição vítrea/fusão muito baixa, como é o caso do PLGA ocorre a antecipação destes eventos (ARIAS et al., 1998; NAIMA et al., 2001; YAMASHITA et al., 2003; BIKIARIS et al., 2005; SILVA-JÚNIOR et al., 2008a; 2008b).

O quarto evento endotérmico ocorrido entre 292-342,3ºC (Tmax= 326ºC; ΔH= -223J/g) deve-se à decomposição endotérmica dos componentes das McTr, seguida por uma série de eventos exotérmicos referentes a decomposição do material.

A partir das curvas de ATG/DTG é possível observar que o primeiro evento de perda de massa ocorre entre 236,8-272,7ºC (Δm= -5,0%), devido ao início da decomposição do fármaco, seguida pela perda de Δm= -59,6% na faixa de 302,7 - 388,7ºC. O terceiro e último evento de perda de massa ocorreu entre 388,7 - 456,1ºC (Δm de -8,7%). Depois disso, decomposição térmica se processa lentamente com provável eliminação de material carbonáceo.

A Figura 42 apresenta as curvas termoanalíticas de DSC e de ATG/DTG das McTr depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

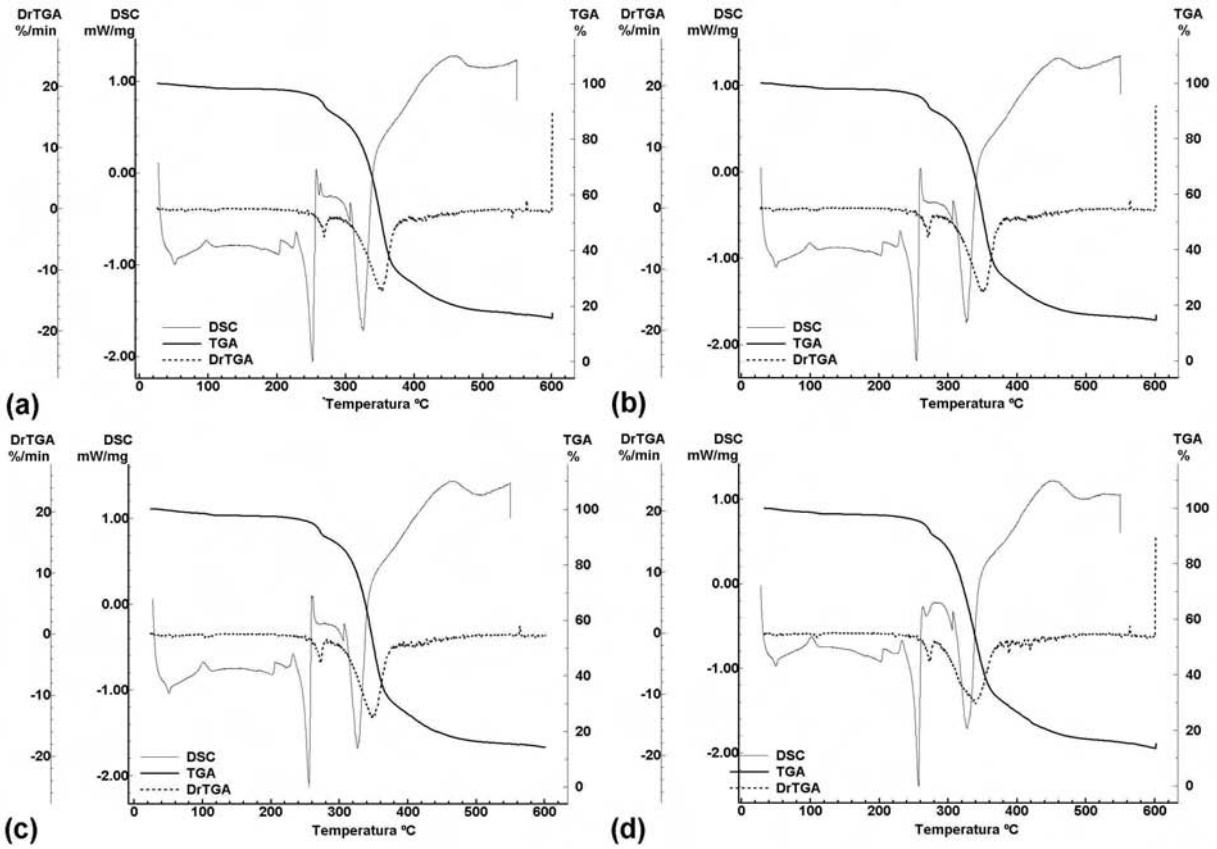

Figura 42. Curvas termoanalíticas de DSC e de TG/DTG das McTr depois da a exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy, (b) 10kGy; (c) 15kGy e de (d) 25kGy, obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 a 100 e 50mL.min^{-1} respectivamente, com razão de aquecimento de 10ºC.min^{-1}.

A partir das curvas termoanalíticas das McTr apresentadas na Figura 42 não é possível observar diferenças entre os perfis termoanalíticos das McTr irradiadas com as diferentes cargas de radiação gama investigadas. No entanto quando comparadas com àquelas apresentadas pelas McTr antes da exposição à radiação gama (Fig. 43), pode ser observada diferenças entre as curvas de DSC. Através da Figura 43, pode ser observado que as McTr apresentam curvas termogravimétricas muito semelhantes à amostra não irradiada (Fig.43b), no entanto nas curvas de DSC pode ser observado o surgimento um evento exotérmico na faixa de temperatura entre 91-112ºC (Fig. 43a).

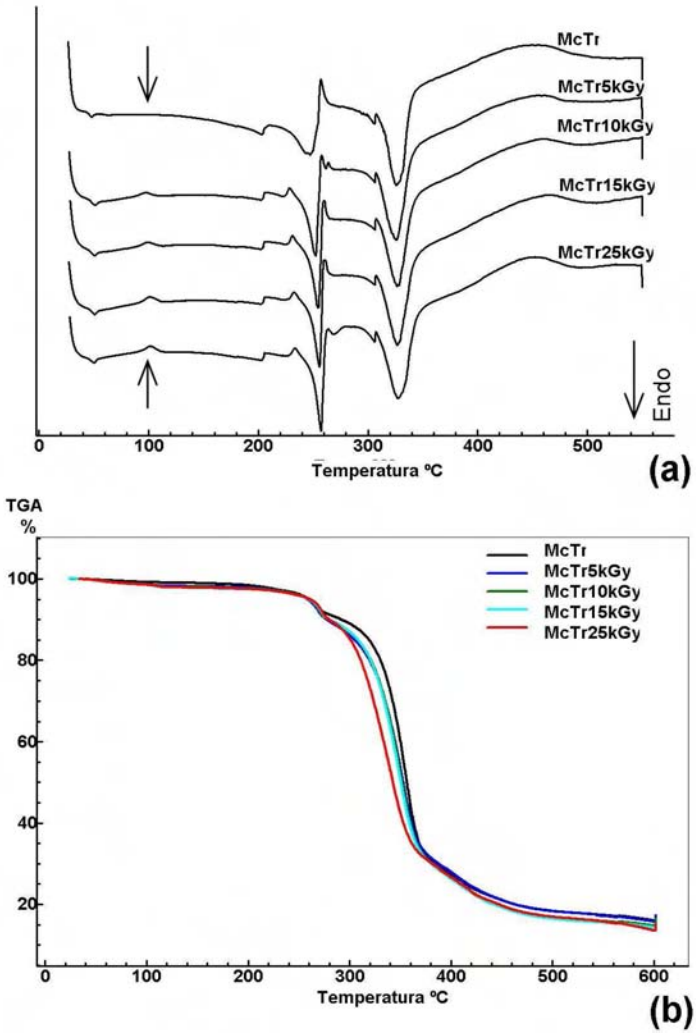

Figura 43. Curvas termoanalíticas de (a) DSC e de (b) ATG/DTG das McCP antes e depois da exposição às diferentes cargas da radiação gama.

O surgimento da transição de fase exotérmica entre 91-112º sugere alguma modificação na estruturação do sistema, ocorrida possivelmente depois da exposição à radiação gama. É possível identificar o tipo de transição de fase ocorrida nesta faixa de temperatura, através da observação detalhada do conjunto de dados obtidos nas análises de DSC (Tabela 14).

Tabela 14. Estudo do efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (DSC) das McTr.

Análises de DSC das diferentes Amostras

Ev	McTr	McTr 5kGy	McTr 10kGy	McTr 15kGy	McTr 25kGy
1º	44,14-51,20 - 0,07mW/mg	46,4 - 54,5ºC -0,11mW/mg	48 - 53,9ºC 0,12mW/mg	47,7-53,7 -0,08mW/mg	47,2-53,4 -0,04mW/mg
2º	----------	91,2 - 105,2ºC T_{max} = 97,1ºC ΔH= +2,70J/g	91,8 -108,7ºC T_{max} = 99,4ºC ΔH= +4,15J/g	91,3 - 111,7ºC T_{max} = 101,1ºC ΔH = +7,77J/g	89,0 - 112,2ºC T_{max} = 101,5ºC ΔH = +8,47J/g
3º	184,6-208,7ºC T_{max}= 203,2ºC ΔH= -10,99J/g	185,9-205,4 T_{max}= 203,0ºC ΔH= -6,43J/g	186,8-205,0ºC T_{max}= 202,9ºC ΔH= -1,85J/g	187,7-205,5ºC T_{max} = 202,3ºC ΔH = -5,42J/g	184,5-205,0ºC T_{max} =203,1ºC ΔH = -1,93J/g
4º	221,1-257ºC T_{max}=247,2ºC ΔH= -158,5J/g	227,9-257,7ºC T_{max} =252,3ºC ΔH= -143,7J/g	229,4-260ºC T_{max} =254,5ºC ΔH= -144,7J/g	231,9-259,8ºC T_{max} =255,6ºC ΔH = -140J/g	232,7-262,3ºC T_{max} = 257,2ºC ΔH= -125,7J/g
5º	256,3-263,9ºC T_{max}=257,1ºC ΔH=+18,46J/g	254,3-268,3ºC T_{max} = 257,7ºC ΔH= +24,33J/g	257,0-265,7ºC T_{max} = 260ºC ΔH= +30,2J/g	257,6-265,8ºC T_{max} = 259,8ºC ΔH = +23,45J/g	259,4-267,9ºC T_{max} = 263,9ºC ΔH = +39,1J/g
6	292-342,3ºC T_{max}= 326ºC ΔH= -223J/g	295,6-340,2ºC T_{max} = 326,1 ΔH= -194,3J/g	293,6-342,2ºC T_{max}= 326,7ºC ΔH= -191,1J/g	293-343ºC T_{max} = 323,5ºC ΔH= -200,8J/g	294,9-342,7ºC T_{max} = 328ºC ΔH= -192,2J/g

A análise dos dados de DSC (Tab. 14) permite estabelecer claramente o surgimento de um evento exotérmico na região de 91-112ºC.

Esta transição de fase pode estar associada a um processo de cristalização a frio "cold crystallization" do polímero possivelmente devido à alteração da razão amorfa/cristalina presente na matriz polimérica ocorrida após a exposição à radiação gama. Milicevic e colaboradores (MILICEVIC et al. 2007) obtiveram resultados semelhantes quando submeteram micropartículas de ácido poli lático (PLA) ao processo de radiação gama. No entanto esta hipótese está descartada, pois o PLGA utilizado para obtenção das McTr foi o $_{D,L}$-PLGA 50:50 que é amorfo.

A transição de fase ocorrida na faixa de (90-110ºC) parece está mais relacionada com o processo de recristalização de uma parte amorfa ou menos ordenada do fármaco possivelmente formada durante a exposição à radiação gama. O aumento da intensidade de energia (ΔH) envolvida durante este evento exotérmico ocorrido de acordo com a carga de radiação gama utilizada, indica que a formação desta fase amorfa/menos ordenada provavelmente ocorreu após a exposição da amostra à radiação gama. Esta relação está apresentada na Figura 44.

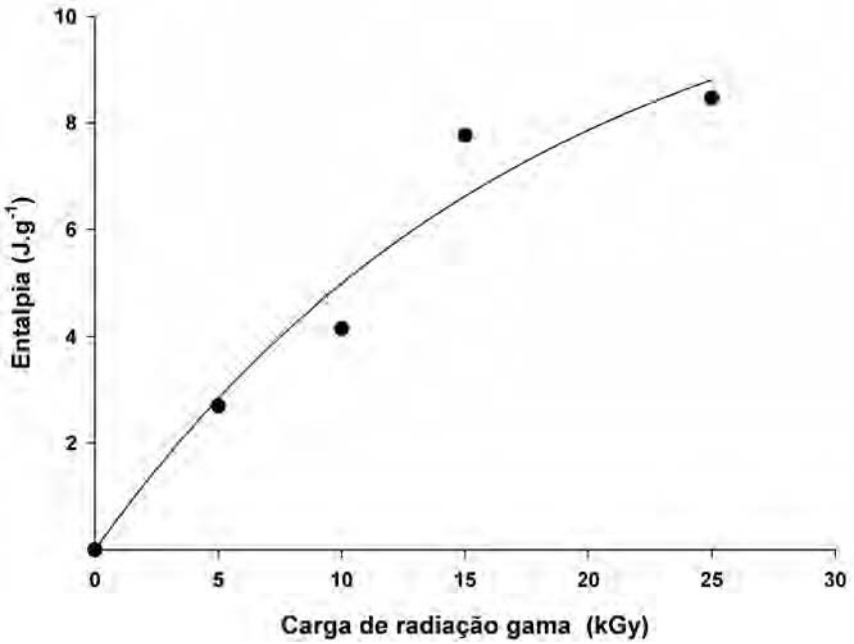

Figura 44. Representação gráfica da relação existente entre a carga de radiação gama utilizada e entalpia de recristalização do fármaco.

O aumento da intensidade de energia (ΔH) durante o evento está relacionado possivelmente com a maior formação desta fase amorfa/menos ordenada conseqüente do o aumento da carga de radiação gama utilizada. À medida que aumenta a intensidade do evento de recristalização do fármaco, espera-se que ocorra também o aumento da organização do material dentro da célula de DSC, o que provavelmente também aumentaria o estado de organização do material. Esta indicação pode ser observada na Figura 45.

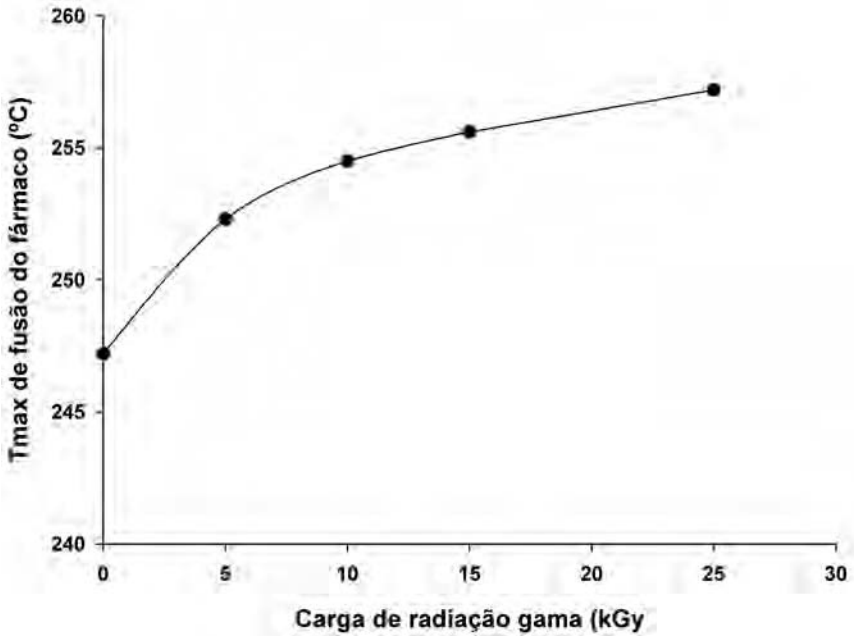

Figura 45. Representação gráfica da relação existente entre a carga de radiação gama utilizada e a temperatura máxima (Tmax) de fusão do fármaco presente nas micropartículas de PLGA.

