

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Campus Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO
CIPROFLOXACINO**

Vanessa Maria Meyagusku

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Araraquara – SP

2014

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Campus Araraquara**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO
CIPROFLOXACINO**

Vanessa Maria Meyagusku

Dissertação 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 Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Araraquara – SP

2014

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

M612d Meyagusku, Vanessa Maria
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ciprofloxacino / Vanessa Maria Meyagusku . – Araraquara, 2014
96 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Ciprofloxacino. 3. Triestearina. 4. Monoestearato de glicerila. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

VANESSA MARIA MEYAGUSKU

**“DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO CIPROFLOXACINO”**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em
sessão pública realizada em 23/06/2014, considerou a candidata:

Vanessa Maria Meyagusku

() REPROVADA

(X) APROVADA

1) Examinador (prof. Dr. Marcos Antônio Correa)_____

2) Examinadora (Dra. Gisela Bevilacqua Rolfsen Fereira da Silva)_____

3) Presidente (Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira)_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre fizeram de tudo para eu ter uma boa educação. Eles que sempre me apoiaram, me ajudaram em momentos difíceis e compartilharam momentos de alegria.

Ao meu irmão, minhas avós e meu namorado, que também sempre estiveram presentes e torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar o tempo todo em minha vida e por permitir os aprendizados da vida.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem, pelos conselhos dados e por sempre estarem presentes em minha vida, torcendo por mim.

Ao meu namorado, José Eduardo Boa Ferreira, pelo apoio, paciência, companheirismo e carinho.

Ao professor Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pela orientação, dedicação e amizade.

Aos professores Dra. Leila Aparecida Chiavacci, Dr. Marcos Antônio Correa pelas contribuições no exame geral de qualificação.

Ao professor Dr. Marcos Antônio Correa pela contribuição na defesa.

À Dra. Gisela Bevilacqua Rolfsen Fereira da Silva pela contribuição na defesa e também pela amizade.

Ao professor Dr. Clóvis Augusto Ribeiro pela atenção e contribuições sobre análise térmica.

Ao Gustavo Rossanezi pela ajuda no laboratório e nas discussões.

Às amigas Cristiane, Karisa, Gisela, Lillian, Natália, Kamila e Ana Cláudia pela amizade e pelo conhecimento compartilhado.

Aos amigos e colegas de laboratório, principalmente pela ajuda e amizade.

Às técnicas de laboratório, especialmente à Natália Santos pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Celso V. Santilli pela utilização do DSC, TG e DR-X.

À técnica do laboratório Danúbia pelo auxílio nas análises de DSC e TG

Ao técnico de laboratório Ricardo, pelas análises de DR-X.

Ao Marcelo Assumpção Pereira da Silva pela análise de microscopia de força atômica.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Algumas patologias que acometem o segmento posterior do olho podem levar à deficiência visual e até a completa perda da visão. O ciprofloxacino é um fármaco bastante utilizado para tratar infecções do olho, sendo muito eficaz em relação ao espectro bacteriano e tem sido muito utilizado no tratamento e na prevenção de infecções oculares. Por estas características ele foi o fármaco de escolha para este trabalho. O objetivo foi aumentar a sua ação e modificar o seu perfil de liberação através do desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). As NLS foram obtidas por método de ultrassonicação e compostas pelos lipídeos de monoestearato de glicerila (MEG) e de triestearina (TRI). Também foram testadas formulações adicionando-se Pluronic® F-68 (PLU). As NLS obtidas tiveram diâmetro médio de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta adequados para um sistema de liberação por via intraocular. A eficiência de encapsulação foi obtida a partir em membranas por ultrafiltração-centrifugação, e mostrou-se melhor para as formulações com TRI (85%) e TRI com adição de PLU (89,99%). A microscopia de força atômica pode identificar a diferença na morfologia das NLS de monoestearato de glicerila com as de triestearina, podendo-se perceber que as NLS de monoestearato de glicerila possuíram um formato irregular, enquanto que as NLS de triestearina apresentaram-se com um formato retangular. As análises de calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X demonstraram que o processo de ultrassonicação levou à redução de cristalinidade das NLS, possibilitando assim uma interação do fármaco com a matriz lipídica. Estes resultados demonstraram que as NLS desenvolvidas podem ser testadas como um sistema de liberação modificada para o ciprofloxacino por via intraocular.

Palavras-chave: Nanopartículas lipídicas sólidas; ciprofloxacino, triestearina, monoestearato de glicerila.

ABSTRACT

Some diseases affecting the posterior segment of the eye can lead to impaired vision and even complete loss of vision. Ciprofloxacin is a drug widely used to treat infections of the eye, being very effective against the bacterial spectrum and has been used in the treatment and prevention of eye infections. For these characteristics it was the drug of choice for this work. The objective was to increase their action and modify their release profile through the development of solid lipid nanoparticles (SLN). The SLN was obtained by ultrasonication method composed of the lipids and glyceryl monostearate (GMS) and tristearin (TRI). Formulations were tested by adding Pluronic[®] F-68 too. The SLN obtained had average particle size, polydispersity index and zeta potential suitable for a delivery system for intraocular route. The encapsulation efficiency was obtained from ultrafiltration membrane by centrifugation, and showed to be better for the formulations with tristearin (85%) and tristearin with PLU (89.99%). The atomic force microscopy can identify the difference in the morphology of SLN glyceryl monostearate with the tristearin, and we can see that the SLN of glycerol monostearate has a irregular format, while SLN of tristearin was in a rectangular format. The differential scanning calorimetry and analysis by X-rays diffraction showed that the process of ultrasonication reduced the SLN crystallinity, thus allowing an interaction of the drug with the lipid matrix. These results demonstrate that the SLN developed can be tested as a system of modified release for ciprofloxacin.

Keywords: Solid lipid nanoparticles; ciprofloxacin; tristearin glyceryl monostearate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do olho humano	18
Figura 2 - Formas de incorporação do fármaco nas NLS. A: fármaco distribuído (dissolvido ou disperso) homogeneamente na matriz lipídica; B: fármaco presente na parede das NLS; C: fármaco presente no núcleo das NLS; D: fármaco aderido na superfície das NLS; E: aglomerados de fármaco aderidos na superfície das NLS.	23
Figura 3 - Estrutura química do monoestearato de glicerila (MEG).....	29
Figura 4 - Estrutura química da triestearina (TRI).....	29
Figura 5 - Estrutura química do ciprofloxacino.....	31
Figura 6 – Espectro de varredura de uma solução de 9µg/mL de CIPRO em tampão TRIS HCl 10mM pH 7,2 para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	43
Figura 7 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de CIPRO em Tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2.....	44
Para uma melhor visualização, nas figuras 8 e 9 encontram-se resumidos os resultados dos diâmetros médios e PDI respectivamente para cada uma das formulações.	58
Figura 8 - Valores das médias dos diâmetros das NLS de MB, TB, MB-PLU e TB-PLU em relação à concentração de CIPRO, obtidas no dia de preparo.	58
Figura 9 - Valores dos PDIs das NLS de MB, TB, MB-PLU e TB-PLU em relação à concentração de CIPRO, obtidas no dia de preparo.	59
Figura 10 - Fotomicrografias das NLS de MB (A) e TB (B) obtidas por técnica de ultrassonicação.	60
Figura 11 - Fotomicrografias das NLS de MB na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D), obtidas por técnica de ultrassonicação.	61
Figura 12 - Fotomicrografias das NLS de TB.....	62
Figura 13 - Fotomicrografias das NLS de MB-PLU na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D), obtidas por técnica de ultrassonicação.	63
Figura 14 - Fotomicrografias das NLS de TB-PLU na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D), obtidas por técnica de ultrassonicação.	64
Figura 15 – Curvas DSC (A) e TG/DTG do MEG.....	66

Figura 16 – Curvas DSC (A) e TG/DTG da TRI.....	66
Figura 17 – Curvas DSC (A) e TG/DTG (B) do Brij 72.....	67
Figura 18 – Curvas DSC (A) e TG/DTG do Brij 78.....	67
Figura 19 – Curvas DSC (A) e TG/DTG do PLU.....	68
Figura 20 – Curvas DSC (A) , TG/DTG (B) e TG/DTA (C) do Ciprofloxacino.....	69
Figura 21 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) MB na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.	70
Figura 22 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de MB na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS MB na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).....	72
Figura 23 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de MB-PLU na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.....	73
Figura 24 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de MB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS de MB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).	75
Figura 25 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.	76
Figura 26 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de TB na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS de TB na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).....	77
Figura 27 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB-PLU na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.	78
Figura 28 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de TB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS de TB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).	79
Figura 29 - Difrátogramas dos componentes das NLS separados.....	81
Figura 30 - Difrátogramas das misturas físicas (MF) e NLS de MB na ausência e na presença de CIPRO (A) e das misturas físicas (MF) e NLS de MB-PLU na ausência e na presença de CIPRO (B).	82
Figura 31 - Difrátogramas das misturas físicas (MF) e NLS de TB na ausência e na presença de CIPRO (A) e das misturas físicas (MF) e NLS de TB-PLU na ausência e na presença de CIPRO.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das formulações estudadas.....	38
Tabela 2 - Resultados de estudo de repetibilidade do método de quantificação de CIPRO por espectrofotometria UV-Vis.	45
Tabela 3 - Resultados de estudo de precisão intermediária do método de quantificação de CIPRO por espectrofotometria UV-Vis.	46
Tabela 4 - Valores para cálculo do LD e LQ.	46
Tabela 5 - Valores das absorbâncias e as concentrações recuperadas para cálculo da exatidão.	47
Tabela 6 - Resumo das características das emulsões na determinação do EHL das formulações.	49
Tabela 7 - Diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta (PZ) das NLS de MB e TB armazenadas à 25°C e em temperatura de refrigeração (4°C).	50
Tabela 8 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de MB na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco em relação à concentração de lipídeo, durante período de 60 dias.	52
Tabela 9 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de TB na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco em relação à concentração de lipídeo, durante período de 60 dias.	54
Tabela 10 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de MB-PLU na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco em relação à concentração de lipídeo, no período de 30 dias.	56
Tabela 11 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de TB-PLU na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco, no período de 30 dias.....	57
Tabela 12 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) compostas por Monoestearato de Glicerila: Brij 72: Brij78 (MB) na presença e na ausência do ciprofloxacino e valores de entalpia.....	71
Tabela 13 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas de monoestearato de glicerila com adição de pluronic F-68 (NLS MEG F-68) na presença e na ausência do ciprofloxacino e valores de entalpia.	74
Tabela 14 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB na presença e na ausência do ciprofloxacino.	76