O aumento da intensidade de energia identificada durante a transição de fase ocorrida na faixa de (90-110ºC) (Fig.45), indica a recristalização de uma maior quantidade de moléculas amorfas ou menos ordenadas de fármaco formadas provavelmente durante o processo de irradiação. Após o processo de recristalização ocorrida dentro da célula de DSC leva ao aumento da organização estrutural do material, justificando assim o aumento da temperatura de fusão do fármaco presente na matriz polimérica (Fig. 45).

O resumo dos dados obtidos na análise termogravimétrica (ATG/DTG) das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona está apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Estudo do efeito da radiação gama no perfil termoanalítico (ATG/DTG) das McTr.

Análises de ATG/DTG das diferentes amostras

Ev	McTr	McTr5KGy	McTr10 KGy	McTr15 KGy	McTr25 KGy
1º	236,8-272,7ºC Δm = - 5,0%	236,7-278,0ºC Δm = - 6,9%	248,2-277,9ºC Δm = - 5,8%	252,9-280,2ºC Δm = - 5,9%	251,6-281,4ºC Δm = - 6,0%
2º	302,7-388-7ºC Δm = - 59,6%	297-379,2ºC Δm = - 55,3%	303,0-380,7ºC Δm = - 56,1%	293,8-390,4ºC Δm = - 60,2%	285,5-378,8ºC Δm = - 58,5%
3º	388,7-456,1ºC Δm = - 8,7%	379,2-432,5ºC Δm = - 8,9%	380,7-449,0ºC Δm = - 10,8%	390,4-456,1ºC Δm = - 9,4%	321,8-446,7ºC Δm = - 10,7%

A análise dos dados da análise termogravimétricas das McTr (Tabela 15) permite observar que assim como foi observado nas McCP, a radiação gama não alterou o perfil termogravimétrico das McTr, indicando que não houve alteração da estabilidade térmica do material.

O presente estudo permitiu observar que a radiação gama provocou alguma mudança na estruturação do material e foi possível estabelecer uma relação entre o nível de estruturação das micropartículas e a carga de radiação gama utilizada.

4.2.6. Difração de Raios-X (DRX)

O estudo termoanalítico fornece apenas uma indicação da estruturação do fármaco na matriz polimérica, indicando que o processo de irradiação gama pode ter provocado uma leve mudança no nível de estruturação. A relevância desta indicação pode ser perfeitamente respondida através da realização de análises que forneçam informações sobre a microestrutura das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona.

As análises de difração de raios-X foram realizadas com o objetivo de caracterizar o efeito da exposição das McTr as diferentes cargas de radiação gama investigadas na microestrutura das micropartículas.

A Figura 46 apresenta o difratograma de raios-X obtido para o $_{D,L}$-PLGA 50:50.

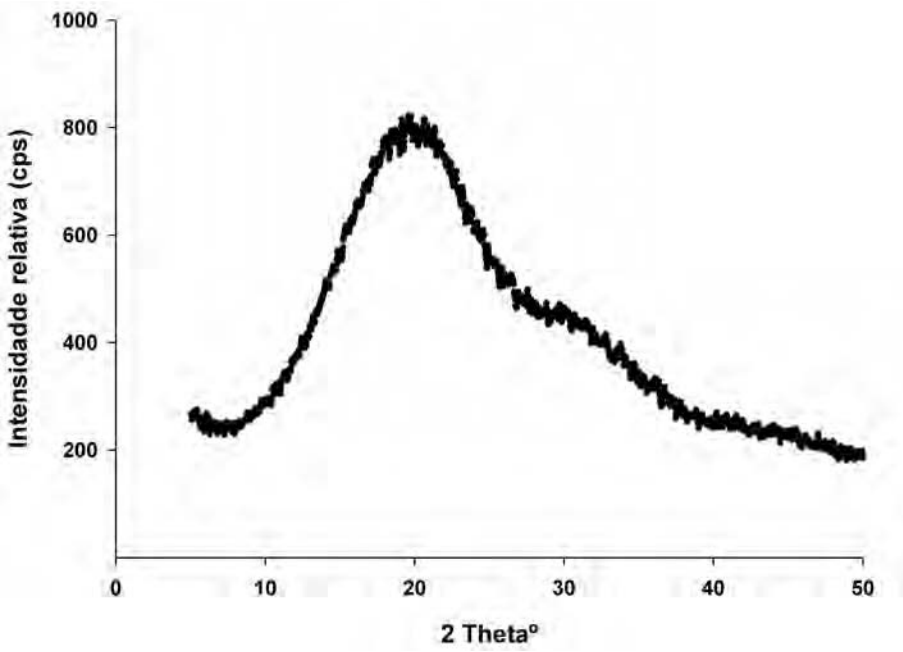

Figura 46. Difratograma de raios-X obtido para o $_{D,L}$-PLGA 50:50 em 2θ 5º<50º.

Como descrito no estudo realizado com as micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino anteriormente, a rota de síntese do PLGA pode conduzir a formação da forma $_{L}$-PLGA e $_{DL}$-PLGA (WU, 1995; URICH et al., 1999). O PLGA utilizado para a obtenção das McTr foi o $_{D,L}$-PLGA 50:50, que é um co-polímero amorfo, característica esta que foi apresentada na análise por DSC, devido ausência de pico de fusão e com temperatura de transição vítrea entre 45,2-52,3º. Esta característica pode ser confirmada através da observação do difratograma de raios-X do $_{D,L}$-PLGA 50:50 apresentado na Figura 46, onde pode ser observada uma banda larga, entre 10º e 40º, característica de sistemas não cristalinos.

A Figura 47 apresenta difratograma de raios-X obtido para a triancinolona.

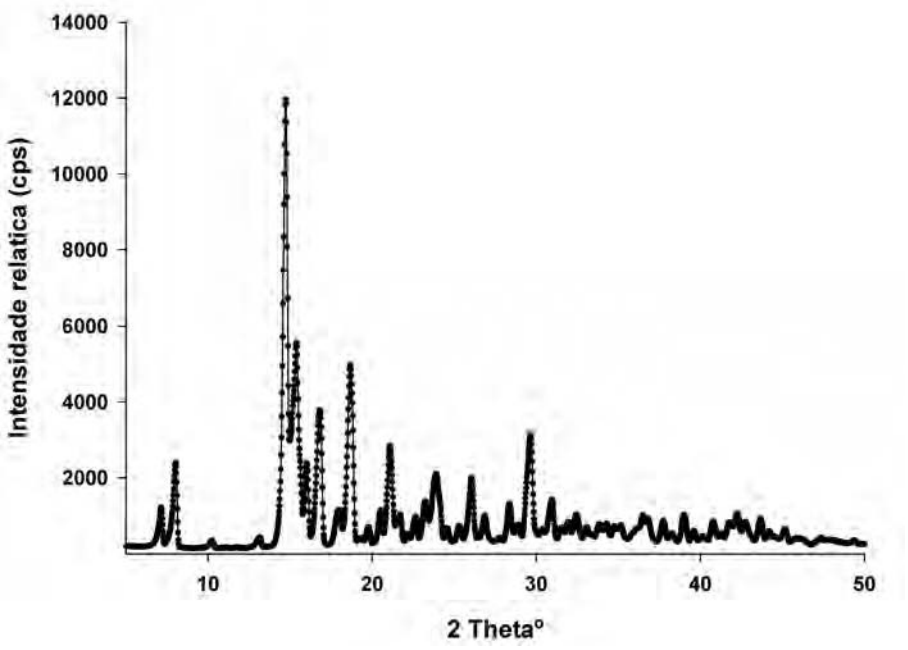

Figura 47. Difratograma de raios-X obtido para a triancinolona em 2θ 5º<50º.

Em estudos realizados por Suitchmezian e colaboradores (2006) demonstram a identificação e caracterização de dois polimorfos (forma A e forma B) e uma forma monohidratada (forma C) para a triancinolona, quando obtida em diferentes sistemas solventes.

O difratograma de raios-X obtido para a triancinolona apresentado na Figura 47 confirma os resultados obtidos na análise térmica. Os picos de cristalinidade identificados em 7,08º e 8,00º são característicos da forma B, (SUITCHMEZIAN et al., 2006). A identificação do tipo de polimorfo presente na matriz polimérica é determinante para as propriedades biofarmacêuticas que o sistema pode apresentar.

A Figura 48 apresenta os DRX obtidos para as micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona antes e depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

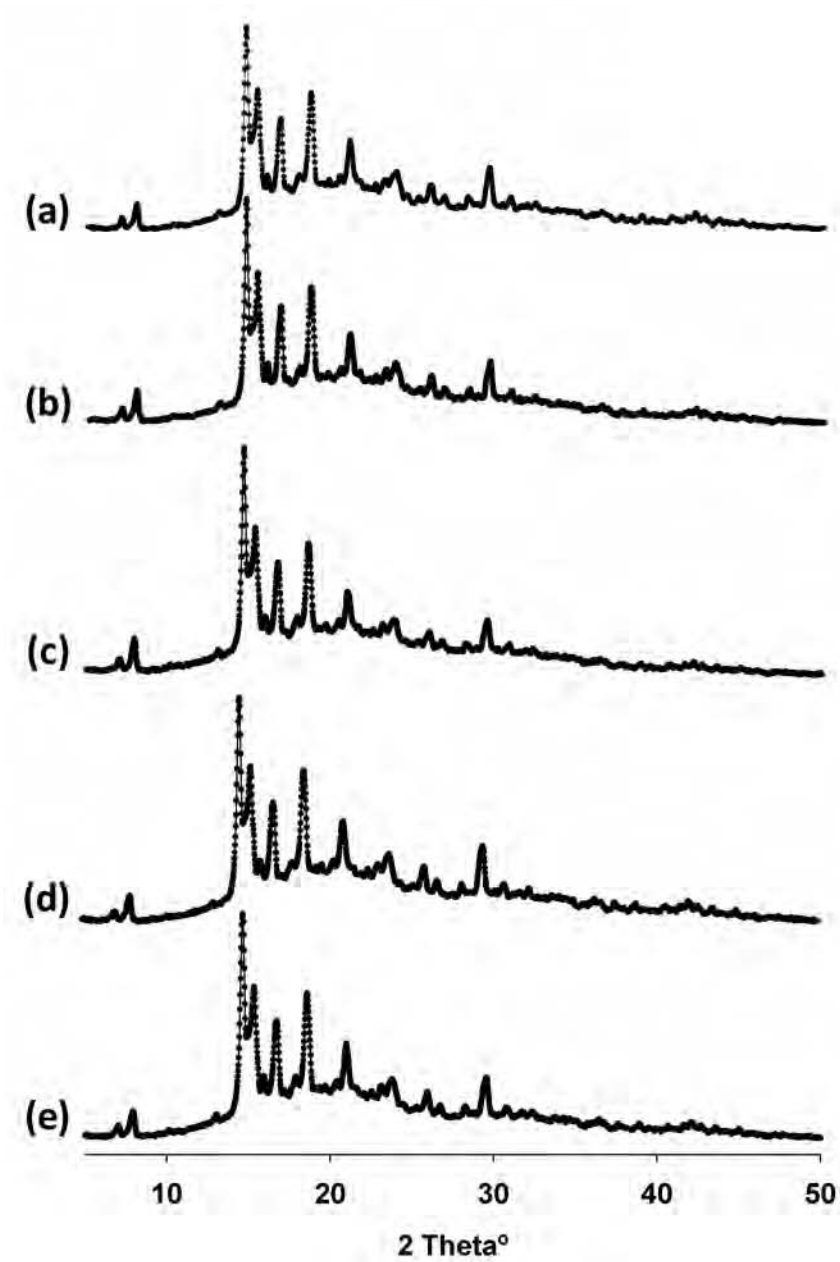

Figura 48. Difratogramas de raios-X obtidos para as (a) McTr; (b) McTr5kGy; (c) McTr10kGy; (d) McTr15kGy; (e) McTr25kGy em 2θ 5º<75º.

Os resultados obtidos nas análises de DRX para as McTr depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama indicam que não ocorreram alterações relevantes na microestrutura das micropartículas, não ocorreu qualquer transição polimórfica ou outra alteração relevante no estado de agregação do fármaco na matriz polimérica depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

A Tabela 16 apresenta o resumo dos dados obtidos no estudo de DRX das McTr.

Tabela 16. Resumo dos dados obtidos durante o estudo do efeito da radiação gama na microestrutura das McTr por DRX.

	Intensidade relativa em 2 Thetaº (cps)					
Amostra	**~7,08º**	**~8,00º**	**~14,7º**	**~18,66º**	**~21,04º**	**~29,58º**
McTr	378	561	2905	2032	1401	1041
McTr5kGy	367	568	2742	1747	1210	901
McTr10kGy	366	605	2755	1679	1127	804
McTr15kGy	345	526	2769	1946	1370	1087
McTr25kGy	384	572	3186	2137	1469	1019

A manutenção da microestruturação do sistema após a exposição à radiação gama implica na manutenção das propriedades biofarmacêuticas do sistema de liberação, garantindo a segurança e eficácia para o uso pretendido.

Os estudos realizados para determinar o efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas de PLGA contendo a triancinolona indicam que a radiação gama pode ser utilizada como técnica de esterilização terminal para as McTP, nem mesmo a maior carga de radiação investigada (25kGy) proporcionou alterações que comprometessem a estabilidade química ou mesmo a estruturação do fármaco dentro da matriz polimérica.

Qualquer alteração química dos componentes das McTr possivelmente provocaria alguma alteração em suas propriedades físicas, as quais teriam sido reveladas nos estudos anteriores realizados, no entanto isto não exclui a necessidade de determinar o perfil de liberação in vitro do fármaco a partir das micropartículas.

4.2.7. Efeito da radiação gama na velocidade de liberação in vitro da triancinolona contida em micropartículas de PLGA

Os estudos anteriores realizados indicam que as cargas de radiação gama investigadas não provocaram alterações relevantes na estabilidade química ou física das micropartículas.

Para garantir a eficiência da liberação prolongada da triancinolona a partir das micropartículas de PLGA depois da exposição à radiação gama, é fundamental conhecer o real efeito deste processo na qualidade da liberação que o sistema pode fornecer. Para verificar esta característica, foram realizados os estudos de liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas antes e depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama. Antes disso, foi construída a curva padrão do fármaco para posterior determinação da concentração de fármaco no meio de liberação (Figura 49).

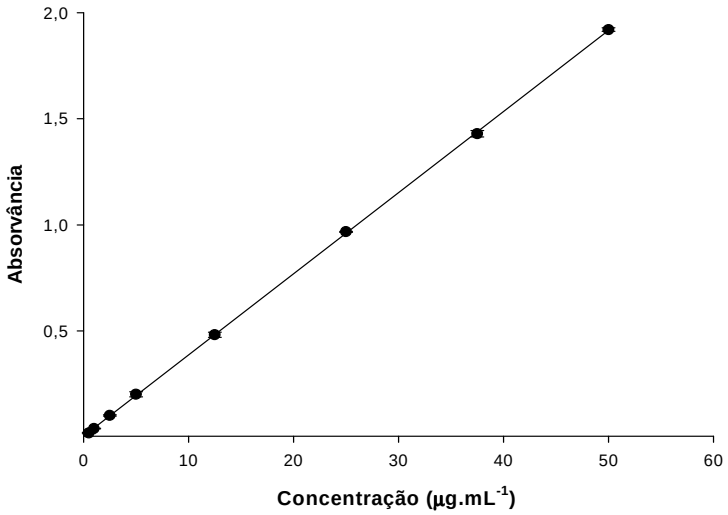

Figura 49. Curva padrão da triancinolona em tampão Tris-HCl (pH= 7,4 0,01M) obtida por espectrofotometria de UV em 242nm.

A equação linear representativa extraída da curva padrão foi Y = 0,03823x - 0,00525 (r^2 = 0,999).

A Figura 50 apresenta o perfil de liberação da triancinolona a partir das micropartículas de PLGA antes da exposição à radiação gama.

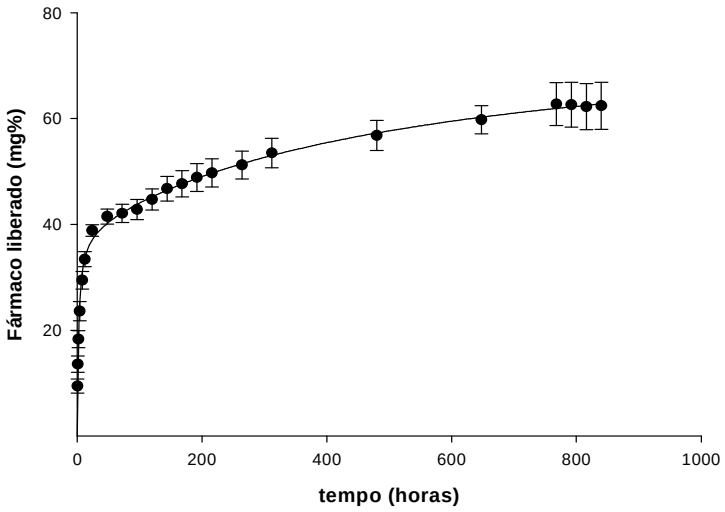

Figura 50. Perfil de liberação da triancinolona a partir das micropartículas de PLGA.

A liberação de fármacos a partir de micropartículas de PLGA pode ocorrer por difusão através de poros formados na matriz, degradação do PLGA e pela combinação dos dois mecanismos (SHAH et al., 1998; GARCIA et al., 1999; HICKEY et al., 2002). As rotas de liberação mais comuns são através da difusão por poros formados na matriz e por erosão da matriz polimérica (LANGER, 1990), sendo que a primeira ocorre em tempos iniciais, enquanto que a erosão ocorre em uma fase mais tardia com a conseqüente liberação do fármaco disperso na parte mais interna da matriz polimérica.

As micropartículas de PLGA obtidas por “spray drying” apresentaram um perfil de liberação prolongado para a triancinolona. O perfil de liberação observado é característico de um sistema do tipo matricial, no qual inicialmente pode ser identificado um efeito “burst” no qual a liberação de cerca de 40% do fármaco ocorreu em até 72 horas. Este efeito ocorre devido à dissolução de uma quantidade de fármaco localizada na parte mais externa das partículas e àquela estruturalmente menos organizada no interior das micropartículas de PLGA. A segunda fase da liberação ocorreu mais lentamente, devido à difusão daquelas moléculas de fármaco estruturalmente mais internalizadas e com maior nível de organização dentro da matriz polimérica.

A Figura 51 apresenta o perfil de liberação *in vitro* da triancinolona a partir das micropartículas de PLGA depois da exposição às diferentes cargas de radiação gama.

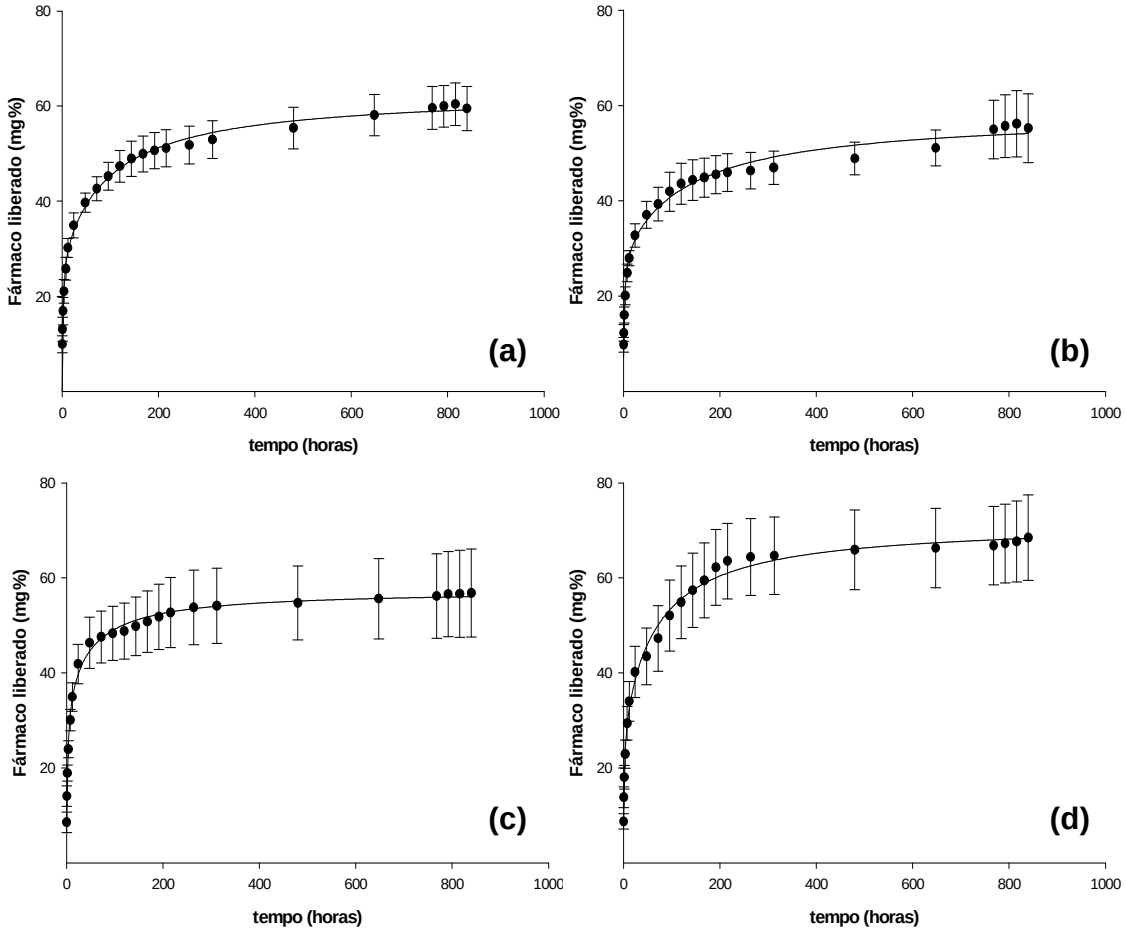

Figura 51. Perfil de liberação da triancinolona a partir das McTr depois da exposição às cargas de radiação gama de (a) 5kGy; (b) 10kGy; (c) 15kGy e de (d)25kGy.

Após submeter os valores de percentual de massa de fármaco liberado para cada intervalo de tempo a uma análise de variância (ANOVA) foi observada diferença estatística (p<0,05) entre os valores determinados. Após submeter os dados ao teste *post hoc* de Dunnet para confronto dos valores em relação às McTr antes da exposição à radiação gama (controle), foi observado que não houve diferença estatística significativa na quantidade de fármaco liberado na primeira fase da liberação (até 120horas) das McTr irradiadas em relação às McTr não irradiadas. No entanto, na segunda etapa de liberação do fármaco, a fase mais lenta, (de 120horas - 312horas) apenas as amostras de McTr irradiadas com a carga de 25kGy liberaram quantidades de fármaco estatisticamente maiores (p<0,05) que as McTr não irradiadas.

Estes resultados complementam os dados obtidos na análise térmica por DSC, os quais mostraram uma transição de fase ocorrida na faixa de 90-110ºC, possivelmente devido a recristalização de porção de moléculas amorfas ou menos ordenadas de fármaco formadas provavelmente durante o processo de irradiação. Através da difração de raios-X foi não foi observado alterações relevantes na microestrutura das McTr, indicando que esta possível amorfização/desorganização não foi tão intensa. Possivelmente, esta teria ocorrido na porção de fármaco mais internalizada nas partículas, justificando assim a liberação do fármaco ligeiramente mais rápida a partir das amostras de McTr irradiadas com a carga de 25kGy, somente na segunda fase de liberação, a mais lenta, que corresponde a liberação do fármaco localizado na parte mais interna da matriz polimérica.

O fato do aumento da taxa de liberação do fármaco ter ocorrido apenas na segunda fase da liberação do fármaco indica que esta possível amorfização ou desorganização do fármaco ocorreu na porção mais internalizada da matriz polimérica, a qual possivelmente explica a não alteração dos difratogramas de raios-X das diferentes amostras.

5. CONCLUSÃO

- ✓ Os parâmetros selecionados para o equipamento de “spray dryer” se mostraram adequados e proporcionaram sucesso na obtenção das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona e com ciprofloxacino. O método proporcionou alto nível de eficiência de encapsulação, com a produção de partículas de tamanho reduzido e de forma predominantemente esférica.
- ✓ As técnicas selecionadas foram adequadas para caracterização das micropartículas de PLGA carregadas com fármaco e para determinar o efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas do sistema de liberação.
- ✓ Os estudos realizados mostraram que as cargas de radiação gama estudadas não provocaram alterações físico-químicas relevantes, mantendo a microestrutura das micropartículas e suas propriedades essenciais para proporcionar a liberação prolongada do fármaco.
    - o Alguma ação radiolítica foi identificada provocando uma leve alteração no teor de fármaco incorporado nas micropartículas, mas que não foi capaz de comprometer a qualidade dos sistemas, indicando que este processo pode perfeitamente ser utilizado dentro da tecnologia de produção destes sistemas.
- ✓ Para o processo de esterilização das micropartículas de PLGA carregadas foi padronizada a carga de 25KGy.

V. ESTUDOS IN VIVO E FARMACOCINÉTICA OCULAR

1. USO DA TRIANCINOLONA E DO CIPROFLOXACINO EM OFTALMOLOGIA.

No capítulo III já foi apresentada a relevância clínica do ciprofloxacino e da triancinolona em oftalmologia.

A presente etapa do estudo foi realizada com o objetivo de determinar a eficiência dos sistemas de liberação produzidos para liberação prolongada dos fármacos pretendidos. Para isso, as micropartículas de PLGA carregadas com fármaco foram esterilizadas pelo processo de radiação gama, utilizando a carga de 25kGy.

No caso do ciprofloxacino, as micropartículas foram desenvolvidas e testadas como um sistema de liberação para administração sub-tenoniana, na forma de suspensão, destinado ao tratamento e profilaxia de endoftalmites, principalmente para uso em profilaxia de cirurgias oculares como a cirurgia de extração de catarata.

Neste estudo foi determinado o perfil *in vivo* de liberação do fármaco a partir das micropartículas, como controle do estudo, dois tratamentos diferentes foram utilizados. O primeiro consistiu em administrar a mesma dose de fármaco pela mesma via de administração na forma de solução aquosa, enquanto o segundo consistiu no uso de uma formulação convencional de colírio de ciprofloxacino 0,3%.

Para a triancinolona, devido ao seu amplo uso no tratamento das doenças vitreoretinais, as micropartículas foram desenvolvidas e testadas como um sistema de liberação prolongada para administração intravitreal, na forma de suspensão, destinada ao tratamento das doenças vitreoretinais e em situações clínicas que requerem o uso de antiinflamatórios esteroidais.

Assim como para o ciprofloxacino, foi determinado o perfil *in vivo* de liberação da triancinolona a partir das micropartículas de PLGA e como controle foi administrado a mesma dose de fármaco utilizando a mesma via de administração em uma suspensão aquosa convencional de fármaco.

2. OBJETIVOS

- ✓ Determinar *in vivo,* utilizando o coelho albino sadio como modelo animal, a eficácia das micropartículas de PLGA obtidas por secagem por atomização como sistema de liberação prolongada intraocular para o ciprofloxacino.
  - ➢ O presente estudo foi dividido nas seguintes etapas.
    - o Administração de injeção única na cápsula sub-tenoniana inferior/posterior das McCP em suspensão aquosa contendo a dose de 2mg de ciprofloxacino em 0,2mL.
    - o Estudo do perfil de liberação *in vivo* do ciprofloxacino a partir das micropartículas de PLGA.
    - o Eficácia das McCP em relação à mesma dose de fármaco administrada em solução aquosa pela mesma via de administração.
    - o Eficácia das McCP em relação ao colírio de ciprofloxacino 0,3%.
    - o Determinação dos parâmetros farmacocinéticos das McCP e dos respectivos tratamentos controle utilizados.
- ✓ Determinar *in vivo,* utilizando o coelho albino sadio como modelo animal, a eficácia das micropartículas de PLGA obtidas por secagem por atomização como sistema de liberação prolongada intraocular para a triancinolona.
  - ➢ O presente estudo foi dividido nas seguintes etapas.
    - o Administração de injeção intravitreal única das McTr em suspensão aquosa contendo a dose de 1mg de triancinolona em 0,1mL.
    - o Estudo do perfil de liberação *in vivo* da triancinolona a partir das micropartículas de PLGA.
    - o Eficácia das McTr em relação à mesma dose de fármaco administrada em suspensão aquosa pela mesma via de administração.
    - o Determinação dos parâmetros farmacocinéticos das McTr e dos respectivos tratamentos controle utilizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

- ✓ Micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino produzidas no laboratório de farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.
- ✓ Micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona produzidas no laboratório de farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.
- ✓ Acetonitrila grau HPLC, J.T Baker (México).
- ✓ Água preparada com sistema purificador de água (Millipore) com resistividade de 18.2 MΩ-cm. e outros reagentes de grau analítico.

3.2. Equipamentos e Acessórios

- ✓ Balança analítica, METTLER®, modelo H 51.
- ✓ Lavadora ultra-sônica TRANSTEK SYSTEMS®, modelo soniclean.
- ✓ HPLC Waters® modelo alliance 2695.
- ✓ Detector UV com arranjo de diodos Waters®, modelo 2996.
- ✓ Detector UV Waters® modelo 2487.
- ✓ Coluna analítica SYMETRY® C18 150 x 4,0 mm e 5 μm de tamanho de partículas e Pré-colunas SYMETRY® de mesma composição.
- ✓ Ultracentrífuga HITASHI modelo himac 80β.
- ✓ Biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ararquara.

Os estudos *in vivo* foram realizados com fundamental colaboração do grupo do Hospital de Olhos de Araraquara coordenado pelo pesquisador em oftalmologia e retinólogo Dr. José Augusto Cardillo, ligado ao Departamento de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP. Todos os ensaios pré-clínicos realizados contaram com a fundamental colaboração do médico oftalmologista especialista em seguimento anterior e cirurgião de catarata, Fernando Paganelli ligado ao Hospital de Olhos de Araraquara. Como modelo animal experimental para a realização do presente estudo foi escolhido coelho albino sadio.

Todos os experimentos forma realizados no biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos de Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

3.3. Animais

Os animais utilizados no presente estudo fora coelhos sadios da raça Nova Zelândia com massa corporal entre 2,0-2,5Kg, fornecido pelo biotério da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Botucatu. Todos os estudos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Declaração da “ARVO” (Association for Research in Ophthalmology and Visual Science) sobre o uso de animais em pesquisas sobre a visão e oftalmologia. Os experimentos foram realizados após aprovação do comitê de ética da Faculdade de ciências Farmacêuticas.

Antes da administração dos tratamentos investigados, os animais foram devidamente anestesiados utilizando injeção de cloridrato de ketamina (50mg/Kg) associado com cloridrato de xilazina (5mg/kg).