Tabela 15 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB-PLU na presença e na ausência do ciprofloxacino.	79
Tabela 16 – Eficiência de encapsulação para as NLS de MB e MB-PLU.....	85
Tabela 17 – Eficiência de encapsulação para as NLS de TB e TB-PLU.	86

ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AFM	Microscopia de Força Atômica
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio Hidrófilo - Lipófilo
CIPRO	Ciprofloxacino
C	Concentração
CV	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DRX	Difração de Raio-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
Emulsão O/A	Emulsão óleo em água
MB	Composição (Monoestearato de Glicerila: Brij 72 : Brij 78)
MB-CIPRO	Composição (Monoestearato de glicerila: Brij 72: Brij 78: CIPRO)
MB-PLU	Composição (Monoestearato de glicerila: Brij 72: Brij 78: Pluronic [®] F-68)
MB-PLU-CIPRO	Composição (Monoestearato de glicerila: Brij 72: Brij 78: Pluronic [®] F-68 e CIPRO)
MEG	Monoestearato de Glicerila
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NLS	Nanopartículas Lipídica Sólidas
PdI	Índice de Polidispersidade

PLU	Copolímero de Bloco (Pluronic® F-68)
PZ	Potencial Zeta
TB	Composição (Triestearina:Brij 72:Brij 78)
TB-CIPRO	Composição (Triestearina:Brij 72:Brij 78:CIPRO)
TB-PLU	Composição (Triestearina:Brij 72:Brij 78:Pluronic® F-68)
TB-PLU-CIPRO	Composição (Triestearina:Brij 72:Brij 78 Pluronic® F-68:CIPRO)
TRI	Triestearina
U.A	Unidade Arbitrária
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 - Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)	21
2.2 - Técnicas de preparo das NLS	23
2.2.1- Homogeneização por alta pressão	23
2.2.2 - Emulsificação e evaporação do solvente	24
2.2.3 – Ultrassonicação	24
2.3 -Técnicas de caracterização das NLS.....	25
2.4 - Compostos utilizados para preparação de NLS	28
2.4.1 - Monoestearato de Glicerila – MEG	28
2.4.2 - Triestearina (TRI)	29
2.4.3 – Brij 72 [®] e Brij 78 [®]	30
2.4.4 – Copolímero de Bloco (Pluronic [®] F-68).....	30
2.4.5 – Ciprofloxacino	30
3- OBJETIVOS.....	32
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 - Material	33
4.1.1 - Substâncias, Solventes, Matérias-primas e Reagentes.....	33
4.1.2 - Equipamentos e acessórios	33
4.2 - Métodos	35
4.2.1 - Validação da Metodologia Analítica para determinação do CIPRO por espectroscopia de UV-Vis.....	35
4.2.2 – Desenvolvimento das NLS	36
4.2.2.1.1 - Emulsões com 5% de fase lipídica (monoestearato de glicerila) e 5% de tensoativos (Brij 72 e Brij 78).	37
4.2.3 - Preparação das NLS.....	38
4.2.4 - Caracterização das NLS	39
5 - RESULTADOS e DISCUSSÃO	43
5.1 – Validação da metodologia analítica para a determinação de CIPRO por espectroscopia de UV-Vis.	43
5.1.1- Espectro de máxima absorção do CIPRO em tampão TRIS HCl 10mM pH7,2 .	43

5.2 – Desenvolvimento das NLS.....	47
5.2.1 - Determinação da porcentagem de lipídeo e tensoativos	47
5.3 - Caracterização das NLS.....	50
5.3.1 – Diâmetro médio e Potencial Zeta (PZ).....	50
5.3.3 - Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	59
5.3.4 - Microscopia de Força Atômica (AFM)	60
5.3.5 - Análise Térmica	65
5.3.6 - Difração de Raios-X.....	80
5.4 - Eficiência de Encapsulação	85
6 - CONCLUSÃO	87
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1- INTRODUÇÃO

Algumas doenças que acometem o segmento posterior do olho, tais como as vitreoretinopatias, endoftalmite, uveíte crônica e retinite por citomegalovírus podem levar à deficiência visual e até a completa perda da visão (VELEZ e WHITCUP, 1999). A endoftalmite é a responsável por grande parte de infecções no pós-operatório. Para preservar e restaurar a visão, a infecção deve ser tratada imediatamente. As opções de tratamento para infecções bacterianas incluem os antibióticos aplicados por via intravítrea, corticosteróides, antibióticos por via endovenosa e/ou via tópica. Nas infecções causadas por fungos, é feita a aplicação de fármacos antifúngicos diretamente no olho afetado (HUGHES et al., 2005).

O grupo das fluoroquinolonas tem demonstrado excelente atividade contra a maioria das doenças causadas por patógenos gram-positivos e gram-negativos (DIAMOND et al., 1995; GROSS et al., 1997; HOSNY, 2010). O ciprofloxacino que faz parte deste grupo é um fármaco bastante utilizado para tratar e prevenir infecções do olho (APPELBAUM e HUNTER, 2000), tais como a conjutivite bacteriana e a queratite bacteriana (SNYDER-PERLMUTTER et al., 2000; HWANG, 2004, OLIVEIRA, 2006). É um fármaco muito eficaz em relação ao espectro bacteriano (YALVAC, et al., 2003; OLIVEIRA, 2006).

Vários trabalhos têm demonstrado resultados promissores no tratamento de patogenias oculares com o uso de fármacos já conhecidos. No entanto, pode haver dificuldades para alcançar níveis terapêuticos ao fazer o uso de medicamentos convencionais, dificultando o estabelecimento de produtos farmacêuticos seguros, eficazes e viáveis para o uso na área de oftalmologia (SILVA-JÚNIOR, 2008).

Muitas infecções são difíceis de serem tratadas, e uma das principais razões é a dificuldade de transpor agentes antimicrobianos pelas membranas celulares e a baixa atividade da substância ativa no interior das células, diminuindo a atividade destes compostos (ZHANG et al, 2010).

A aplicação tópica e a injeção intraocular podem ser utilizadas para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho. No entanto, ao se utilizar tais métodos, podem surgir problemas relacionados à biodisponibilidade do fármaco, incluindo também efeitos colaterais e tratamentos repetidos desconfortáveis para conseguir alcançar o nível terapêutico do fármaco. O risco de complicações aumenta com a frequência com que as injeções intravítreas são aplicadas (DIEBOLD e CALONGE, 2010; HERRERO-VANRELL e REFOJO, 2001).

Na área farmacêutica, a ciência junto com a tecnologia buscam soluções para diversas doenças do mundo moderno, que incluem o controle da substância ativa, podendo direcioná-la para um local ou algum órgão específico do organismo. Com isso, a velocidade de liberação pode ser modificada e a atividade ser mantida por tempo prolongado (VANDERWOOT E LUDWIG, 2007; SAHOO et al., 2008).

As NLS foram desenvolvidas como um sistema alternativo para encapsulação de fármacos em relação aos sistemas coloidais tradicionais (emulsões, lipossomas, nanopartículas poliméricas, entre outros). Uma grande vantagem das NLS é a sua excelente estabilidade físico-química, proporcionando maior proteção contra a degradação de fármacos lábeis (TREVASKIS et al., 2008).

As NLS possuem baixa toxicidade, capacidade de encapsular fármacos hidrofóbicos e propriedades oclusivas (MEHNERT E MADER, 2001). Outra vantagem é que a matriz lipídica pode ser produzida a partir de lipídeos

biodegradáveis e que não são tóxicos (FREITAS e MÜLLER, 1998a; PARHI e SURESH, 2010).

Existe um grande interesse por estes sistemas na área farmacêutica, que está relacionado às vantagens que essas partículas possuem, além do potencial para produção em escala industrial (RUKTANONCHA et al., 2009).

Uma estratégia para manter as partículas no local de ação é a modificação da superfície da partícula com materiais que melhorem a bioadesão e proporcionem um contato mais eficiente do fármaco com os tecidos locais (Silva, 2002).