Antes da coleta das amostras de humor aquoso e humor vítreo, os animais foram devidamente eutanizados utilizando injeção intravenosa de pentobarbital sódico (50mg/Kg) e tiveram os olhos enucleados.

3.4. Administração das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino e coleta de amostras

Após o procedimento de anestesia, grupos de 4 animais para cada intervalo de tempo de coleta, receberam administração da dose de 2mg/0,2mL de ciprofloxacino em micropartículas de PLGA, através de injeção única na cápsula subtenoniana inferior/posterior no olho direito utilizando agulha de 27 gauge. Em intervalos pré-determinados de 1,2,3,4,5,6,7,8, 12, 24, 48, 72h, e após 5, 7, 10 e 14 dias, os animais foram eutanizados e após enucleação dos olhos, foram coletadas as amostras de humor aquoso e de humor vítreo que foram imediatamente congelados à -80ºC, para posterior determinação da concentração do fármaco liberado pelo método CLAE específico desenvolvido e validado.

3.5. Eficácia das McCp frente à solução aquosa.

Para determinar a eficácia das McCp, grupos de 4 animais para cada intervalo de tempo de coleta, receberam a administração da dose de 2mg/0,2mLde ciprofloxacino em solução aquosa, utilizando o mesmo procedimento de administração das McCP. Em intervalos de tempo pré-determinados de 1,2,3,4,5,6,7,8, 12, 24, 48, 72h, e após 5, 7, 10 e 14 dias, os animais foram eutanizados e após enucleação dos olhos, foram coletadas as amostras de humor aquoso e de humor vítreo que foram imediatamente congelados à -80ºC, para posterior determinação da concentração do fármaco liberado pelo método CLAE específico desenvolvido e validado.

3.6. Eficácia das McCP frente ao colírio de ciprofloxacino 0,3%.

O presente estudo foi realizado para determinar a eficácia das McCP em proporcionar concentrações adequadas de fármaco durante as primeiras horas após a administração. Como controle, grupos de 4 animais para cada intervalo de tempo de coleta, receberam a administração tópica de uma gota de colírio de ciprofloxacino 0,3% (Ciloxan®; Alcon-Brasil) a cada 4 horas durante o período total 8 horas. Em intervalos

pré-determinados de 1,2,3,4,5,6,7, e 8horas, os animais foram eutanizados e após enucleação dos olhos, foram coletadas as amostras de humor aquoso que foram imediatamente congelados à -80ºC, para posterior determinação da concentração do fármaco liberado pelo método CLAE específico desenvolvido e validado.

3.7. Administração das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona e coleta de amostras

Após o procedimento de anestesia, grupos de 4 animais para cada intervalo de tempo de coleta, receberam administração da dose de 1mg/0,1mL de triancinolona em micropartículas de PLGA, através de injeção intravitreal única no olho direito utilizando agulha de 27 gauge. Em intervalos pré-determinados de 1,7,14, 21,30,45, 60 e 90 dias, os animais foram eutanizados e após enucleação dos olhos, foram coletadas as amostras de humor vítreo que foram imediatamente congeladas à -80 ºC, para posterior determinação da concentração do fármaco liberado pelo método CLAE específico desenvolvido e validado.

3.8. Eficácia das McTr frente à suspensão aquosa.

Para determinar a eficácia das McTr, grupos de 4 animais para cada intervalo de tempo de coleta, receberam a administração da dose de 1mg/0,1mL de triancinolona em suspensão aquosa, utilizando o mesmo procedimento de administração das McTr. Em intervalos pré-determinados de 1,7,14, 21,30,45, 60 e 90 dias, os animais foram eutanizados e após enucleação dos olhos, foram coletadas as amostras de humor vítreo que foram imediatamente congeladas à -80 ºC, para posterior determinação da concentração do fármaco liberado pelo método CLAE específico desenvolvido e validado.

3.9. Estudos farmacocinéticos

Durante o presente estudo foi aplicado o modelo multicompartimental na análise das curvas de concentração atingida nos líquidos intraoculares versus tempo.

A área sob à curva ($AUC_{\rightarrow\infty}$) foi calculada utilizando o método dos trapézios e extrapolada para o infinito com auxílio das Equações abaixo (LEBLANC et al., 1997; TSAI; WU, 2001 PATHAK et al., 2007):

$$AUC_{0-t} = \sum_{i=1}^{n} \left[\frac{C_1 + C_{(i+1)}}{2} .(t_{(i+1)} - ti) \right] \qquad \text{Equação 6.}$$

Onde:

$$AUC_{0-\inf} = \sum_{i=1}^{n} \left[\frac{C_1 + C_{(i+1)}}{2} .(t_{(i+1)} - ti) \right] + \frac{\text{Cn}}{\text{Ke}} \qquad \text{Equação 7.}$$

Onde:

Cn= concentração identificada no último ponto do gráfico de Concetração vs. tempo.

Ke= Constante de eliminação

A área sob o primeiro momento da curva ($AUMC_{\rightarrow\infty}$) foi calculada utilizando o método dos trapézios e extrapolada para o infinito com auxílio das Equações abaixo (LEBLANC et al., 1997; TSAI; WU, 2001 PATHAK et al., 2007):

$$AUMC_{0-\inf} = \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{ti.C_1 + t_{i+1}.C_{(i+1)}}{2} .(t_{(i+1)} - ti) \right] + \frac{\text{Cn}}{\text{Ke}^2} + \frac{\text{tn.Cn}}{\text{Ke}} \qquad \text{Equação 8.}$$

O tempo médio de permanência (TMP) do fármaco foi calculado com auxílio da Equação7(LEBLANC et al., 1997; TSAI; WU, 2001 PATHAK et al., 2007).

$$TMP = \frac{AUMC_{0-\inf}}{AUC_{0-\inf}} \qquad \text{Equação 9.}$$

A constante de eliminação (*Ke*) do fármaco foi estimada como a inclinação obtida pela regressão linear dos últimos pontos da curva de concentração atingida nos líquidos intraoculares versus tempo. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi calculado pela relação *lnKe*/2, enquanto o clearance aparente (*Clap*) foi calculado pela relação $D/AUC_{0\rightarrow\infty}$, onde D representa a dose administrada (LEBLANC et al., 1997; TSAI; WU, 2001 PATHAK et al., 2007).

3.10. Análise estatística

Os dados 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). Quando necessário, os valores foram transformados em Rank.

Para confronto pareado dos valores médios estatisticamente diferentes foi utilizado o teste de Student-Newman-Kews (SNK) sendo considerados significativamente diferentes os valores de $p<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSÃO

4.1. Estudos *in vivo* e farmacocinética ocular das micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino

Depois de verificar que a radiação gama não provocou alterações relevantes nas propriedades físico-químicas das micropartículas que comprometessem o seu funcionamento, para o presente estudo as micropartículas de PLGA carregadas com fármaco foram esterilizadas pelo processo de irradiação gama utilizando a carga de 25 kGy.

4.1.1 Eficácia das micropartículas de PLGA contendo ciprofloxacino

A injeção da dose de 2mg de fármaco em micropartículas na cápsula subtenoniana inferior-posterior foi bem tolerada pelos animais. Não houve qualquer reação adversa após o procedimento de administração das McCP.

A curva de concentração atingida no humor aquoso (HA) e no humor vítreo (HV) em função do tempo, após a administração das McCP está apresentada na Figura 52.

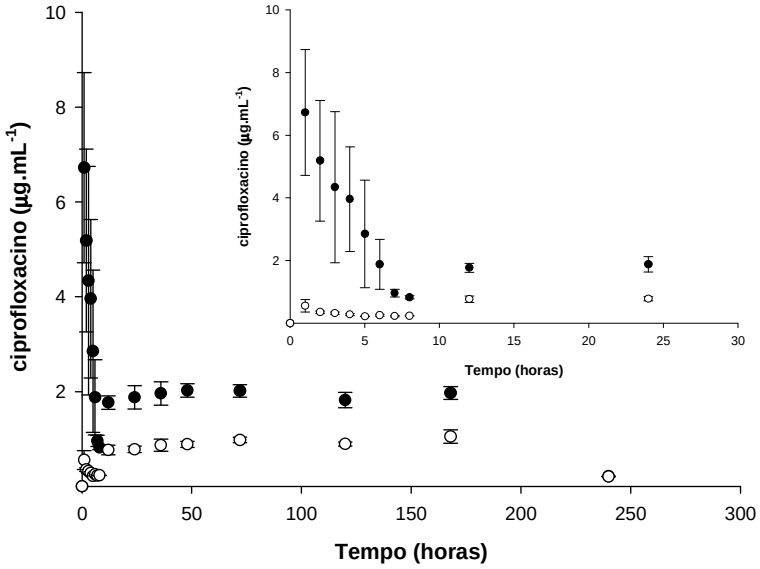

Figure 52. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA (•) e no HV (○) após a administração subtenoniana da dose de 2mg/0,2mL de CP em micropartículas.

Após a administração das McCP foi observado um leve efeito "burst", no qual a concentração de fármaco atingida na primeira hora de 6,72 ± 2,01 $\mu g.mL^{-1}$ no HA e de 0,55 ± 0,2 $\mu g.mL^{-1}$ no HV. Assim como ocorreu na liberação *in vitro, i*sto ocorreu devido à dissolução de uma quantidade de fármaco localizada na parte mais externa das partículas, característica comum de sistemas matriciais de liberação de fármacos. Decorridos 8 horas, este nível de concentração diminuiu para 0,82 ± 0,05$\mu g.mL^{-1}$ no HA e para 0,23 ± 0,01 $\mu g.mL^{-1}$ no HV. Depois de 12 horas, a concentração de CP determinada no HA foi de 1,77 ± 0,14$\mu g.mL^{-1}$ no HA e de 0,87 ± 0,13 $\mu g.mL^{-1}$ no HV. A concentração de fármaco aumentou lentamente para 2,02 ± 0,14 no HA e para 1,05 ± 0,14 $\mu g.mL^{-1}$ no HV e manteve neste nível por mais de 168 horas. Após 240 horas, a concentração de fármaco identificada foi de 0,21 ± 0,002 no HA e de 0,21 ± 0,001 no HV. Após 336 horas o fármaco não foi detectado no humor aquoso.

Após submeter os valores de concentração de fármaco identificados no HA e no HV a análise de variância (ANOVA) foi identificada diferença estatística (p<0,05). Após o teste *post hoc* de Student-Newman-Kews para confronto dos pares, foi observado que o nível de concentração proporcionado no humor aquoso foram significativamente (p<0,05) maiores daqueles determinados no humor aquoso. Isto pode ser explicado devido à via de administração utilizada e pela baixa difusidade do fármaco no humor vítreo que consideravelmente mais viscoso.

Os resultados mostraram que além de fornecer um perfil de liberação prolongada para o ciprofloxacino, as micropartículas de PLGA proporcionaram níveis terapêuticos no humor aquoso. A concentração identificada foi maior que o MIC_{90} para a maioria dos microorganismos patógenos comumente causadores de infecções oculares, incluindo *P. Aeruginosa* e *S. pneumoniae*. Além disso, apesar do nível de concentração atingida no HV ter sido menor que aquele determinado no HA (p< 0,05), ainda foi maior que o MIC_{90} para os patógenos mais comuns, com exceção do *S. pneumoniae* e *Enterococci* (BAUERNFEIND, 1986; BAUMANN; MARTELL, 1988; CALLEGAN et al., 2000; YALVAC et al., 2003).

Para confirmar o efeito prolongado proporcionado pelas McCP, foi administrado a mesma dose fármaco (2mg/0,2mL) em solução aquosa utilizando a mesma via de administração. A curva de concentração atingida no humor aquoso (HA) e no humor

vítreo (HV) em função do tempo, após a administração da solução aquosa do fármaco está apresentada na Figura 53.

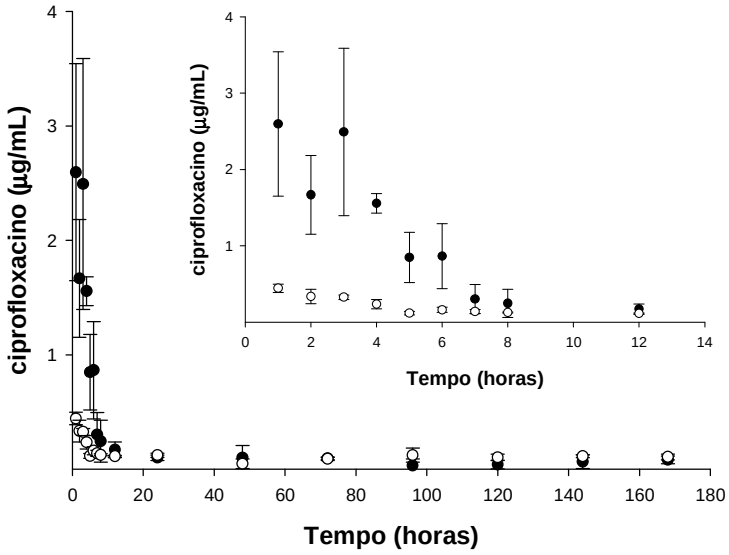

Figura 53. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA (•) e no HV (○) após a administração subtenoniana da dose de 2mg/0,2mL em solução aquosa.

Na primeira hora após a administração subtenoniana da dose 2mg de fármaco em solução aquosa, o nível de concentração do fármaco atingida no humor aquoso foi de 2,60 ± 0,95 $\mu g.mL^{-1}$ e de 0,44 ± 0,05 $\mu g.mL^{-1}$ no humor vítreo. Decorridos 7 horas, este nível de concentração diminuiu rapidamente para 0,303 ± 0,193 $\mu g.mL^{-1}$ no HA e 0,13 ± 0,01 $\mu g.mL^{-1}$ no HV. Depois de 12 horas, níveis menores que 0,17± 0,07 $\mu g.mL^{-1}$ para o HA e 0,11 ± 0,001 $\mu g.mL^{-1}$ para o HV foram identificados.

Estes resultados comprovam a eficácia das micropartículas como sistema de liberação prolongada para o ciprofloxacino. A rápida eliminação do fármaco observada (Fig. 53) justifica a necessidade do uso de altas doses de fármaco, quando administrado em solução por via subtenoniana, acompanhado de repetições da dose em um curto intervalo de tempo para manter os níveis terapêuticos do fármaco no tratamento de endoftalmites avançadas, trazendo potenciais riscos ao paciente, ressaltando ainda mais, a importância do desenvolvimento de um sistema de liberação seguro e eficiente para as quinolonas como o ciprofloxacino.

A análise comparativa entre o nível de concentração de fármaco no humor aquoso proporcionado depois da administração das McCP e da solução aquosa pode ser observada na Figura 54.

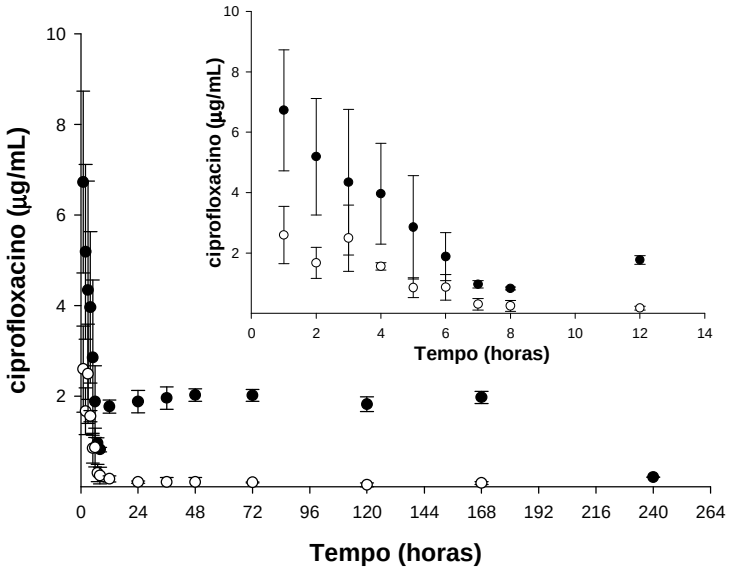

Figura 54. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA após a administração de 2mg de fármaco em (○) solução aquosa e em (●) micropartículas.

Após submeter os dados obtidos no estudo de liberação *in vivo* a uma análise variância (ANOVA), foi observada diferença estatística entre os níveis de concentração de fármaco proporcionados pelas McCP daqueles identificados após a administração da solução aquosa. Após o teste *post hoc* de Student-Newman-Kews para confronto dos pares, foi verificado que as McCP proporcionaram níveis estatisticamente superiores daquelas determinadas quando foi administrada a mesma dose do fármaco em solução aquosa, durante todo o período de tempo estudado.

O ciprofloxacino é muito hidrossolúvel e trabalhos anteriores relatam a rápida eliminação do fármaco do humor aquoso e do humor vítreo quando administrado em solução aquosa por via subconjuntival (BAUMANN; MARTELL, 1988).

A matriz polimérica fornece um efeito reservatório, no qual o fármaco se difunde mais lentamente do interior da matriz para os tecidos intraoculares subjacentes mantendo a concentração terapêutica por tempo mais prolongado. Além disso, a hidofobicidade do PLGA proporciona uma aglomeração das micropartículas no interior

da cápsula subtenoniana visivelmente logo após a injeção, evitando dessa forma uma maior difusão sistêmica ou para outros tecidos, o que justifica os maiores níveis de concentração fármaco identificados desde os tempos iniciais.

O ciprofloxacino e outras quinolonas têm sido bastante utilizadas por via tópica na profilaxia e no tratamento de infecções do segmento anterior do globo ocular (YALVAC et al., 2003, Mc CULLEY et al., 2006). A eficiência desta via de administração em proporcionar e manter o nível terapêutico do fármaco é questionada há tempos, principalmente devido à dificuldade de permeação dos fármacos através da córnea (MAURICE; MISHIMA, 1984; NADKARNI; YALKOWSKI, 1993; ROBINSON, 1993; LANG, 1995; OGURA, 2001; CARDILO et al., 2004; SILVA-JÚNIOR, 2005)

Após a cirurgia de catarata ou de outros procedimentos cirúrgicos a antibiótico-profilaxia é realizada principalmente com o uso de colírios. Para verificar a necessidade do uso de colírio nas primeiras horas após a administração das McCP, foi realizado um estudo *in vivo* comparativo da administração subtenoniana das McCP em relação e à administração da forma convencional de colírio de ciprofloxacino 0,3%, o qual que foi administrada uma gota a cada 4 horas durante 8 horas.

A curva de concentração atingida no humor aquoso (HA) em função do tempo, após a administração do colírio está apresentada na Figura 55.

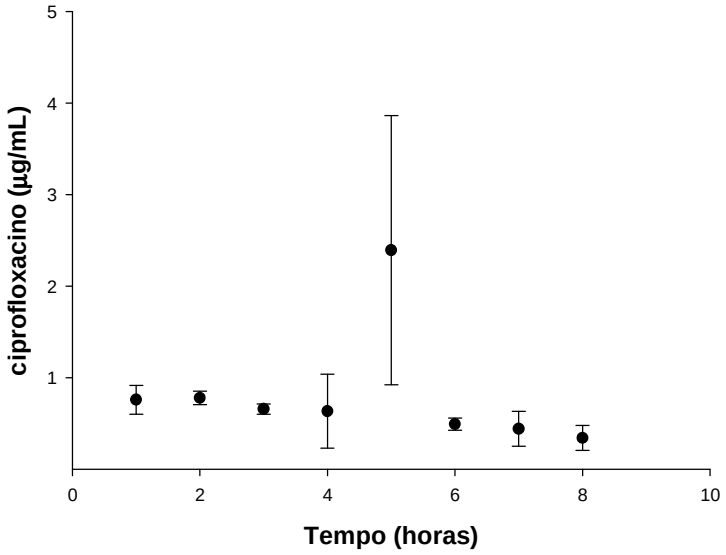

Figura 55. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no humor aquoso após a administração do colírio de ciprofloxacino 0,3% (1gota a cada 4 horas).

Uma hora depois da administração da primeira gota do colírio, o nível de concentração de fármaco CP atingida no HA foi de 0,76 ± 0,16 $\mu g.mL^{-1}$. Este nível diminuiu lentamente para 0,63 ± 0,40 $\mu g.mL^{-1}$ após 4 horas, quando foi administrada a segunda gota do colírio. Decorridos 5 horas, o nível de concentração determinada foi de 2,40 ± 1,47 $\mu g.mL^{-1}$, o qual diminuiu rapidamente para 0,34 ± 0,14 $\mu g.mL^{-1}$ na 8ª. Hora após a administração da primeira gota.

Estes resultados explicam as precauções demonstradas em trabalhos anteriores (YALVAC et al., 2003), pois durante a maior parte do tempo, a administração do colírio não foi capaz de proporcionar níveis de concentração do fármaco eficazes para os patógenos oculares mais comuns e quando estes foram alcançados não foram mantidos por tempo adequado.

O nível de concentração determinado após a administração do colírio foi menor que aquele proporcionado pelas McCP. Este efeito pode ser observado melhor na Figura 56.

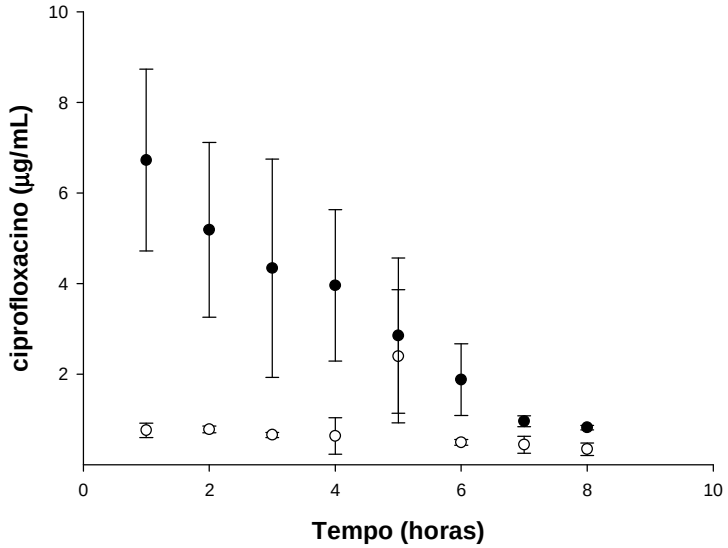

Figura 56. Nível de concentração de ciprofloxacino atingida no HA após a administração de (○) colírio de ciprofloxacino 0,3% (01 gota a cada 4horas) e após (●) a injeção subtenoniana de 2mg de ciprofloxacino em micropartículas.

O nível de concentração determinado no humor aquoso durante as primeiras 8 horas, depois da administração das McCP foi maior que o MIC_{90} para a maioria dos

patógenos oculares (BAUERNFEIND, 1986; BAUMANN; MARTELL, 1988; YALVAC et al., 2003; CALLEGAN et al., 2000). Após submeter os dados a uma análise de variância (ANOVA) que revelou diferenças estatísticas (p<0,05) do nível proporcionado pelo colírio, foi observado após o teste *post hoc* de Student-Newman-Kews para confronto dos pares, que o colírio só foi capaz de proporcionar níveis de concentração estatisticamente similares às McCP no período de tempos na quinta hora após a administração.

Estudos anteriores realizados com a administração tópica de quinolonas também mostraram que esta via de administração não proporciona níveis terapêuticos dos fármacos administrados por período de tempo adequado (YALVAC et al., 2003, Mc CULLEY et al., 2006). O nível de concentração identificado após a administração do colírio de ciprofloxacino 0,3% (1gota a cada 4 horas) foi menor que o Mic90 da maioria dos patógenos oculares (BAUMANN; MARTELL, 1988; BAUERNFEIND, 1986; YALVAC et al., 2003; CALLEGAN et al., 2000), ressaltando a importância do desenvolvimento de um sistema de liberação seguro e eficaz para as quinolonas como ciprofloxacino.

O presente estudo comprova a capacidade das micropartículas de PLGA em fornecer um perfil de liberação prolongada intraocular para o ciprofloxacino, proporcionando níveis terapêuticos do fármaco, estatisticamente superiores daqueles atingidos após administração dos tratamentos utilizados como controle.

As características de liberação deste sistema podem perfeitamente ser utilizadas em situações de profilaxia de cirurgias oculares, como a extração de catarata, ou no tratamento de endoftalmites, devido ao amplo uso das quinolonas em oftalmologia para estes propósitos clínicos e o sucesso experimental demonstrado no presente trabalho.

4.1.2. Estudos farmacocinéticos.

Com o objetivo de aprofundar os estudos *in vivo* e de melhor analisar o efeito prolongado das micropartículas de PLGA na liberação do ciprofloxacino, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos a partir dos dados obtidos das curvas de concentração de fármaco atingida no humor aquoso em função do tempo após a administração das McCp e dos respectivos tratamentos controle utilizados.

A Tabela 17 apresenta o resumo dos parâmetros farmacocinéticos calculados para o humor vítreo.

Tabela 17. Resumo dos parâmetros farmacocinéticos calculados para os diferentes tratamentos investigados.

Parâmetros Farmacocinéticos	ciprofloxacino em McCP	ciprofloxacino em solução aquosa	ciprofloxacino em Colírio 0,3%
Cmax ($\mu g.mL^{-1}$)	7,09 ± 1,31	2,92 ± 0,67*	2,82 ± 1,35*
tmax (h)	1,5 ± 1	2 ± 1,15	5,0 ± 0,0*
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ ($\mu g.h.mL^{-1}$)	479,26 ± 16,51	35,22 ± 7,52*	13,55 ± 1,39*
$AUMC_{0\rightarrow\infty}$ ($\mu g.d^2.mL^{-1}$)	59172,6± 3641,5	2730,4 ± 588,9*	237,68 ± 69,20*
Ke (h^{-1})	0,0030 ± 0,0001	0,0082 ± 0,0007*	0,0507 ± 0,0079*
t1/2 (h)	229,65 ± 11,67	85,17 ± 7,63*	13,94 ± 2,34*
Clap ($h.mL^{-1}$)	4,18 ± 0,14	58,78 ± 12,54*	1,11 ± 0,11*
TMP (d)	123,44 ± 5,54*	79,18 ± 18,82*	17,28 ±3,40*

* Estatisticamente diferente das McCp.

Após realizar a análise dos parâmetros farmacocinéticos para os diferentes tratamentos investigados pode-se confirmar o indicado na análise dos perfis de liberação *in vivo* obtidos.

As micropartículas de PLGA proporcionaram níveis de concentração significativamente superiores (p<0,05), àqueles proporcionados pelos diferentes tratamentos-controle utilizados, o que pode ser evidenciado observando os valores de *Cmax.*

A quantidade de fármaco ($ASC0_{\rightarrow\infty}$) que atingiu o humor aquoso foi consideravelmente maior quando foram administradas as micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino.

É interessante ressaltar que este efeito ocorreu devido às micropartículas, quando administradas na cápsula sub-tenoniana, formarem um aglomerado *in situ*, ocasionado principalmente devido à matriz hidrofóbica do PLGA que quando na presença de fluidos tende a aglomerar alguns minutos logo após a administração. A

ocorrência deste processo proporciona assim o contato íntimo do sistema com a superfície da esclera e conseqüentemente o aumento do fluxo do fármaco através da mesma para o interior do globo ocular. O mesmo não ocorre quando o fármaco é administrado na forma de solução, pois a perfusão para os tecidos adjacente é mais rápida e a eliminação do local de administração.

Este efeito "*depot"* do sistema pode ser claramente demonstrado após analisar o tempo médio de permanência (*TMP)* que foi consideravelmente maior quando as McCP foram administradas, efeito que ocorreu em função da menor velocidade de eliminação do fármaco dos tecidos evidenciada pela constante de eliminação (*Ke*).

A realização do presente estudo permitiu comprovar o sucesso das McCP, além de não proporcionar qualquer reação adversa nos animais conseguiu proporcionar níveis terapêuticos do fármaco por período de tempo prolongado.

4.2. Estudos *in vivo* e farmacocinética ocular das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona

O estudo de biodisponibilidade das McTr foi realizado após esterilização das micropartículas por radiação gama utilizando a carga de 25 kGy.

4.2.1. Eficácia das micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona.

A triancinolona tem sido utilizada há muito tempo em oftalmologia no tratamento de doenças do segmento posterior do olho através da via de administração intravitreal. No entanto, sucessivas injeções são necessárias para manter o efeito terapêutico do fármaco no seguimento posterior do olho.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia das micropartículas de PLGA em fornecer, de forma segura e eficaz, um perfil *in vivo* de liberação prolongada para a triancinolona no posterior do olho.

A Figura 57 apresenta a curva de concentração atingida no humor vítreo em função do tempo, após a administração intravitreal da dose de 1mg/0,1mL de triancinolona em micropartículas de PLGA obtidas por “spray drying”.

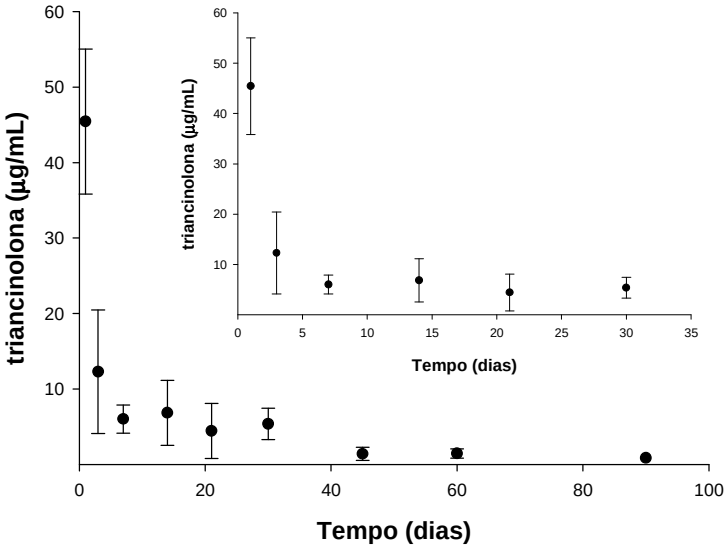

Figure 57. Nível de concentração de triancinolona atingida no humor vítreo após a administração intravitreal da dose de 1mg de triancinolona em micropartículas.

A injeção intravitreal única da dose 1mg/0,1mL de triancinolona em micropartículas foi bem tolerada pelos animais. Não foi identificada qualquer reação adversa. Depois de 24horas, o nível de concentração de fármaco atingido no humor vítreo foi de 45,43 $\pm$ 9,59 $\mu g.mL^{-1}$, caracterizando o mesmo efeito "burst" identificado nos estudos de liberação *in vitro.* Assim como explicado antes, esta liberação de uma dose maior de fármaco em tempos iniciais é característica dos sistemas matriciais, devido à liberação da porção de fármaco estruturalmente menos ordenada, localizada na parte mais externa das partículas.

Assim como nas micropartículas de PLGA carregadas com ciprofloxacino, este efeito "burst" é interessante, devido à possibilidade de proporcionar níveis terapêuticos do fármaco logo após a administração das micropartículas de PLGA, não necessitando assim da associação de uma dose de liberação imediata para consegui-los.

Depois de 3 dias após a administração das McTr, o nível de concentração identificado foi de 12,29 $\pm$ 8,17$\mu g.mL^{-1}$, o qual diminuiu lentamente para 6,02 $\pm$1,87$\mu g.mL^{-1}$ após 7 dias. Este nível de concentração manteve-se constate por cerca de 30 dias, e depois de 60 dias diminuiu para 1,45 $\pm$ 0,85$\mu g.mL^{-1}$. Depois de 90 dias, o nível de concentração de fármaco proporcionado pelas McTr foi de 0,85 $\pm$ 0,28 $\mu g.mL^{-1}$.