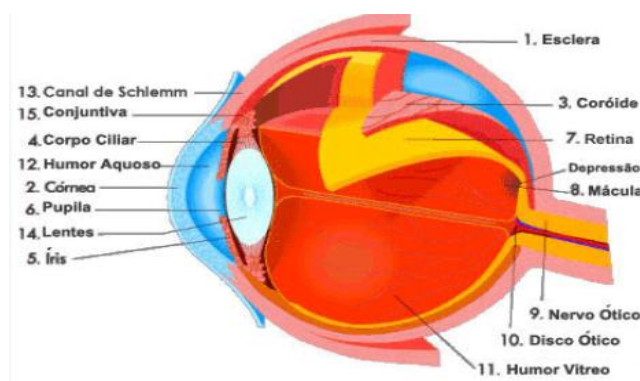
Os resultados obtidos de pesquisas com nanopartículas para a via intraocular sugerem que a medicina na área oftálmica poderá ter um grande benefício utilizando-se desta tecnologia em escala nanométrica (DIEBOLD e CALONGE, 2010).

Estudos voltados para sistemas de liberação controlada podem levar a alterações significativas nas etapas envolvidas na farmacocinética e farmacodinâmica de determinado fármaco, podendo trazer uma série de vantagens quando comparados aos sistemas convencionais.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Para estudar a estrutura do olho, este é dividido em dois segmentos principais: o anterior e posterior. O segmento anterior é formado pela córnea, câmara anterior, íris, cristalino e corpo ciliar. O segmento posterior é constituído pela retina, coróide e corpo vítreo (OGURA 2001; URTII, 2006).

Figura 1- Estrutura do olho humano



Fonte: (<http://drerickabrazilmassa.site.med.br/index.asp?PageName=Anatomia-20e-20Fisiologia-20do-20Olho>) . Acesso em 20 julho de 2013.

A aplicação de fármacos no segmento anterior tem a desvantagem devido à baixa biodisponibilidade do fármaco, que ocorre pelos diversos mecanismos de defesa do olho, os quais incluem a produção da lágrima, barreira da córnea e barreira hemato-ocular. Esta última é responsável por ser um obstáculo para substâncias exógenas (OGURA, 2001; URTII, 2006; NAGARWAL et al, 2009) e também é composta por 2 barreiras, a hematoaquosa que dificulta o acesso de substâncias hidrofílicas do plasma para o humor aquoso e a barreira hematorretiniana, que limita a distribuição do fármaco no epitélio ocular (URTII, 2006).

A administração de formas farmacêuticas convencionais acaba sendo limitada devido à presença das barreiras oculares. Primeiramente, uma quantidade que varia entre 1-10% da dose administrada consegue alcançar os tecidos do segmento anterior do olho, e somente uma pequena fração que foi absorvida, conseguirá chegar ao segmento posterior (MEISNER e MEZEI, 1995). Ao todo, menos de 5% da dose aplicada topicamente consegue chegar à cavidade intraocular (KEISTER et al., 1991; MAINARDES et al., 2005).

Devido a dificuldade do fármaco chegar ao segmento posterior, muitas vezes é necessário a administração de fármacos por via intravítrea ou periorcular (HERRERO-VANRELL e REFOJO, 2001; PAGANELLI et al., 2010). No entanto, as injeções intravítreas podem causar complicações sérias, como as endoftalmites, deslocamento da retina e catarata (MELLO-FILHO et al., 2010).

Os Sistemas de Liberação de Fármacos podem controlar a localização temporal e espacial das moléculas bioativas *in vivo*, por meio do controle dos parâmetros físico-químicos da formulação (SWARBRICK, 2007). A redução de efeitos colaterais, toxicidade e diminuição da frequência de administração são benefícios que também podem ser obtidos (AULTON, 2005; SWARBRICK, 2007).

Um sistema de liberação modificada (SLM) é capaz de disponibilizar o fármaco de forma diferente do perfil de liberação das formas farmacêuticas convencionais (ANSEL et al., 2005).

Sistemas nanoestruturados são aplicáveis no controle da liberação de fármacos, podendo controlar a velocidade com que as substâncias atravessam as barreiras biológicas, penetram na circulação e atingem o alvo farmacológico. Outra vantagem desses sistemas é direcionar o fármaco no organismo, de forma a evitar o seu acúmulo em tecidos não específicos, tornando-o menos tóxico e elevando a

sua concentração no local na qual irá exercer seu efeito farmacológico (OLIVEIRA et al., 2004).

Sistemas nano e microemulsionados podem melhorar a solubilização de fármacos lipofílicos em água e protegê-los contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo (FORMARIZ et al., 2005). No entanto, o uso de nanoemulsões como sistema de liberação sustentada é limitado, podendo ocasionar uma rápida liberação do fármaco, devido o seu reduzido diâmetro e o seu estado líquido (MEHNERT e MADER, 2001). O núcleo sólido possibilita um maior controle na cinética das substâncias encapsuladas e melhora a estabilidade de componentes lipofílicos sensíveis quimicamente (MULLER et al., 1997; HELGASON et al., 2009).

As NLS podem ser usadas por várias vias de administração, incluindo as vias ocular (SEYFODDIN et al., 2010), oral (RAWAT et al., 2011), parenteral (NAYAK et al., 2010) e cutânea (ZHANG e SMITH 2011), devido seu diâmetro reduzido (50 a 1000 nm) e biocompatibilidade (ARAUJO et al, 2010; MUCHOW et al., 2008).

Como a matriz destes sistemas é de natureza lipídica, os métodos de preparação evidenciam melhores resultados para fármacos de natureza hidrofóbica. Os lipídeos que cristalizam em formas altamente organizadas, tais como os triacilgliceróis, constituídos por um único tipo de ácido graxo, originam sistemas com poucos locais para acomodar as substâncias ativas, induzindo sua expulsão da matriz lipídica sólida. Como o fármaco vai se localizar entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos cristais diminui a eficiência de encapsulação (MULLER et al., 2000; MULLER et al., 2007).

Os lipídeos mais utilizados na obtenção de NLS geralmente são os glicerídeos (tri e monoestearato de glicerila), ácidos graxos de alto ponto de fusão, como o esteárico e palmítico, esteróis (colesterol) e ceras (palmitato de cetila). Também são utilizados diversos emulsificantes e polímeros, como os sais biliares (taurodeoxicolato), lecitinas e copolímeros do polióxidoetileno e polióxidopropileno (poloxamer) para evitar a agregação das partículas e estabilizar a dispersão da fase lipídica (MEHNERT e MADER, 2001).

As misturas de mono, di e triacilgliceróis, formam estruturas com muitas imperfeições, originando NLS com maior capacidade para incorporar as substâncias ativas (SOUTO et al., 2011).

Um exemplo promissor de material que pode ser utilizado para o desenvolvimento de NLS é representado por uma classe conhecida como copolímeros de bloco Pluronic® ou poloxamers. Estes materiais têm origem sintética. Possuem um núcleo central hidrofóbico ligado ou envolvido por cadeias hidrofílicas (Kabanov et al., 1995). São blocos de copolímeros que contêm duas unidades de polioxietileno (parte hidrofílica) intercaladas por uma unidade de polioxipropileno (parte hidrofóbica). Eles são materiais biocompatíveis e possuem a característica de gelificarem na temperatura do corpo humano. Com isso pode-se dificultar a saída do fármaco (GU e ALEXANDRIS, 2004, OLIVEIRA, 2006).

2.1 - Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

O termo nanopartículas lipídicas sólidas foi introduzido por GASCO (1993) e MÜLLER & LUCKS (1996). Elas foram desenvolvidas, aplicando-se altas intensidades de agitação para dispersar uma fase lipídica fundida em um

dispersante quente, com adição de tensoativo, e com resfriamento subsequente para obter o núcleo sólido. A partir destes estudos, vários trabalhos foram desenvolvidos, tanto empregando o método original e também outros foram desenvolvidos posteriormente (MÜLLER et al., 2000; MEHNERT e MADER, 2001; MÜLLER et al., 2002).

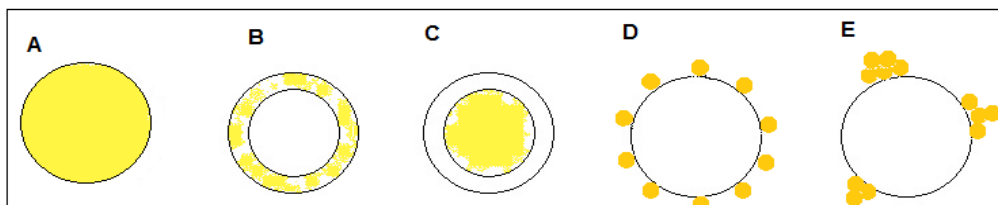
As NLS são preparadas por uma variedade de lipídeos e são estabilizadas por tensoativos biocompatíveis, podendo ser aniônicos, catiônicos ou não iônicos (WONG et al., 2007).

As NLS têm a estrutura que se assemelha às emulsões. A diferença está no núcleo, pois é formado por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e não por fase oleosa líquida como nas emulsões (MÜLLER et al, 2000).

Existem algumas vantagens na produção de NLS em relação à outros sistemas coloidais, tais como poder controlar a liberação da substância ativa e o seu alvo, aumentar a estabilidade do fármaco, utilizar alta concentração de fármaco, ter a possibilidade de incorporar fármacos hidrofóbicos, o sistema não ser tóxico, pode-se evitar o uso de solventes, produção em larga escala e a possibilidade de esterilização (MÜLLER e RUNGE, 1998; MEHNERT e MÄDER, 2001).