Para confirmar o efeito prolongado proporcionado pelas McTr, foi administrada a mesma dose fármaco (1mg/0,1mL) em suspensão aquosa utilizando a mesma via de administração. A curva de concentração atingida no humor vítreo em função do tempo está apresentada na Figura 58.

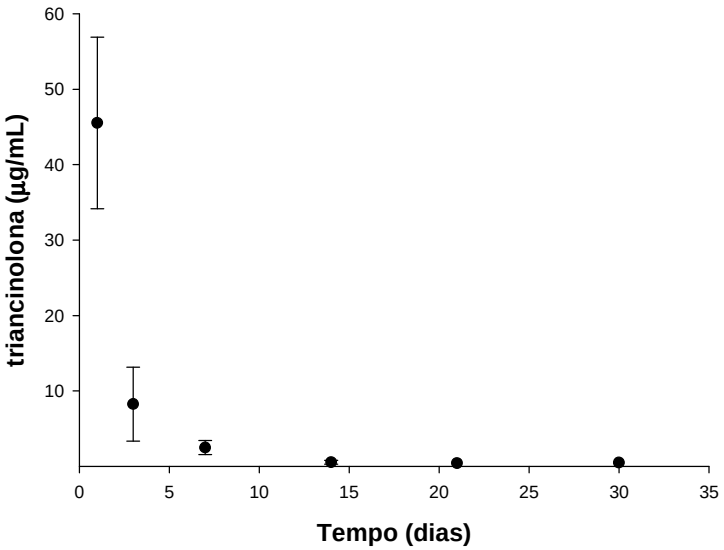

Figura 58. Nível de concentração de triancinolona atingida no humor vítreo após a administração intravitreal da dose de 1mg de triancinolona em suspensão.

Assim como ocorreu com as micropartículas, a injeção intravitreal da dose 1mg/0,1mL do fármaco em suspensão foi bem tolerada pelos animais, não foi identificada qualquer reação adversa durante o período de estudo.

Logo após 24horas, a concentração de fármaco atingida no humor vítreo foi de 51,11 $\pm$ 2,73 $\mu g.mL^{-1}$. Decorridos apenas 3 dias, o nível de concentração identificado foi de 8,27 $\pm$ 4,89 $\mu g.mL^{-1}$, que diminuiu rapidamente para 2,48 $\pm$ 0,93 $\mu g.mL^{-1}$ após 7 dias. Este nível de concentração continuou diminuindo e depois de 14 dias, a concentração de fármaco identificada foi de 0,55 $\pm$ 0,25 $\mu g.mL^{-1}$, o qual continuou constante até 30 dias, depois disso, não foi identificada qualquer concentração de fármaco no humor vítreo. Estes resultados comprovam a eficácia das micropartículas de PLGA como sistema de liberação prolongada intraocular para a triancinolona.

A rápida eliminação do fármaco do humor vítreo observado (Fig. 59) justifica a necessidade do uso de altas doses de triancinolona comumente administradas no tratamento das doenças do seguimento posterior do olho. Associada a isto, está a necessidade de repetições freqüentes da injeção de fármaco em intervalos de tempo relativamente curtos, o que leva ao desenvolvimento de efeitos adversos como o aumento da pressão intraocular, desenvolvimento de endoftalmites entre outros.

A análise comparativa entre o nível de concentração de fármaco atingido no humor vítreo após a administração das McTr em relação à suspensão aquosa pode ser observada na Figura 59.

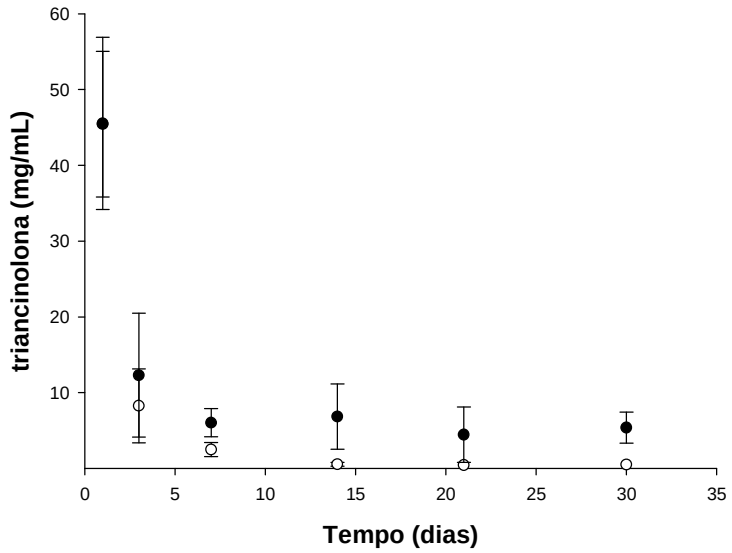

Figura 59. Nível de concentração de triancinolona atingido no humor vítreo após a administração da dose de 1mg/0,1mL de fármaco (○) em suspensão e (●) em micropartículas.

Após submeter os dados a uma a análise estatística (ANOVA) foi observada diferença estatística (p<0,05) entre os níveis concentração de fármaco proporcionado pelas McTr daqueles identificados após a administração da suspensão. Após o teste *post hoc* de Student-Newman-Kews para confronto dos pares, foi observado que já nos três primeiros dias, o nível de concentração de fármaco atingido no humor vítreo após a administração das McTr foi estatisticamente similar àquele identificado após a administração do fármaco em suspensão. Este resultado demonstra o benefício do efeito “burst” do sistema. No entanto, após este período de tempo, o nível de concentração proporcionado pelas McTr foi estatisticamente superior àquele identificado após a administração do fármaco em suspensão.

Estes resultados demonstram a eficácia das micropartículas como sistema de liberação prolongada intraocular para a triancinolona. Os estudos realizados permitem verificar a rápida eliminação dos fármacos do interior do globo ocular quando utilizado as formas convencionais de administração, isto se deve a dinâmica de renovação do

líquido intra-ocular, a qual o fármaco é rapidamente removido do interior do globo ocular logo após a dissolução. Estes resultados indicam ainda mais a necessidade do desenho e prospecção de sistemas de liberação capazes de proporcionar níveis terapêuticos dos fármacos administrados por período de tempo adequado para o tratamento pretendido.

No caso da triancinolona, seu uso na clínica oftalmológica está relacionado com patogenias crônicas que requisitam a manutenção de níveis terapêuticos do fármaco por período prolongado, tornando-se necessária a administração de altas doses repetidamente em um curto período de tempo. Isto traz potenciais problemas para o paciente levando a altas taxas de não adesão ao tratamento (YOUNG et al., 1998; SUCKLING; MASLIN, 1998; JAFFE et al, 2000; DANNIS et al., 2000; PAGNELLI et al., 2004;).

Os estudos realizados com o ciprofloxacino e com a triancinolona demonstram a rápida eliminação dos fármacos dos líquidos intraoculares. As micropartículas de PLGA contendo triancinolona apresentaram um efeito reservatório para o fármaco, através do qual foi possível manter concentrações estatisticamente superiores àquelas proporcionadas pela suspensão convencional, e por período de tempo prolongado, característica buscada há tempos para dispositivos de liberação intra-ocular de fármacos (MORITERA et al., 1991,1992; VELOSO et al., 1997 KIMURA et al., 1994; HASHIZOE et al., 1994; YASUKAWA et al 2000; OGURA, 2001; OKABE, J. et al 2003; OKABE, K. et al 2003).

O perfil de liberação do fármaco apresentado pelas micropartículas de ácido poli lático-co-glicólico, faz deste sistema de liberação uma ótima opção para o tratamento de uma diversidade de doenças do segmento posterior do olho comumente tratadas com o uso intravitreal da triancinolona.

Os estudos in vivo realizados, tanto para as McCP como para as McTr, além de um procedimento simples e rápido de administração quando comparados a outros sistemas de liberação, o uso das micropartículas de PLGA permite a diminuição da freqüência de injeções utilizadas durante o tratamento. O uso da triancinolona em micropartículas proporciona a liberação de doses efetivas e seguras do fármaco de forma regular por período de tempo prolongado.

O uso da suspensão de micropartículas carregadas com fármaco, esféricas e uniformes quanto à distribuição do tamanho de partículas proporcionam características adequadas para esta via de administração e ainda permite flexibilidade na administração de diferentes doses, possibilitando a possibilidade de diferentes esquemas terapêuticos quanto a dose de fármaco escolhida.

4.2.2. Estudos farmacocinéticos.

Os estudos farmacocinéticos foram realizados com o objetivo de melhor analisar os dados obtidos nos estudos *in vivo* com as micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona. A Tabela 18 apresenta o resumo dos parâmetros farmacocinéticos calculados para o humor vítreo após a administração das McTr e do respectivo tratamento controle utilizado

Tabela 18. Resumo dos parâmetros farmacocinéticos calculados para os diferentes tratamentos investigados.

Parâmetros Farmacocinéticos	triancinolona em McTr	triancinolona em suspensão aquosa
Cmax ($\mu g.mL^{-1}$)	45,44 ± 9,59	51,11 ± 1,93
tmax (h)	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ ($\mu g.h.mL^{-1}$)	412,3 ± 84,4	134,03 ± 15,65*
$AUMC_{0\rightarrow\infty}$ ($\mu g.d^2.mL^{-1}$)	13715,1 ± 3146,8	704,91± 76,31*
Ke (h^{-1})	0,0155 ± 0,0014	0,0622 ± 0,0033*
t1/2 (h)	44,92 ± 3,95	11,23 ± 0,63*
Clap ($h.mL^{-1}$)	2,50 ± 0,51	7,56 ± 0,82*
TMP (d)	33,63 ± 6,44	5,29 ± 0,52*

* Estatisticamente diferente das McTr (p<0,05)

A análise dos parâmetros farmacocinéticos (Tab. 18) determinados após administração das McTr permite confirmar o indicado na análise do perfil de liberação *in vivo* obtido. As micropartículas de PLGA apresentaram um perfil de liberação prolongada para a triancinolona em relação à suspensão convencional de fármaco.

A quantidade de fármaco ($ASC0_{\rightarrow\infty}$) que permaneceu no humor aquoso foi consideravelmente maior quando foram administradas as micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona. Enquanto o tempo médio de permanência (*TMP)* foi consideravelmente maior quando as McTr foram administradas, efeito que ocorreu em função da menor velocidade de eliminação do fármaco dos tecidos evidenciada pela constante de eliminação (*Ke*).

A realização do presente estudo permitiu comprovar o sucesso das mcTr na liberação prolongada da triancinolona. Os estudos farmacocinéticos demonstraram que as micropartículas foram capazes de reduzir significativamente ($p<0,05$) a velocidade de eliminação do fármaco do humor vítreo e conseqüentemente aumentar o seu tempo de permanência (TMP) no local alvo.

É interessante ressaltar que as doses de fármaco administradas no presente trabalho foram definidas como dose de estudo. No entanto, como as micropartículas são administradas na forma de suspensão, o sistema apresenta a capacidade de aumento ou diminuição da dose a ser administrada em função da carga de suspensão administrada. Isto se torna uma característica bastante interessante para estes sistemas, visto que apresenta assim uma maior flexibilidade na hora da administração em função do possível quadro clínico apresentado pelo paciente.

5. CONCLUSÃO

- ✓ Os estudos in vivo realizados confirmaram a capacidade das micropartículas de PLGA em proporcionar, de forma segura e eficaz, um perfil de liberação prolongada para o ciprofloxacino. Durante sete dias, O nível de concentração identificado foi superior ao MIC_{90} para a maioria dos patógenos oculares mais comuns.
- ✓ A administração sub-tenoniana da dose de 2mg de ciprofloxacino em micropartículas de PLGA foi mais eficaz que a mesma dose quando administrada em solução aquosa.
- ✓ A administração sub-tenoniana da dose de 2mg de ciprofloxacino em micropartículas de PLGA foi mais eficaz que a administração do colírio de ciprofloxacino 0,3% (1gota a cada 4horas) durante as primeiras oito horas de estudo. Além disso, os níveis de concentração proporcionados durante o período de estudo foram superiores ao MIC_{90} para a maioria dos patógenos oculares mais comuns.
- ✓ Os estudos in vivo realizados confirmaram a capacidade das micropartículas de PLGA em proporcionar, de forma segura e eficaz, um perfil de liberação prolongada para a triancinolona.
- ✓ A administração intravitreal da dose de 1mg/0,1mL de triancinolona em micropartículas biodegradáveis proporcionou níveis de concentração de fármaco superiores e por período de tempo prolongado em relação à mesma dose administrada em suspensão.

VI. CONCLUSÕES FINAIS DOS TRABALHOS DE PESQUISA

- ✓ Os parâmetros operacionais selecionados para o equipamento de “spray dryer” conduziram com sucesso à produção de micropartículas de PLGA carregadas com triancinolona e ciprofloxacino.
  - ➢ As micropartículas produzidas apresentaram alta eficiência de encapsulação, com partículas predominantemente esféricas e de tamanho médio reduzido.
- ✓ As técnicas selecionadas foram capazes de caracterizar o efeito da radiação gama nas propriedades físico-químicas das micropartículas de PLGA obtidas por secagem por atomização.
- ✓ O efeito das cargas de radiação gama investigadas não comprometeram a qualidade das micropartículas de PLGA carregadas com fármaco.
  - ➢ A carga de radiação gama escolhida para esterilização das micropartículas antes da realização do estudo “in vivo” foi de 25kGy.
- ✓ Os estudos “in vivo” realizados em coelho comprovaram o sucesso das micropartículas de PLGA obtidas pela técnica “spray drying” para liberação prolongada intra-ocular do ciprofloxacino e da triancinolona pelas vias de administração sub-tenoniana e intravitreal respectivamente.
- ✓ Os estudos realizados na presente tese atingiram os objetivos pretendidos e fornecem o suporte necessário para realização dos estudos clínicos em humanos, vindo a disponibilizar dois produtos farmacêuticos para uso em oftalmologia. Além disso, estabelece um roteiro claro e objetivo a ser seguido no desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada para uso em oftalmologia.

VII. REFENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução- RE nº 899, de maio de 2003a.**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução- RDC nº 210, de agosto de 2003b.**

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 lipossome encapsulated of ganciclovir in a patient with AIDS. **Br. J. Ophthal**. v. 78, p. 677-680, 1994.

ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 59, p. 478-490, 2007.

ALVES, G. P.; SANTANA, M.H.A. Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technol.** v. 145, p. 139-148, 2004.

ANDERSON, M.J.; SHIVE, S.M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres**. Adv. Drug Deliv. Ver.** v.28, p.5-24, 1997.

ANDREO-FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **INFARMA,** Brasília v.9, p.18-21, 1999.

ANTOSZYK, N.A.; GOTTLIEB, J.L.; MACHEMER, R.; HATCHELL, D.L. The effects of intravitreal triancinolone acetonide on experimental pre-retinal neovascularization. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.** V. 231, p. 34-40, 1993.

AMO, E.M.; URTTI, ARTO. Current and future ophthalmic drug delivery systems A shift to the posterior segment. **Drug Discov. Today,** v. 13, p.135-143, 2008.

ARAUJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina (AZT)**. 2003. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos).-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ARIAS, M.J.; MOYANO, J.R.; GINÉS, J.M. Study by DSC and HSM of the oxazepam–PEG 6000 and oxazepam–D-mannitol systems: Application to the preparation of solid dispersions **Therm. Acta** v. 321, p. 33-41, 1998.