O fármaco pode ser encontrado no núcleo, na parede lipídica ou disperso homogeneamente na matriz lipídica (RADTKE et al., 2005; SANTOS, 2010). Podem ocorrer também situações em que o fármaco fica aderido na superfície da partícula (SCHÄFER-KORTING et al., 2007).

Figura 2 - Formas de incorporação do fármaco nas NLS. A: fármaco distribuído (dissolvido ou disperso) homogeneamente na matriz lipídica; B: fármaco presente na parede das NLS; C: fármaco presente no núcleo das NLS; D: fármaco aderido na superfície das NLS; E: aglomerados de fármaco aderidos na superfície das NLS.



Adaptado de: SCHÄFERT-KORTING et al., 2007.

2.2 - Técnicas de preparo das NLS

As NLS podem ser preparadas por diversas técnicas. A seguir estão descritas algumas que são bastante utilizadas no preparo de NLS.

2.2.1- Homogeneização por alta pressão

Esta técnica tem a vantagem de proporcionar ótimas condições para transposição de escala e também de não ser necessário o uso de solventes orgânicos. O uso desta técnica pode ser à frio ou à quente (PARDEIKE et al., 2009; SANTOS, 2010). O homogeneizador de alta pressão possui um pistão, no qual o líquido é empurrado sob alta pressão por um orifício com diâmetro micrométrico, com uma velocidade muito rápida. Esta colisão possibilita a formação de partículas com diâmetros nanométricos (LIPPACHER et al., 2000; MEHNERT e MADER, 2001).

Na homogeneização à quente o fármaco é dissolvido ou disperso no lipídeo fundido e estes são adicionados em uma solução aquosa com tensoativos, dando origem a uma pré-emulsão, que é colocada no homogeneizador e submetida à alta

pressão. Depois a nanoemulsão é resfriada e com isso o lipídio se solidifica, dando origem às NLS (ATTAMA e MÜLLER – GOYMANN, 2008; MARCATO, 2009). Na homogeneização à frio, é utilizado o lipídio no estado sólido. Nesta técnica, a substância ativa é dissolvida ou dispersa no lipídeo fundido, e em seguida esta mistura é solidificada em gelo seco ou nitrogênio líquido, depois moída e o pó é disperso em uma solução com tensoativos e então submetida à homogeneização (DEMIREL et al., 2001; MARCATO, 2009).

2.2.2 - Emulsificação e evaporação do solvente

Este método é adequado para substâncias ativas termossensíveis, já que não é necessário o uso de aquecimento. A substância é dissolvida em um solvente imiscível em água e esta mistura é emulsificada em água. Depois o solvente é evaporado, e o lipídio precipita em água (MEHNERT e MÄDER, 2001; WISSING et al., 2004).

2.2.3 – Ultrassonicação

No método de ultrassonicação, as partículas são formadas por ondas ultrassônicas gerando cavitação em líquidos. Quando um líquido é submetido ao processo de sonicação com alta intensidade, as ondas sonoras se propagam no meio líquido, ocorrendo uma alternância de ondas sonoras de alta e baixa pressão geradas pelo ultrassom. Na fase de baixa pressão e alta intensidade, as ondas criam bolhas de vácuo, e elas aumentam de diâmetro até que não conseguem mais

absorver energia, e atingindo a fase de alta pressão, elas são comprimidas até implodirem (HIELSHER, 2005).

O tempo de sonicação pode prejudicar substâncias termolábeis e/ou voláteis porque a temperatura tende a aumentar conforme maior for o tempo de sonicação. Uma outra desvantagem é a contaminação da amostra pelo metal da haste do sonificador, que libera titânio. Isto pode ser resolvido centrifugando a amostra, precipitando o titânio (MAA e HSU, 1999).

2.3 -Técnicas de caracterização das NLS

A caracterização das NLS é muito importante para prever o comportamento das partículas in vivo e também para se ter conhecimento da sua estabilidade durante o armazenamento. Diversos fatores podem interferir no modo de liberação da substância ativa, tais como o diâmetro da partícula, o modo de associação do ativo com a matriz lipídica, valor do potencial zeta, tipo do lipídeo e tensoativos utilizados (SANTOS, 2010).

- Morfologia

A morfologia das NLS pode ser observada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da microscopia eletrônica de transmissão (MET), que fornecem informações sobre o formato e o diâmetro das partículas, bem como a presença de diferentes populações (SANTOS-MAGALHÃES et. al, 2000; HALL et al., 2007). A MEV possibilita também verificar a rugosidade e porosidade das partículas (MAGENHEIM e BENITA, 1991). Na técnica de MEV os elétrons são

retroespalhados e os elétrons secundários são emitidos da superfície da amostra para formarem a imagem (HERRERA e SAKULCHAICHAROEN, 2009).

Outra técnica é a microscopia de força atômica, que fornece informações da estrutura tridimensional e imagens topográficas em escala nanométrica, proporcionando informações direta sobre a superfície. Esta técnica utiliza uma ponta de sonda para gerar a imagem (SCHAFFAZICK et al., 2003b).

- Diâmetro de partícula e índice de polidispersidade

A composição e o método empregado podem interferir no diâmetro das partículas. É muito importante ter o conhecimento sobre o diâmetro médio das partículas e a distribuição de sua população dependendo da via de administração (SCHAFFAZICK et al, 2003a). Uma das principais técnicas utilizada é conhecida por espalhamento dinâmico de luz (DLS), que faz a medida do movimento browniano das partículas, determinando o diâmetro hidrodinâmico delas em suspensão, sendo que o seu valor pode ser influenciado por camadas de tensoativos e/ou camada de hidratação. Esta técnica é utilizada somente para partículas com diâmetro entre 3nm até 1 μ m (HEURTAULT et al, 2003; UNER, 2006). Assim a intensidade da luz dispersa irá variar com o diâmetro das partículas e a velocidade dos movimentos brownianos, sendo que as partículas menores têm um movimento mais rápido que as partículas maiores, e consequentemente dispersam menos luz (FINSY e JAEGER, 1991).

O índice de polidispersidade (PDI) fornece informações sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. Quanto menor o seu valor, maior será a homogeneidade do diâmetro de partículas no sistema e vice-versa (LIU e WU, 2010). Para as NLS, valores de PDI inferiores a 0,300 são bastante aceitáveis e

dependendo da via de administração podem ser aceitos até valores maiores (PATHAK e NAGARSENKER, 2009; DAS e CHAUDHURY, 2011).

- Potencial Zeta

Ele é um indicador da carga elétrica total da superfície das NLS, podendo corresponder à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela presença de íons ou moléculas iônicas no meio aquoso (MAGENHEIM e BENITA, 1991; SCHAFFAZICK et al., 2003b). O valor do potencial zeta pode ser positivo ou negativo, que depende das características da superfície das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003b). Ele pode auxiliar nas informações sobre a estabilidade das NLS, pois geralmente há uma menor agregação de partículas quando há a repulsão eletrostática entre elas (SCHAFFAZICK et al, 2003a).

Avaliação da cristalinidade do lipídeo

- Difração de raios-X

Esta técnica permite diferenciar compostos cristalinos e amorfos (UNER, 2006). Assim, ela é válida para fornecer informações que podem ser importantes em relação às partículas produzidas e às matérias-primas utilizadas (BUNJES e UNRUH, 2007). Tanto partículas nanométricas como as de maior diâmetro podem ser analisadas por difração de raio-X (MEHNERT e MADER, 2001).

- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

É uma técnica que fornece informações das propriedades físicas da formulação, indicando o comportamento de fusão da substância e a relação entre o

ganho ou perda de calor em função de mudanças físicas e/ou químicas provocadas pela temperatura. Com esta técnica, é possível ter conhecimento também sobre a cristalinidade das partículas. A cristalinidade de um lipídeo pode influenciar na eficiência de encapsulação, e na velocidade de liberação da substância ativa, bem como a expulsão desta durante o tempo de estocagem (ATTAMA, 2006; SANTOS, 2010).

A técnica de DSC pode ser útil também no estudo das interações intermoleculares entre a substância ativa e adjuvantes, podendo auxiliar sobre possíveis incompatibilidades físicas ou químicas (VENKATARAN et al., 1995; SCHAFFAZICK, 2003a).

- Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

A TG é uma técnica que fornece informações de variação de massa em função do tempo ou temperatura em condições atmosféricas estabelecidas. Os resultados fornecem informações relacionadas a composição da amostra e sua estabilidade térmica. A DTG é a derivada primeira da curva TG. A DTG é composta por picos correspondentes às variações de massa (MATOS e MACHADO, 2004; SILVA et al., 2007).

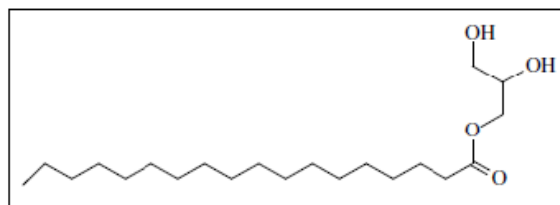
2.4 - Compostos utilizados para preparação de NLS

2.4.1 - Monoestearato de Glicerila – MEG

O MEG é um monoglicerídeo formado por uma cadeia de ácido esteárico, possuindo fórmula molecular $C_{21}H_{42}O_4$. É um composto que é utilizado em várias

áreas, incluindo principalmente a farmacêutica, cosméticos e alimentos. Este lipídeo possui ponto de fusão na faixa de 56-60°C.