AYALASOMAYAJULA, S.P.; KOMPELLA, U.B. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. **Eur. J. Pharmacol.** v. 511, p. 191- 198, 2005.

BAEYENSA, V.; KALTSATOSB, V.; BOISRAME, B.; VARESIOC, E; VEUTHEYC, J.-L.; FATHID, M.; BALANTE, L.P.; GEX-FABRYE, M.; GURNYA, R. Optimized release of dexamethasone and gentamicin from a soluble ocular insert for the treatment of external ophthalmic infections. **J. Control. Release** v. 52, p. 215-220, 1998.

BARBAULT-FOUCHERA, S.; GREFA, R.; RUSSOA, P.; GUECHOTB, J.; BOCHOTA, A. Design of poly- epslon caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery. **J. Control. Release** v. 83, p. 365-375, 2002.

BARTOLOTTA, A.; D'OCA, M.C.; CAMPISI, M.; CARO, V. GIANDALI, G.; GIANNOL, L.I.; BRAI, M. CALDERARO, E. Effects of gamma-irradiation on trehalose–hydroxyethylcellulose microspheres loaded with vancomycin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 59, p. 139-146, 2005.

BAUERNFEIND, A. Antimicrobial activity of ciprofloxacin: an overview. In H.C. Neu, H. Weuta (eds.): **1st International Ciprofloxacin Workshop**, Excerpta Medica, Amsterdam (1986) 7-11.

BAUMANN, W.B; MATERLL, J. Ciprofloxacin concentration in the rabbit aqueous humor and vitreous following intravenus and subconjunctival administration. **Infection,** v. 16, p.54-57, 1988.

BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; HOFFMEISTER, C.; GALLAS, M.R.; COLLNOT, E.; SCHAEFER, U.F.; GUTERRES; S.S.; LEHR, C.M. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 67, p. 18-30, 2007.

BIKIARIS, D.; PAPAGEORGIOU, G.Z.; STERGIOU, A.; PAVLIDOU, E.; KARAVAS, E.; KANAZE, F.; GEORGARAKIS, M. Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs: Evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques.**Therm. Acta** v. 439, p. 58-67, 2005.

BIONDI, M.; UNGARO, F.;QUAGLIA, F. ; NETTI, P.A. Controlled drug delivery in tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.** n. 60, p. 229-242, 2008.

BLANCO-PRIETO, M.J.; BESSEGHIR, K.; ORSOLONI, P.; HEIMGARTNER, F.; DEUSCHEL, C.; MERKLE, P.H.; NAM-TRÂN, H.; GANDER, B. Importance of the test medium for the release kinetics of somatostatin analogue from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. **Int. J. Pharm.** v. 184, p. 243-250, 1999.

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. **Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 46, p. 3845-3849, 2005.

BOURGES, J.L.; BLOQUEL, C. ; THOMAS, A. ; FROUSSART, F. ; BOCHOT, A. ; AZAN, F. ; GURNY, R. ; BENEZRA, D. BEHAR-COHEN, F. Intraocular implants for extend drug delivery: Therapeutic applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 58, p. 1182-1202, 2006.

BP. **BRITISH Pharmacopoeia 2001**. London: The Stationery Office, 2001. v.1, p. 1649.

BUDAI, L.; HAJDU, M.; BUDAI, M.; GROF, P. BENI, S.; NOSZAL, B.; KLEBOVICH, I.; ANTAL, I. Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: Studies on ciprofloxacin formulations. **Int. J. Pharm.** v. 343, p. 34-40, 2007.

CALLEGAN M.C., BOOTH, M.C. GILMORE, M.S. In vitro pharmacodynamics of ofloxacin and ciprofloxacin against common ocular pathogens. **Cornea**, v. 19, p. 539-545, 2000.

CALIS, S.; BOZDAG, S.; KAS, S.; TUNÇAY, M.; HINCAL, A. Influence of radiation sterelization on poly (lactide-coglicolide) microspheres containing anti-inflamatory drugs. **Il Farmaco.** v. 57, p. 55-62, 2002.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer coated nanocapsules as ocular drug carriers. **Int. J. Pharm.** v. 153, p. 41-50, 1997.

CAMPOS, M.A.; SANCHEZ, A.; ALONSO, J.M. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for delivery of drugs to the ocular surface. Aplication to ciclosporin A. **Int. J. Pharm.** v. 224, p. 159-168, 2001.

CAO, Y.; ZHANG, C.; SHEN, W.; CHENG, Z.; YU, L.L.; PING, Q. Poly(N-isopropylacrylamide)–chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery. **J. Control. Release** v. 120, p. 186-194, 2007.

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-flurouracil system for treatment of experimental post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. **Br. J. Ophthalmol.** v. 95, p. 262-270, 2004.

CARDILLO, J.A.; MELO JR, L.A.; COSTA, R.A.; SKAF, M.; BELFORT JR, R.; SOUZA FILHO, A.A; FARAH, M.E.; KUPPERMAN, B.D. Comparison of intravitreal versus posterior sub-Tenon's capsule injection of Triamcinolone acetonide for diffuse diabetic macular edema. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 112, p. 1557-1563, 2005.

COSTA, R.A; CALUCCI, D.; MELO JR, L.A.; CARDILLO, J.A.; SCOTT, I.U. Intravitreal bevacizumab (avastin) for central and hemicentral retinal vein occlusios:(IbeVO study). **Retina**, v. 1, p. 141-149, 2007.

COLTHURST, MJ; WILLIAMS, RL; HISCOTT, PS; GRIERSON. Biomaterials used in the posterior segment of the eye**. Biomaterials***,* v. 21, Issue 7 p.649-665, 2000.

CONWAY, M.D.; CANAKIS, C.; LIVIR-RALLATOS, C.; PEYMAN, G.A. Intravitreal triamcinolone acetonide for refractory chronic pseudophakic cystoid macular edema. **J. Cataract Refract. Surg.** v. 29, p.27-33, 2003.

CUNNINGHAM, M.A.; EDELMAN, J.L.; KAUSHAL, S. Intravitreal steroids for macular edema: the past, the present, and the future. **Surv. Ophthalm.** v. 53, p. 139-149, 2008.

DANIS, R.P.; BINGAMAN, D.P.; YANG, Y.; LAD B. Inhibition of preretinal and topic nerve head vascularization in pigs by intravitreal triamcinolone acetonide. **Ophthalmology,** v. 103, p.2099-2104, 1996.

DANIS, R.P.; CIULLA T.A.; PRATT L.M.; ANLIKER W. Intravitreal triamcinolone acetonide iin exudative age relatad macular degeneration. **Retina***,* v. 20, p. 244-250, 2000.

DELANEZ, P.; FRANZINI, C.C.; ROSSANEZI, G.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; OLIVEIRA, A.G. Biocompatible cationic microemulsion for ophathalmic topical administration of mofloxacin antibiotic. In: **International Congress of Pharmaceutical sciences, 2007,** Ribeirão Preto. CIFARP, 2007.

DÉSÉVAUX, C.; DUBREUIL, P.; LENAEERTS, V. Characterization of crosslinked high amylose starch matrfix implants: 1. In vitro release of ciprofloxacin. **J. Control. Release,** v. 82, p. 83-93, 2002.

DING, S. Recent development in ophthalmic drug delivery. **Pham. Sci. Technol. Today** v. 1, p. 328-335.

EIFRIG, C.W.; FLYNN, H.W. JR; SCOTT, I.U.; NEWTON, J. Acute-onset postoperative endophthalmitis: review of incidence and visual outcomes (1995–2001). **Ophthalmic Surg. Lasers**, v. 33, p. 373-378, 2002.

EPERON, S.; BOSSY-NOBS, L.; PETROPOULOS, I.K.; GURNY, R.; GUEX-CROSIER, Y. A biodegradable drug delivery system for the treatment of postoperative inflammation **Int. J. Pharm.** v. 352, 240-247, 2008.

ELKHARRAZ, K.; FAISANT, N.; GUSE, C.; SIEPMANN, F.; ARICA-YEGIN, B.; OGER, J.M.; GUST, R.; GOEPFERICH, A.; BENOIT, J.P.; SIEPMANN, D J. Paclitaxel-loaded microparticles and implants for the treatment of brain cancer: Preparation and physicochemical characterization. **Int. J. Pharm.,** v. 314, p. 127-136, 2006.

FAUCITANO, A.; BUTTAFAVA, A.; MONTANARI, L.; CILURZO, F.; CONTIC, B.; GENTAC, I.; VALVO, L. Radiation-induced free radical reactions in polymer/drug systems for controlled release: an EPR investigation. **Rad. Phys.Chem.** v. 67,. P. 61-72, 2003.

FINCH, C.A. Microencapsulation. In: ELVERS, B., HAWKINS, S., SCHULZ, G. **Olmann's encyclopedia of Industrial chemistry.** 5. Ed. Neinhene: VCH Verlagsgesell-shaft, 1990.v.A16,p.575-588.

FIRESTONE, B.A.; DICKASON, M.A.; TRAN, T. Solubility characteristics of three fluoroquinolone ophthalmic solutions in an in vitro tear model. **Int. J. Pharm.,** v. 164, p. 119-128, 1998.

FELT- BAEYENS, O.; EPERON, S. ; MORA, P.; LIMAL, D. ; SAGODIRA, S.; SIMONAZZI, P. B.; BOSSY-NOBS, L. GUEX-CROSIER, Y.; GURNY, R. Biodegradable scleral implants as new triamcinolone acetonide delivery systems. **Int. J. Pharm.** v. 322, p. 6-12, 2006.

FRANK A. BUCCI, JR. an in vivo study comparing the ocular absorption of levofloxacin and ciprofloxacin prior to phacoemulsification. **Am. J. Ophthalmol.** V. 137, p. 308-312, 2004.

FU, Y.J.; SHYU, S.S.; SU, F.H.; YU, P.C. Development of biodegradable co-poly (D,L-lactic/glycolic acid) microspferes for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. **Colloids Surf. B: Biointerfaces***,* v. 25, p. 269-279, 2002.

GARCIA JT; FARINA JB; MUNGUIA, O; LLABRES, M. Comparative degradation study of biodegradable microspheres of poly(lactide-coglycolide) with poly(ethylene glycol) derivatives. **J. Microencapsul.,** v. 16(1) p. 83-94, 1999.

GEROSKI, H. D.; EDELHAUSER, F.H. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 52, p. 37 – 48, 2001.

GIUNCHEDI, P.; ALPAR, H.O. CONTE, U. PDLLA microspheres containing steroids: spray drying, o/w and w/o/w emulsification as preparation method. **J. Microencapsul. v**. 15, p. 185-195, 1998.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U.; CHETONI, P.; SAETTONE, MF. Pectin microspheres as ophthalmic carrier for piroxicam evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 9, p. 1-7, 1999.

GUPTA, A.K.; MADAN, S.; MAJUMDAR, D.K.; MAITRA, A. Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies. **Int. J. Pharm.** v. 209, p. 1-14, 2000.

HACHICHA, W.; KODJIKIAN, L.; FESSI, H. Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters. **Int. J. Pharm.** v. 324, p. 176-186, 2006.

HACHICHA, W.; FESSI, H.; CASOLI-BERGERON, E.; LEE, M.-Y.; JAAFAR, C.; CLAYER-MONTEMBAULT, A.; BURILLON, C.; FRENEY, J.; KODJIKIAN, L. In vitro efficacy of newly designed vancomycin-based microparticles. **J. Cataract Refract. Surg.,** v. 33, 702-708, 2007.

HASHIZOE M.; OGURA Y.; KIMURA, H.; MORITERA, T.; HONDA Y.; KYO M.; ION, S.H.; IKADA, Y. Scleral plug of biodegradable polymers for controlled drug release in the vitreous. **Arch. Ophthalmol.** v. 112, p. 1380-1384, 1994.

HENDERLY, D.E.; FREEMAN, W.R.; CAUSEY, D.M.; RAO, N.A. Citomegalovirus retinitis and response to therapy with ganciclovir, **Ophthalmology** v. 94, p.425-434, 1987.

HERRERO-VANRELL, R.; RAMIREZ, I.; FERNADEZ-CABALLIDO, A.; REFOJO, M.F. Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process. **Pharm. Res.** v. 17, p. 1323-1328, 2000.

HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, FM. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 52, p.5-16, 2001.

HICKEY, T.; KREUTZER, D.; BURGESS, DJ; MOUSSY, F. Dexamethasone/PLGA microspheres for continuos drug delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. **Biomaterials,** v. 23, p. 1649-1656, 2002.

HOLLAND, G.N.; SAKMOTO M.J.; HARDY, D.; SIDIKARO, Y.; KREIGER A.E.; FRENKEL, L.M. The UCLA CMV Rethinopaty Study Group, Treatment of cytomegalovirus rethinopathy in patients with acquirid immunodeficiency syndrome. Use of the expermental drug 9 – [2-hydroxy-1- (hydroxy-methyl] guanine. **Arch. Ophthalmolology**. v.104, p.1784-1800, 1986.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of Analytical Procedures:** Methodology, 1996.

IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; ROSAS, J.E.; PATARROYO, M.E.; PEDRAZ, J.L. Gamma-irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** (2007), doi: 10.1016/j.ejpb.2007.12.014

JAFFE, G.J.; BEN-NUN, J.; GUO, H. DUNN, J.P.; ASHTON, P. Fluocinolone acetonide sustained drug delivery device to treat severe uveitis. **Ophthalmology**, v. 107, p. 2024-2033, 2000.

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.

JALIL, R.; NIXON, J.R.; Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. **J Microencaps.** v. 7, p. 297-325, 1990.

JERMAK, C.M.; DELLACROCE, J.T.; HEFFEZ, J.; PEYMAN, G.A. Triamcinolone acetonide in ocular therapeutics. **Sur. Ophthalmol.,** v. 52, p.503-522, 2007.

JONAS, JB.; HAYLER, JK; PANDA-JONAS, S. Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative vitreoretinopathy. **Br. J. Ophthalmol.** v. 84, p.1064-1067, 2000.

JONAS, J.B., MD; JOCHEN K. H., MD; ANTJE, S, MD; PANDA-JONAS, M.D. Intravitreal Injection of Crystalline Cortisone as Adjunctive Treatment of Proliferative Diabetic Retinopathy. **Am. J. Ophthalm.,** v. 131 n.4, p. 468-471, 2001.

JONAS, J.B.; KREISSIG, I.; DEGENRING, R. Intravitreal triamcinolone acetonide for treatment of intraocular proliferative, exudative, and neovascular diseases. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 24, p. 587-611, 2005.

KASSEM, M.A.; RAHMAN, A.A.A.; GHORAB, M.M. ; AHMED, M.B.; KHALIL,. R.M. Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. **Int. J. Pharm.** v. 340, p. 126-133, 2007.

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. Ophthalmol. Vis. Sci.,** v. 44, p. 1192-1201, 2003.

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. Release.** v. 68, p. 263-271, 2000.

LANG, L.C. Ocular drug delivery: Conventional ocular formulations. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 16 p. 39-43, 1995.

LANGER, R. New methods of drug delivery**, Science** 249, p. 1527-1533, 1990.

LEBLANC, P.P.; AIACHE, J.M.; BESNER, J.G.; BURI, P.; LESNE, M. e colaboradores. Traité **de Biopharmacie et Pharmacocinítique.** Trad. por FIGUEREDO, M.L. Presses L'Université de Montreal, 1997, 419p.

LI, X.; ZHI, F.; HU, Y.. Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin. **Int. J. Pharm.** v. 328, p. 177-182, 2007.
MA, W.D.; XU, H.; WANG, C. NIE, S.F.; PAN, W.S. Pluronic F127-*g*-poly(acrylic acid) copolymers as *in situ* gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. **Int. J. Pharm.** v. 350, 247-256, 2008.