Figura 3 - Estrutura química do monoestearato de glicerila (MEG).

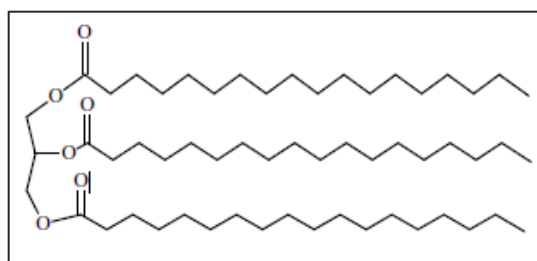


Fonte: MARCATO, 2009.

2.4.2 - Triestearina (TRI)

A triesterina é um triglicerídeo formado por 3 cadeia de ácido esteárico, possuindo fórmula molecular $C_{57}H_{110}O_6$. Este lipídeo possui ponto de fusão na faixa de 68-70°C (KUNTSCHE e MÄDER, 2010).

Figura 4 - Estrutura química da triestearina (TRI)



Fonte: MARCATO, 2009.

Este composto pode ser cristalizar em 4 formas cristalinas (γ , α , β' e β), sendo a forma β a mais estável, e a sua estruturação pode estar relacionada com a velocidade de seu resfriamento e a forma de agitação do preparo (HARTEL, 2001).

2.4.3 – Brij 72[®] e Brij 78[®]

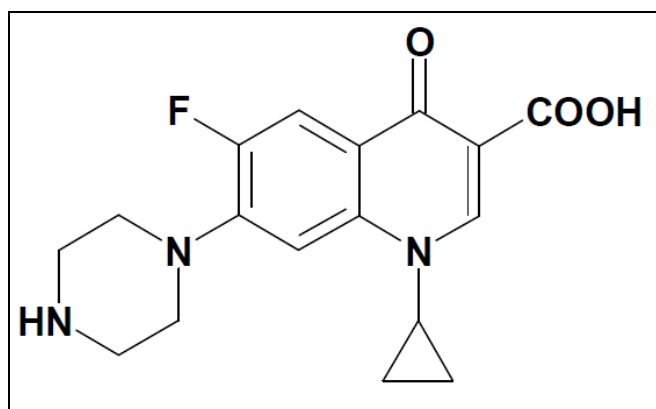
O nome químico do Brij 72[®] é polioxietileno 2 estearil éter e possui valor de EHL 4,9. O nome químico é Brij 78[®] polioxietileno 20 estearil éter e possui valor de EHL 15,3. Os dois são tensoativos não-iônicos.

2.4.4 – Copolímero de Bloco (Pluronic[®] F-68)

O Pluronic[®] F-68 pertence à classe dos copolímeros de bloco, que são formados por uma porção hidrofóbica (óxido de polietileno) que é ligada ou envolvida por cadeias hidrofilicas (óxido de propileno). O uso de copolímeros de bloco está relacionado à uma melhora na biodisponibilidade de compostos antibacterianos e antifúngicos (MA et al, 2008).

2.4.5 – Ciprofloxacino

O ciprofloxacino é um antibiótico derivado do ácido fluorquinolônico e devido à sua baixa toxicidade e seu amplo espectro de ação, é muito utilizado na profilaxia e no tratamento de doenças oculares (OZTURK et al, 2000; YALVAC et al, 2003, SILVA, 2008). Pelo fato de possuir uma ação bactericida considerada rápida tanto na fase proliferativa como na fase vegetativa, é um fármaco bastante prescrito para infecções bacterianas (SILVA, 2002).

Figura 5 - Estrutura química do ciprofloxacino

Fonte: SILVA, 2008.

O ciprofloxacino é bastante utilizado na forma de colírio, porém vários trabalhos demonstraram a baixa eficiência na permeação deste fármaco para a via ocular (OZTURK et al, 2000; ROBERTSON et al., 2005).

Uma outra alternativa para a via ocular, são as injeções intravítreas e subconjuntivais, que possuem desvantagens como o desconforto para o paciente e o risco de lesões por causa da frequência de aplicação das injeções. E também há relatos da baixa biodisponibilidade do fármaco, devido aos fenômenos fisiológicos do olho que fazem a remoção da substância ativa (OGURA, 2001).

Há relatos na literatura que administrações intravítreas de ciprofloxacino superiores a 100 ug podem causar toxicidade corneana aguda em coelhos (STEVENS et al., 1991, MENDONÇA DA SILVA, 2012).

Este trabalho tem a proposta de desenvolver um sistema de liberação controlada para o ciprofloxacino que possa ser utilizado para a via intraocular.

3- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando os lipídeos monoestearato de glicerila (MEG) ou triestearina (TRI), contendo o antibiótico ciprofloxacino.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material

4.1.1 - Substâncias, Solventes, Matérias-primas e Reagentes

- Água Milli-Q;
- Balões volumétricos de 50 e 10mL;
- Brij 72[®] - Polioxietileno 2 estearil éter (Sigma);
- Brij 78[®] - Polioxietileno 20 estearil éter (Sigma);
- Ciprofloxacino (Galena, Brasil);
- Monoestearato de glicerila (Audaz);
- Poloxamer 188 (Sigma);
- Triestearato de glicerila (Sigma);
- Tris (hidroximetil) aminometano p.a. (Merck, Alemanha)

4.1.2 - Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético, TE085;
- Agitador Ultra- Turrax (Ika, mod. TC 25 basic);
- Analisador de partículas Malvern, Zetasizer Nano ZS;
- Balança analítica – METTLER®, modelo H 51;
- Balança semi-analítica – GEHAKAG mod. AG 200 ;
- Balança termoanalítica TA Instruments, modelo SDT-Q600
- Barras de Agitação Magnética;
- Bomba a vácuo – Tecnal;

- Célula calorimétrica TA Instruments, modelo DSC – Q100;
- Centrífuga Fanen, Excelsa[®] II mod. 206BL;
- Cubetas para espectrofotometria, capacidade de 4mL, caminho óptico de 1cm - Spectrocell[®];
- Espectrofotômetro de Infravermelho FTIR-8300 – SHIMADZU Corporation;
- Espectrofotômetro de UV-VIS Kayak XA – Hewlett, Packard 89090A e 8453;
- Liofilizador, Thermo Fisher Scientific, modelo EDWARDS MODULYO[®] - 115 (USA); - Microscópio de força atômica Bruker, modelo Dimension Icon;
- Membranas de filtração com porosidade de 50 KDa (Millipore);
- Microscópio eletrônico de varredura - JEOL[®] modelo JSM T330A;
- pHmetro de bancada – Digimed, mod DM-23;
- Pipetas de Pasteur;
- Placas de petri;
- Sonicador, Q – Sonica Sonicators – mod. Q-700;
- Tubos de centrífuga;
- Tubos de ensaio;
- Tubos de sonicação;
- Ultrassom, Unique Ultrasonic Cleaner, mod. VSC 2800A;
- Vidrarias de uso em laboratório
- Vórtex QL-901.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Validação da Metodologia Analítica para determinação do CIPRO por espectroscopia de UV-Vis.

4.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção (λ máx.) do CIPRO em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2.

Para determinar o comprimento de onda máxima do CIPRO, foi feita uma varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 400nm, na concentração de 9 $\mu\text{g/mL}$ do fármaco em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2.

4.2.1.2 – Linearidade

A curva analítica do CIPRO em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 foi construída a partir de uma solução estoque, em que foi pesado 2mg de CIPRO e transferido para um balão volumétrico de 50mL com adição de 5mL de etanol. Em seguida adicionou-se tampão Tris-HCl até metade do balão e levado ao ultrassom por 5 minutos para auxiliar na solubilização. Feito isto, o volume foi completado com tampão Tris-HCl até o menisco. Obteve-se uma concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução, foram obtidas diferentes soluções com concentrações na faixa de 1 a 15 $\mu\text{g/mL}$. As diluições foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 2,0 $\mu\text{g/mL}$, 3,0 $\mu\text{g/mL}$, 5,0 $\mu\text{g/mL}$, 7,0 $\mu\text{g/mL}$, 9,0 $\mu\text{g/mL}$, 12,0 $\mu\text{g/mL}$ e 15,0 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.1.3 – Precisão

A precisão foi avaliada por quantificação de três níveis de concentração das soluções (concentrações baixa, média e alta), que foram realizadas em triplicata em um dia (repetibilidade) e em dois dias diferentes (precisão intermediária).

4.2.1.4 - Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e LQ foram calculados para análise quantitativa de amostras em triplicata em concentrações baixas.

4.2.1.5 – Exatidão

A exatidão foi avaliada para três níveis de concentrações (baixa, média e alta) e foi calculada a porcentagem de recuperação do CIPRO.

4.2.2 – Desenvolvimento das NLS

4.2.2.1 - Determinação da porcentagem de lipídeo e tensoativos

Inicialmente foi necessário escolher qual a melhor proporção de lipídeo e tensoativo para a formulação, já que isto pode interferir no diâmetro das partículas e também na coalescência ou não da formulação. Dessa forma, várias formulações foram feitas variando-se o valor do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) para obtenção de uma formulação estável.

4.2.2.1.1 - Emulsões com 5% de fase lipídica (monoestearato de glicerila) e 5% de tensoativos (Brij 72 e Brij 78).

Foram testadas emulsões O/A com valores de EHL entre 6 a 15. Os cálculos foram feitos para se obter as proporções desejadas de lipídeo e mistura dos dois tensoativos. As emulsões foram compostas por 5% de monoestearato de glicerila (MEG) (PF=56°C) e 5% de dois tensoativos, sendo compostos por Brij 72 (EHL= 4,9 e PF= 44-45°C) e Brij 78 (EHL= 15,3 e PF= 40-45°C). Com as proporções adequadas pesadas, a fase oleosa (composta pelo lipídeo e Brij 72) foi fundida até 70°C, e a fase aquosa (composta por água e Brij 72) foi fundida à mesma temperatura da fase oleosa. Após atingirem esta temperatura, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e a mistura foi colocada no Ultraturrax durante 4 minutos e velocidade de 8000rpm. Após isto, as emulsões foram armazenadas em tubos de vidro e guardadas para observação.

4.2.2.1.2 - Emulsões com 3% de fase lipídica e 2% de tensoativos

Foi feito com o mesmo procedimento do item anterior, modificando-se apenas as concentrações do lipídeo (MEG) e da mistura dos tensoativos, os quais foram testados nas concentrações de 3% e 2% respectivamente.

O valor de EHL de cada formulação foi calculado através da fórmula abaixo:

$$\text{EHL requerido} = \frac{\%A \times \text{EHL}_A + \%B \times \text{EHL}_B}{100}$$

4.2.3 - Preparação das NLS

As NLS foram preparadas por meio da técnica de emulsificação seguida de ultrassonicação. A fase oleosa da emulsão foi composta pelo lipídeo (MEG ou TRI) e o tensoativo de caráter lipofílico (Brij[®] 72), os quais foram aquecidos sob agitação constante até temperatura de 10°C acima do ponto de fusão do lipídeo. A fase aquosa foi composta por água e o tensoativo de caráter hidrofílico (Brij[®] 78), que foram aquecidos à mesma temperatura da fase oleosa, e esta fase foi vertida sobre a fase oleosa. Esta emulsão ainda quente foi colocada no sonicador em banho quente (40°C) durante 15 minutos, com pulsos de 1min e pausa de 30 segundos e amplitude de 25% para obtenção de uma nanoemulsão. Posteriormente as nanoemulsões foram resfriadas à temperatura ambiente, para a solidificação do lipídeo. A composição de cada uma das formulações está mostrada na tabela 1.

Tabela 1 – Composição das formulações estudadas

Amostra	Componentes	Proporção (%m/m)
MB	MEG:Brij 72:Brij78	3,0:0,44:1,56
MB-PLU	MEG:Brij 72:Brij78:PLU	3,0:0,44:0,78:0,78
TB	TRI:Brij 72:Brij78	3,0:0,44:1,56
TB-PLU	TRI:Brij 72:Brij78:PLU	3,0:0,44:0,78:0,78

4.2.3.1 - Preparação das NLS contendo CIPRO

Para preparar NLS contendo CIPRO, seguiu-se o mesmo procedimento anterior e as porcentagens de 1%, 5%, 10%, 20% e 30% de fármaco em relação à concentração da matriz lipídica (3%) foram testadas. O fármaco foi colocado junto com o lipídeo e seguiu-se com o mesmo procedimento anterior.

4.2.4 - Caracterização das NLS

4.2.4.1 – Diâmetro médio

A distribuição do diâmetro das partículas foi determinado pelo analisador de diâmetro Zetasizer Nano ZS (ângulo de 173°). As suspensões de NLS foram diluídas na proporção de 1:100 em água Milli-Q. As análises foram realizadas em triplicata, sendo calculada a média e o desvio-padrão.

4.2.4.2 - Potencial Zeta

O Potencial Zeta também foi obtido pelo analisador Zetasizer Nano ZS. O preparo das amostras foi igual à análise de diâmetro, sendo que as suspensões de NLS foram diluídas na proporção de 1:100 em água Milli-Q. As análises foram realizadas em triplicata, sendo calculada a média e o desvio-padrão.

O Potencial Zeta (PZ) é um parâmetro importante de se avaliar, pois ele pode auxiliar nas informações sobre a estabilidade das NLS, podendo haver menor agregação de partículas quando há a repulsão eletrostática entre elas (SCHAFFAZICK et al, 2003a).

Morfologia

4.2.4.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise da morfologia das NLS de MB (MEG:Brij 72:Brij78) e TB (TRI:Brij 72:Brij78), estas foram diluídas na proporção de 1:100 em água Milli-Q. Em seguida as amostras foram colocadas sob a placa e deixou-se secar à temperatura ambiente. É necessário que as amostras estejam secas devido à aplicação do vácuo. As amostras foram analisadas pelo microscópio de varredura empregando-se voltagem de 20kv.

4.2.4.4 - Microscopia de Força Atômica

Para análise da morfologia das NLS de MB, TB, MB-PLU e TB-PLU, as amostras foram diluídas em uma proporção de 1:100 em água Milli-Q. Em seguida 5 μ L de cada amostra foi colocada sob a placa de mica e deixou-se secar à temperatura ambiente para a análise. O preparo foi feito desta maneira, de forma que a amostra aderisse à placa de mica, pois deve ocorrer a imobilização da amostra para que o tip gere a imagem topográfica das partículas. A análise foi feita no modo de não-contato, pois não há risco de destruir as partículas.

4.2.4.5 - Análise Térmica

Com o objetivo de obter informações sobre as interações entre o fármaco e os lipídeos, o estado físico das partículas e possíveis alterações após o processo de obtenção foram realizados estudos de DSC e TG/DTG.

4.2.4.5.1 – Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC de aquecimento das amostras foram obtidas na faixa de 0-200°C, sob atmosfera de N₂ (50mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. Utilizou-se padrão de índio para calibração e as amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio fechados.

As entalpias (ΔH) foram calculadas pelo software TA Instruments Universal Analysis.

4.2.4.5.2 – Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas TG/DTG das amostras foram obtidas no intervalo de 25-600°C, atmosfera de N₂ (50mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. As amostras foram colocadas em cadinhos de platina.

As curvas de termogravimetria derivada foram obtidas pelo software TA Instruments Universal Analysis.

4.2.4.6 - Difração de raio-X

Foram analisadas as NLS de MB, TB, MB-PLU e TB-PLU, além dos componentes isolados. As análises foram realizadas com difração em ângulo 2 θ , variando de 4° a 70°. Foi utilizado o difratômetro Rikugu® modelo Dmax 2500PC e utilizou-se radiação CuK α de $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, com monocromador de grafite.

4.2.4.7 – Eficiência de Encapsulação

A Eficiência de Encapsulação (EE) foi obtida a partir da técnica de ultrafiltração-centrifugação. Utilizou-se uma membrana de 100 kDa, que faz a

separação da fase aquosa (contendo o fármaco livre) da parte da suspensão coloidal, sendo possível determinar a concentração do fármaco livre. Assim a concentração de fármaco associada às NLS (Q encapsulada) é calculada a partir da diferença da concentração total da formulação com a fração livre do fármaco.

A EE foi calculada conforme a equação abaixo.

$$EE \% = \frac{Q \text{ encapsulada}}{Q \text{ teórica}} \times 100$$

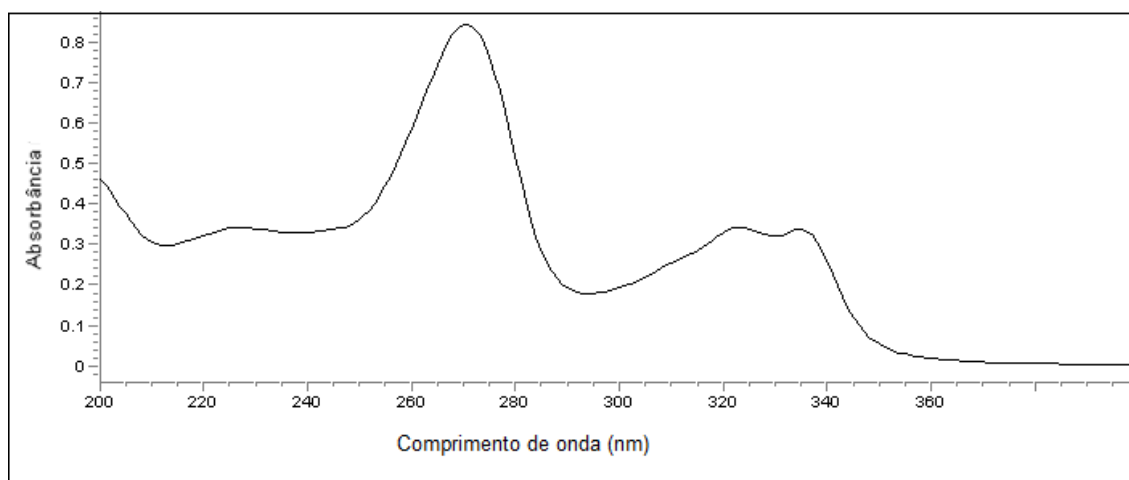
5 - RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 – Validação da metodologia analítica para a determinação de CIPRO por espectroscopia de UV-Vis.

5.1.1- Espectro de máxima absorção do CIPRO em tampão TRIS HCl 10mM pH7,2

A figura 6 mostra o comprimento de onda máxima absorção do CIPRO, na concentração de 9 µg/mL em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,2 foi obtido em 271nm.