MAINARDES, R.M.**Preparação e caracterização de nanopartículas de ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico)contendo praziquantel.** 130f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

MARTINEZ-SANCHO, C.; HERRERO-VANRELL, R.; NEGRO, S. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration, **J. Control. Release** v. 99, p. 41-52, 2004.

MARTIDIS, A. et al., Intravitreal triancinolone for refractory diabetic macular edema. **Ophthalmology**. v. 109, p. 920-927, 2002.

MASTERS, K. **Spray drying handbook,** 4th ed. London: Longman Scientific and Technical, 1985.

MAURICE, D.M.; MISHIMA, S. **Ocular pharmacikinetics***, in: M.L. Sears.*Ed. Pharmacology of the Eye: Springer-verlag, New York, p.19-116, 1984.

McCARRON, P.A.; WOOLFSON, A.D.; KEATING, S.M. Sustained relase of 5-fluorouacil from polymeric nanoparticles. **J. Pharm. Pharm.** v. 52, p. 1451-1459, 2000.

MC CULLEY J.P., CAUDLE D. ARONOWICZ, J.D. SHINE W.E. Fourth-Generation fluoroquinolones penetration into the aqueous humor in human. **Am. Acad. Ophthalmol**. v. 113, p. 955-959, 2006.

MILICEVIC, D.; TRIFUNOVIC, S. GALOVIC, S. SULJOVRUJIC, E. Thermal and crystallization behaviour of gamma irradiated PLLA. **Rad. Phys. Chem.**, v. 76, p. 1376-1380, 2007.

MOHR, D.; WOLFF, M.; KISSEL, T. Gamma irradiation for terminal sterilization of 17b-estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. **J. Control. Release**, v. 61, p. 203-217, 1999.

MONSHI, M. A. S.; ABDEL-SALAM, N. M.; MAHFOUZ, R. M. Gamma irradiation effects on the thermal decomposition induction period in uranyl acetate. **Therm. Acta**, v. 327, p. 139-143, 1999.

MONTANARI, L.;COSTANTINI, M.; SIGNORETTI, C.E.; VALVO, L.; SANTUCCI, M.; BARTOLOMEI, M.; FATTIBENE,P.; ONORI, S.; FAUCITANO, A.;CONTI, B.; GENTA, I. Gamma irradiation effects on poly(DL-lactictide-co-glycolide) microspheres**. J. Control. Release**. v. 56, p. 219-229, 1998.

MONTANARI, L.; CILURZO, F.; CONTI, B.; GENTA, I.; GROPPO, A.; VALVO, L.; FAUCITANO, A.; BUTTAFAVA, A. Gamma irradiation effects and EPR investigation on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine. **Il Farmaco**, v. 57, p. 427-433, 2002.

MONTANARI, L.;COSTANTINI, M.; SIGNORETTI, C.E.; VALVO, L.; SANTUCCI, M.; BARTOLOMEI, M.; CILURZO.; F.; SELMIN, F.; CONTI, B.; GENTA, I; ORSINI, F.; VALVO, L. Poly(DL-lactictide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine: comparsion between gama and beta irradiation effects**. J. Control. Release**. v. 90, p. 281-290, 2003.

MORITERA, T.; OGURA Y.; HONDA, Y.; WADA, R.; HYON, S.H.; IKADA, Y. Microspheres of biodergradable 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 Microsphers containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinophaty. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 33, p. 3125-3130, 1992.

MOTWANI, S.K.; CHOPRA, S.; TALEGAONKAR, S.; KOHLI, K.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 513-525, 2008.

MU, L.; FENG, S.S. Fabrication, characterization an in vivo release of plaquitaxel (Taxol®) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. **J. Control. Release** v. 76, p. 239-254, 2001.

NADKARNI, S.R.; AND YALKOWSKI, S.H. Controlled Delivery of Pilocarpine. 1. In vitro characterization of gelfoam matrices. **Pharm. Research** v. 10 p. 109-112 , 1993.

NAIMA, Z.; SIRO, T.; JUAN-MANUEL, G.-D.; CHANTAL, C.; RENÉ, C.; JEROME, D. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 12, 395-404, 2001.

NANJAWADE, B.K. MANVI, F.V.; MANJAPPA, A.S. In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. **J. Control. Release** v. 122, p. 119-134, 2007.

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

OKABE, J.; KIMURA, H.; KUNOU, N.; OKABE, K.; KATO, A.; OGURA, Y. Biodegradable Intrascleral implant for sustain intraocular drug delivery of betamethasone phosphate. **Inv. Ophthalm. Vis. Sci.** v. 44, p. 2703-2707, 2003.

OLIVEIRA, GA; SCARPA, VM; BUENO, FHJ; EVANGELISTA, CR. Micro e nanocápsulas. Um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos. **Revista de Ciências Farmacêuticas.** São Paulo, v. 14, p. 37-49, 1992.

OLMEZ, G.; CAKMAK, S.S.; SOKER, S.I.; NERGIZ, Y.; YILDIZ, F. Effects of Intravitreal Ropivacaine on Retinal Thickness and Integrity in the Guinea Pig. **Cur. Ther. Res.** v. 66, 2005.

OZTURK, F.; KORTUNAY, S.; KURT, E.; ILKER, SAMI; BASCI, N.E.; BOSKURT, A. Penetration of topicaland oral ciprofloxacin into the aqueous and vitreous humor inflamed eyes. **Retina,** v. 19, p. 218-222, 1999.

OZTURK, F.; KURT, E. ; INAN, U.U.; KORTUNAY, S.; ILKER, S. S.; BASCI, N.E.; BOZKURT, A. The effects of prolonged acute use and inflammation on the ocular penetration of topical ciprofloxacin. **Int. J. Pharm.** v. 204, p.97-100, 2000.

PAGANELLI, F.; CARDILLO, J.A.; MELO JR, L.A.; OLIVEIRA, A.G; SKAF, M.; COSTA,R.A. Brazilian Ocular Pharmacology and Pharmaceutical Technology Research Group. A single intraoperative sub -Tenon`s capsule triamcinolone acetonide injection for the treatment of post-cataract surgery inflamation. **Am. J. Ophthalmol.,** v. 111, p. 2102-2108, 2004.

PEYMAN, G.A; HERBST R. Bacterial endophthalmitis. Treatment with intraocular injection of gentamicin and dexamethasone. **Arch. Ophthalmol.** v. 91, p. 416418, 1974.

SCHMIER, J.K.; HALPERN, M.T.; COVERT, D.W.; LAU, E.C.; ROBIN, A.L. Evaluation of medicare costs of endophthalmitis among patients after cataract surgery. **Ophthalmology**, v. 114, p. 1094-1099, 2007.

PATHAK, S.M.; KUMAR, A. R.; SUBRAMANIAN, G.; UDUPA, N. Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the study of Saquinavir pharmacokinetics in rat plasma. **Anal. Chim. Acta** v. 594, p. 248-256, 2007.

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

QUAGLIA, F.; De ROSA, G.; GRANATA, E.; UNGARO, F.; FATTAL, E.; La ROTONDA, M.I. Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying. **J. Control. Release** v. 86, p. 267-278, 2003.

QI, H.; CHEN, W.; HUANG, C.; LI, L.; CHENA, C.; LI , W.; WU, C. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **Int. J. Pharm.** v. 337, 178-187, 2007.

RAFFIN, R.P.; JORNADA, D.S.; M.I.RE, A.R. POHLMANN, S.S. GUTERRES, Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation. **Int. J. Pharm.** v. 324, 2006, p. 10-18.

RAHMAN, R.A.; MATHIOWITZ, E. Localization of bovine serum albumin in double-walled microspheres. **J. Control. Release** v. 94, p. 163-175, 2004.

RÉ, M.I.; BISCANC, B. Preparation of microspheres of ketoprofen with acrylic polymers by a quasi-emulsion solvent diffusion method. **Powder technol.,** v. 101, p. 120-133, 1999.

REICHLE, M.L. Complications of intravitreal steroid injections. **J. Am. Optom. Assoc.** v.76, p. 450-460, 2005.

RICHARD, J.A.; SPALTON, D.J.; STANFORD, M.R.; GRAHAM, E.M.; FFYTCHE, T.J.; MARSHALL, J. Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema: An optical coherence tomoggraphy study. **Ophthalmology** v.108 , p. 765-772, 2001.

ROBERTSON, S.M.; CURTIS, M.A.; SCHLECH, B.A.; RUSINKO, A.; OWEN, G.R.; DEMBINSKA, O.; LIAO, J.; DAHLIN, D.C. Ocular Pharmacokinetics of Moxifloxacin After Topical Treatment of Animals and Humans. **Surv Ophthalmol**. v. 50, p. 32–45, 2005.

ROTHEN-WEINHOLD, A.; BESSEGHIR, K.; VUARIDEL, E.; SUBLET, E.; OUDRY, N.; GURNY, R. Stability studies of a somatostatin analogue in biodegradable implants. **Int. J. Pharm.**, v.178, p.213-22, 1999.

ROY, S.; RIGA, A. T.; ALEXANDER, K. S. Experimental design aids the development of a differential scanning calorimetry standard test procedure for pharmaceuticals. **Therm. Acta** v. 392-393, p. 399-404, 2002.

SALGADO, H.R.N. **Avaliação da Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Desenvolvimento de Metodologia Analítica**. 2006. Tese (Tese de Livre Docência em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SAISHIN, Y.; SILVA, L.R.; SAISHIN, Y.; CALLAHAN, K.; SCHOCH, C.; ABLBEIM, M.; LAI, H.; KANE, F.; BRAZZELL, B.K.; BODMER, D.; CAMPOCHIARO, A. P. Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal neovascularization in porcine model. **Inv. Ophthalm. Vis. Sci.,** v. 44, 4989-4993, 2003.

SHAH, V.P.; TSONG, Y.; SATHE, P.; LIU, P. **Pharm. Res.** v. 15, p. 889, 1998.

SILVA, J. E. **obtenção e caracterização de pellets para liberação prolongada de triancinolona a partir de micropartículas biodegradáveis de ácido poli-lático-co-glicólico.** 85f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

SILVA-JUNIOR, A.A. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SILVA-JUNIOR, A.A.; FORMARIZ, T.P.; SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G. Development and validation of HPLC method for quantitative analysis of triamcinolone in biodegradable microparticles. **J. Bas. Appl. Pharm. Sci.** v. 27, p. 119-126, 2006.

SILVA-JÚNIORa, 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. **Therm. Acta**, v. 467, p. 91-98, 2008.

SILVA-JÚNIORb, A.A.; SCARPA, M.V.; PESTANA, K.C.; MERCURI, L.P.; MATOS, J.R.; OLIVEIRA, A.G. Thermal behaviour and stability of biodegradable spray dried microparticles containing triamcinolone. **Int. J. Pharm.**, v. xx, p. yy, 2008 [accepted].

SINGH, M.; SHIRLEY, B.; BAJWA, K.; SAMARA, E.; HORA, M.; O'HAGAN. Controlled release of recombinantinsulin like growth factor from a novel formulation of polyactide-co-glycolide microparticles*.* **J. Control. Release***.* v. 70, p.21-28, 2001.

SUCKLING, R.D.; MASLIN, K.F. Pseudophakic cystoid macular oe-dema and its treatment with local steroids. **Aust. N.Z.J. Ophthalmol***.* v.16, p.353-359, 1998.

SUITCHMEZIAN, V.; JESS, I.; NÄTHER, C. Investigations on the Polymorphism and Pseudopolymorphism of the Glucocorticoid Triamcinolone: New Findings for a Well-Known Drug. **Crystal Growth Design** v. 7, p. 69-74, 2007.

SULJOVRUJIĆ, E.; IGNJATOVIĆ, N.; USKOKOVIĆ, D.; MITRIĆ, M.; MITROVIĆ, M.; TOMIĆ, S. Radiation-induced degradation of hydroxyapatite/poly L-lactide composite biomaterial. **Rad. Phys. Chem.**, v. 76, p. 722-728, 2007.

TAN, D.T.H.; CHEE, S.P.; LIM, L.; THENG, J.; EDE, M.V. randomized clinical trial of surodex steroid drug delivery system for cataract surgery anterior versus posterior placement of two surodex in the eye. **Ophthalmology** v. 108, p. 2172-2181, 2001.

TAKADA, S; UDA, Y.; TOGUSHI, H.; OGAWA, Y. Aplication of a spray dryer technique in the production of TRH containing injectable sustained release microparticles of biodegradable polymers. **J. Pharm. Sci. Technol.** v. 49, p. 180-184, 1995.

TANO, Y.; CHANDLER, D.; MACHEMER, R. Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. **Ophthalmology** v.90, p.810 –816, 1980.

TRANOS, P.G. WICKREMASINGHE, S.S.; STANGOS, N.T.; TOPOUZIS, F.; TSINOPOULOS, I.; PAVESIO, C.E. Macular edema. **Surv. Ophthalmol.**, v. 49, p. 470-490, 2004.

TICE, TR; COWSAR, DR. Biodegradable controlled-release parenteral systems. **Pharm. Technol.** v. 11, p. 26-35, 1984.

TSAI, T.H; WU, J.W. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in the rat and its interaction with cyclosporin A: a microdialysis study. **Anal. Chim. Acta** v. 448, p. 195-199, 2001.

TSONG, Y.; HAMMESTROM, T.; PRADEEP, S.; VINOD, P.S. **Drug Inform. J.** v. 30, p. 1105, 1996.

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.

USP 28. **United State Pharmacopoeia**, 28_{th} ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convetion, 2005.

VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Prog. Retin. Eye Res.** v. 21, p. 15-34, 2002.

VELLOSO, A.A.; ZHU Q.; HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, M.F. Ganciclovir loaded polymer microhpheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v.38, p. 665-675, 1997.

VIVEK, RS; KHOSLA, L . Bioabsorbable polymers for Implantable Therapeutic systems. **Advanced Drug Deliv.** v. 24, nº 12, p. 1129-1138, 1998.

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.

WEBBER, W.H.; LAGO F.; THANOS, C.; MATHIOWITZ, E. Characterization of soluble, salted loaded degradable PLGA films and their of release of tetracycline. **J. Biomed.Res**. v.41, p. 18-29, 1998.

WOO, L.; LING, M.T. K.; DING, S.Y.; WESTPHAL, S.P. Effect of ionizing radiation on the thermal oxidative stability of medical polymers. **Therm. Acta**, v. 324, p. 179-185, 1998.

WU, XS a. Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. WISE et al., (Ed). **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 1015-1054.

YALVAC, I.S.; BASCI, N.E.; BOZKURT, A; DUMAN, S. Penetration of topically applied ciprofloxacin and ofloxacin into the aqueous humor and vitreous. **J. Cataract Refract. Surg.,** v. 29, p. 487-491, 2003**.**

YAMASHITA, K.; NAKATE, T.; OKIMOTO, K.; OHIKE, A.; TOKUNAGA, Y.; IBUKI, R.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. **Int. J. Pharm.** v. 267, p. 79-91, 2003.

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**. v. 238, p. 186-190, 2000.

YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; TABATA,Y.; OGURA Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.,** v. 52, p. 25-36,2001.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; SAKURAI, E. TABATA, Y.; KIMURA, H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices B. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 57, p. 2033-2046, 2005

XIE, J.; JUNNG, W.; LEE, L. Y.; WANG, C.-H. Encapsulation of protein drugs in biodegradable microparticles by co-axial electrospray. **J. Colloid Interf. Sci.** v. 317, p. 469-476, 2008.

ZHANG, H. GAO, S. Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against Glioma C6 cancer cells *in vitro.* **Int. J. Pharm.** v. 329, p. 122-128, 2007.

ZHOU, T.; LEWIS, H.; FOSTER, R.E; SCHWENDEMAN, S.P. Development of a multiple drug delivery implant for intraocularmanagement of proliferative vitreoretinopathy. **J. Control. Release**. v. 55, p.281-295, 1998.