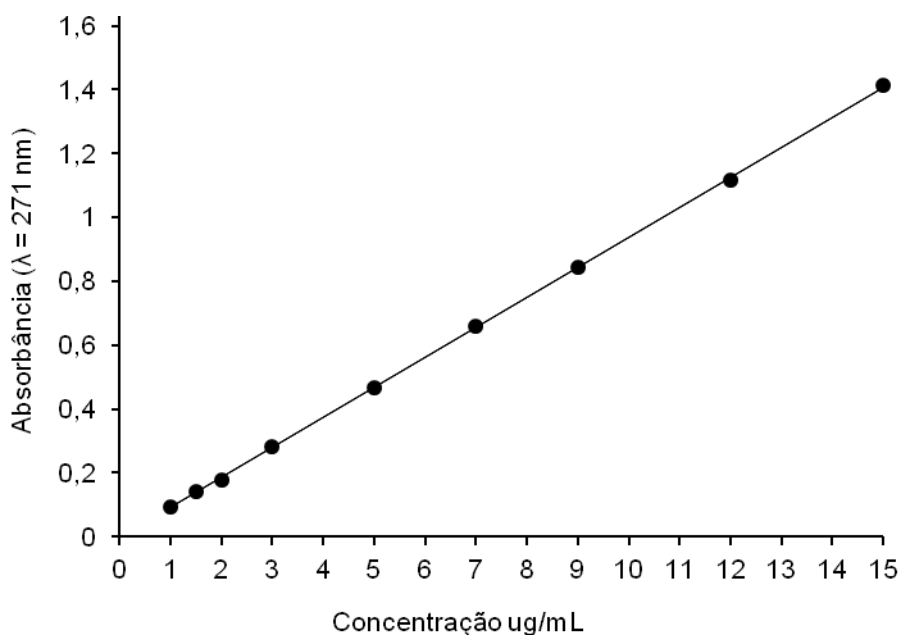
Figura 6 – Espectro de varredura de uma solução de 9µg/mL deCIPRO em tampão TRIS HCl 10mM pH 7,2 para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.



5.1.1.2 – Linearidade

A curva analítica do CIPRO em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 está apresentada na figura 7. Ela foi obtida no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco a partir da média dos valores das absorbâncias para cada concentração (n=3).

Figura 7 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de CIPRO em Tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2.



A equação linear obtida foi $Y = 0,0941 \cdot X - 0,0031$ ($r^2 = 0,9999$). Os dados da curva analítica demonstraram método desenvolvido para quantificar o CIPRO por espectrofotometria UV-Vis possui linearidade na faixa entre as concentrações de 1 a 15ug/mL.

5.1.1.3 – Precisão

A precisão foi avaliada no nível de repetibilidade (precisão intra – corrida) e precisão intermediária (precisão inter – corridas).

Os resultados dos estudos de repetibilidade estão apresentados na Tabela 1 e de precisão intermediária na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de estudo de repetibilidade do método de quantificação de CIPRO por espectrofotometria UV-Vis.

	Conc. Baixa (5ug/mL)	Conc. Média (9ug/mL)	Conc. Alta (15ug/mL)
Curva 1	0,45167	0,84244	1,3957
	0,46009	0,84924	1,3924
	0,45781	0,83204	1,3814
Média	0,45652	0,84124	1,38983
DP	0,00435	0,00866	0,00749
CV	0,95394	1,02974	0,53874
Curva 2	0,47685	0,80617	1,4722
	0,47875	0,84372	1,4481
	0,4636	0,8512	1,4259
Média	0,47307	0,83370	1,44873
DP	0,00825	0,02413	0,02316
CV	1,74462	2,89438	1,59840
Curva 3	0,47006	0,84885	1,4079
	0,48345	0,854117	1,4061
	0,47008	0,8426	1,4015
Média	0,47453	0,84852	1,40517
DP	0,00772	0,00577	0,00330
CV	1,62792	0,67947	0,23488

Tabela 3 - Resultados de estudo de precisão intermediária do método de quantificação de CIPRO por espectrofotometria UV-Vis.

	Concentração		
	5 µg/mL	9 µg/mL	15 µg/mL
Curva 1	0,45167	0,84244	1,3957
	0,46009	0,84924	1,3924
	0,45781	0,83204	1,3814
Curva 2	0,47685	0,80617	1,4722
	0,47875	0,84372	1,4481
	0,4636	0,8512	1,4259
Curva 3	0,47006	0,84885	1,4079
	0,48345	0,85417	1,4061
	0,47008	0,84260	1,4015
Média	0,46804	0,84116	1,41458
DP	0,01057	0,01463	0,02917
CV	2,25807	1,73923	2,06235

Os resultados para os testes de repetibilidade e precisão intermediária demonstraram coeficiente de variação inferior a 5% (valor máximo aceitável, segundo a resolução 899). Com estes resultados pode-se dizer que o método é preciso.

5.1.1.4 - Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a determinação do limite de detecção e limite quantificação do CIPRO.

Tabela 4 - Valores para cálculo do LD e LQ.

Pontos da curva	Volume balão (10mL)	Volume (mL) da solução estoque	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média
1	10	0,250	0,09004	0,09590	0,09484	0,09359
1,5	10	0,375	0,13097	0,14329	0,14512	0,13979
2	10	0,500	0,17102	0,17862	0,18252	0,17739
3	10	0,750	0,27612	0,2855	0,28343	0,28168
DP de b			0,004885			

Inclinação da Curva (IC) = 0,0941

$LD = \frac{DPb \times 3}{IC}$, portanto o LD = 0,156065 µg/mL

$LQ = \frac{DPb \times 10}{IC}$, portanto o LQ = 0,582073 µg/mL

O método demonstrou ser sensível para pequenas concentrações do fármaco, tendo como valor LQ 0,156065 µg/mL e LD 0,582073 µg/mL.

5.1.1.5 – Exatidão

A Tabela 4 mostra os resultados de exatidão para as concentrações baixa, média e alta de CIPRO.

Tablela 5 - Valores das absorbâncias e as concentrações recuperadas para cálculo da exatidão.

Concentração teórica	Abs. média	Conc. medida média	Exatidão (%)
5 ug/mL (baixa)	0,46804	5,00680	100,13595
9 ug/mL (media)	0,84115	8,97187	99,68741
15 ug/mL (alta)	1,41458	15,06565	100,43764

Pode-se observar que a exatidão média foi de 100,087%, portanto pode-se dizer que o método proposto é exato.

5.2 – Desenvolvimento das NLS

5.2.1 - Determinação da porcentagem de lipídeo e tensoativos

5.2.1 - Pré - Emulsões com 5% de fase lipídica (MEG) e 5% de tensoativos (Brij 72 e Brij 78).

No momento de obtenção das pré-emulsões, todas ficaram com aspecto líquido. Entretanto, após 24 horas observou-se a formação de creme e que houve

nítida separação de fase na emulsão com EHL= 6,0. Todas as formulações ficaram com espumas e o fenômeno de cremação (agrupamento de gotículas na parte superior da emulsão) parece ter ocorrido, fator que pode indicar instabilidade física em emulsões. Este processo ocorre porque as gotículas presentes possuem densidades diferentes, em que as menos densas tendem a migrarem e agruparem-se na superfície, resultando assim uma formulação com duas fases (fase de gotículas menores e a fase emulsionada) (SCHUELLER e ROMANOWSKI, 2000).

O aumento da viscosidade pode ser explicado pelo fenômeno da gelificação e ocorre quando as moléculas dos agentes tensoativos não são suficientes para estabilizar todas as superfícies das partículas, e conseqüentemente ocorre a aglomeração delas, aumentando assim a viscosidade da formulação (SOUTO, et al., 2007). A viscosidade também aumenta quando há concentrações elevadas de lipídeo na formulação (MEHNERT e MADER, 2001).

Portanto, verificou-se a instabilidade de todas as formulações e decidiu-se diminuir a concentração de lipídeo na formulação.

5.2.1.1 - Pré- Emulsões com 3% de fase lipídica (MEG) e 2% de tensoativos (Brij 72 e Brij 78).

No instante em que as emulsões foram obtidas, todas apresentaram aspecto líquido. Após 48 horas de repouso, foi observado que a formulação com EHL 6,0 teve nítida separação de fase. As demais formulações apresentaram homogeneidade. Observou-se também que as formulações com EHL 8, 9, 10, 11 e 12 ficaram mais viscosas, porém bem menos que no experimento anterior. Verificou-se que as melhores formulações foram as de EHL 13 e 14. Estas não apresentaram mudança no aspecto visual em 30 dias quando armazenadas em temperatura ambiente, não

havendo separação de fase, formação de creme ou qualquer outro aspecto que pudesse indicar instabilidade física. A partir destes resultados, optou-se por trabalhar com formulações com valor de EHL 13, utilizando-se 3% de lipídeo e 2% da mistura de tensoativos. Para dar continuidade com os estudos, optou-se também por trabalhar com outro lipídeo, a triestearina (TRI).

A tabela 5 mostra de forma resumida as etapas até se escolher a formulação com o melhor EHL para dar continuidade ao trabalho com as NLS.

Tabela 6 - Resumo das características das emulsões na determinação do EHL das formulações.

(1ª etapa) Formulação com 5% de MEG e 5% mistura de tensoativos	(2ª etapa) Formulação com 3% de MEG e 2% mistura de tensoativos
1) Separação de fases da emulsão com EHL=6	1) Separação de fases da emulsão com EHL=6
2) Após 24 horas houve formação de creme em todas as emulsões.	2) Após 48 horas as emulsões com EHLs 8, 9,10,11 e 12 ficaram mais viscosas.
3) Optou-se por diminuir as concentrações de lipídeo e tensoativos.	3) Escolheu-se portanto a emulsão EHL=13, já que não ocorreu formação de creme, não houve mudança na viscosidade e não apresentou separação de fases.

5.3 - Caracterização das NLS

5.3.1 – Diâmetro médio e Potencial Zeta (PZ)

5.3.1.1 - Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta (PZ).

A tabela 6 mostra os resultados obtidos de diâmetro médio, Pdl e PZ das NLS compostas por MEG:Brij 72:Brij:78 (MB) e compostas por TRI: Brij72: Brij 78 (TB). As NLS foram obtidas e armazenadas em temperatura de 25°C e em geladeira (4°C) durante um período de 3 meses. Essas duas condições de armazenamento foram testadas para verificar se podiam interferir nos parâmetros de diâmetro, Pdl e PZ das NLS. O tempo de armazenamento também foi testado para o mesmo objetivo.

Tabela 7 - Diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta (PZ) das NLS de MB e TB armazenadas à 25°C e em temperatura de refrigeração (4°C).

Amostras	Tempo (dias)	Diâmetro médio (nm)	PDI	PZ (mV)
NLS MB	0	129,56 ($\pm$ 2,19)	0,207 ($\pm$ 0,020)	-22,4 (0,009)
NLS MB (25°C)	90	187,76 ($\pm$ 1,35)	0,215 ($\pm$ 0,004)	-24,03 ($\pm$ 0,093)
NLS MB (4°C)	90	268,9 ($\pm$ 3,13)	0,592 ($\pm$ 0,021)	-25,6 ($\pm$ 0,52)
NLS TB	0	147,02 ($\pm$ 1,84)	0,214 ($\pm$ 0,025)	-23,1 ($\pm$ 0,05)
NLS TB (25°C)	90	262,46 ($\pm$ 2,11)	0,257 ($\pm$ 0,008)	-28,66 ($\pm$ 0,70)
NLS TB (4°C)	90	268,5 ($\pm$ 1,77)	0,364 ($\pm$ 0,005)	-27,4 ($\pm$ 0,057)

Com estes resultados é possível observar que houve aumento no diâmetro médio e PDI para as NLS de MB mantidas em temperatura de refrigeração. As NLS de TB aumentaram de diâmetro em ambas as condições, porém houve um aumento maior no valor de PDI quando foi colocada sob refrigeração. Os valores de PZ permaneceram próximos para os dois tipos de NLS em ambas as condições. Pode-se dizer que a temperatura de refrigeração influenciou na estabilidade das NLS, principalmente de MB, levando ao processo de gelificação, que fez com que o diâmetro médio delas aumentasse. Portanto, decidiu-se estocar as NLS em temperatura ambiente para os demais testes.

As NLS também foram armazenadas em lugar protegido de luz, pois estudos em relação à estabilidade demonstraram que NLS podem ter um aumento de diâmetro frente à exposição de luz. WISSING et al., 2004, observaram que quando as NLS foram expostas à luz artificial, ocorreu um processo de gelificação dentro de uma semana. Quando foram expostas à luz do dia, houve um aumento no diâmetro em três meses. E quando foram armazenadas sob proteção da luz, começaram a ter o diâmetro aumentado depois de quatro meses.

5.3.1.2 - Relação do diâmetro médio, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (PZ) das NLS de MB com várias concentrações de CIPRO e com o tempo de armazenamento à 25°C.

A tabela 8 mostra os resultados obtidos de diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de MB obtidas variando-se a concentração de CIPRO e também variando-se o tempo de armazenamento à 25°C.

Tabela 8 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de MB na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco em relação à concentração de lipídeo, durante período de 60 dias.

Amostras	Tempo (dias)	Diâmetro médio (nm)	PDI	PZ (mV)
Sem Fármaco	0	121,20 ($\pm$ 0,5)	0,211 ($\pm$ 0,008)	-17,4 ($\pm$ 0,64)
	30	121,76 ($\pm$ 1,53)	0,232 ($\pm$ 0,013)	-24,7 ($\pm$ 0,40)
	60	128,43 ($\pm$ 6,21)	0,268 ($\pm$ 0,029)	-26,3 ($\pm$ 0,15)
CIPRO 1%	0	116,86 ($\pm$ 1,09)	0,237 ($\pm$ 0,011)	-22,1 ($\pm$ 0,71)
	30	116,33 ($\pm$ 2,15)	0,231 ($\pm$ 0,007)	-24,8 ($\pm$ 0,55)
	60	120,16 ($\pm$ 0,72)	0,305 ($\pm$ 0,025)	-26,2 ($\pm$ 0,25)
CIPRO 5%	0	116,56 ($\pm$ 0,945)	0,243 ($\pm$ 0,003)	-31,7 ($\pm$ 2,2)
	30	116,56 ($\pm$ 1,222)	0,246 ($\pm$ 0,008)	-28,8 ($\pm$ 0,43)
	60	122,13 ($\pm$ 1,68)	0,346 ($\pm$ 0,021)	-27,6 ($\pm$ 1,15)
CIPRO 10%	0	119,10 ($\pm$ 0,400)	0,255 ($\pm$ 0,009)	-29,1 ($\pm$ 0,25)
	30	118,76 ($\pm$ 1,258)	0,253 ($\pm$ 0,005)	-29,1 ($\pm$ 0,6)
	60	-	-	-
CIPRO 20%	0	135,06 ($\pm$ 0,757)	0,279 ($\pm$ 0,005)	-33,6 ($\pm$ 0,87)
	30	132,96 ($\pm$ 2,836)	0,259 ($\pm$,0045)	-31,1 ($\pm$ 0,57)
	60	-	-	-
CIPRO 30%	0	201,36 ($\pm$ 5,419)	0,482 ($\pm$ 0,021)	-31,2 ($\pm$ 0,61)
	30	144,30 ($\pm$ 2,687)	0,362 ($\pm$ 0,007)	-32,5 ($\pm$ 0,83)
	60	-	-	-

Observou-se que conforme a concentração de ciprofloxacino foi aumentada, as NLS contendo 1%, 5% e 10% de fármaco tiveram os diâmetros médios levemente menores quando comparados às NLS sem fármaco. Para as NLS com 20% e 30% de fármaco, houve um aumento do diâmetro médio. Ao se aumentar a concentração de fármaco, houve aumento no valor de PDI principalmente para NLS com 30% de

CIPRO. Observou-se que a concentração do fármaco pode interferir no diâmetro das partículas. Pode-se dizer também que a quantidade do fármaco pode estar relacionada com o modo que ele está interagindo com a matriz lipídica. A incorporação do fármaco pode levar à redução do diâmetro, enquanto o fármaco aderido na superfície pode levar ao aumento do diâmetro (SANTOS, 2010).

O diâmetro médio e o valor de PDI das NLS com 1% e 5% não apresentou grande mudança no período de 60 dias. Nas NLS com 10%, 20% e 30% de CIPRO, apesar de não terem também uma mudança no valor do diâmetro e PDI em 30 dias, verificou-se que estas formulações estavam com precipitados e separação de fase com 60 dias, e por isso não foram analisadas.

Ao analisar os valores de PZ para as NLS de MB, não houve uma relação entre a quantidade de CIPRO e/ou o tempo de armazenamento com o valor de PZ. Porém observou-se que os valores estão numa faixa de -18,0 a -33,0 mV, indicando que o valor do potencial zeta se apresenta numa faixa considerada boa para estabilidade da formulação, uma vez que o valor de ± 30 é sugerido com um bom valor (FREITAS e MÜLLER, 1998b).

Com estes resultados, optou-se prosseguir com as formulações na faixa de 1 à 5% de fármaco em relação à concentração de lipídeo para os demais testes para as formulações de MB.

A tabela 9 mostra os resultados obtidos de diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de TB obtidas variando-se a concentração de CIPRO e também variando-se o tempo de armazenamento sob temperatura de 25°C.

Tabela 9 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de TB na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco em relação à concentração de lipídeo, durante período de 60 dias.

Amostras	Tempo (dias)	Diâmetro (nm)	PDI	PZ (mV)
Sem Fármaco	0	125,23 ($\pm$ 0,84)	0,272 ($\pm$ 0,009)	- 27,6 ($\pm$ 0,46)
	30	127,96 ($\pm$ 3,48)	0,267 ($\pm$ 0,009)	-34,5 ($\pm$ 1,71)
	60	123,70 ($\pm$ 0,43)	0,271 ($\pm$ 0,008)	-24,6 ($\pm$ 0,61)
CIPRO 1%	0	116,93 ($\pm$ 0,76)	0,266 ($\pm$ 0,009)	- 26,5 ($\pm$ 0,40)
	30	119,20 ($\pm$ 0,98)	0,262 ($\pm$ 0,012)	-27,7 ($\pm$ 4,15)
	60	117,43 ($\pm$ 0,58)	0,261 ($\pm$ 0,011)	-26,6 ($\pm$ 1,15)
CIPRO 5%	0	109,23 ($\pm$ 1,01)	0,260 ($\pm$ 0,004)	-29,0 ($\pm$ 2,0)
	30	112,90 ($\pm$ 1,99)	0,257 ($\pm$ 0,006)	-20,4 ($\pm$ 1,4)
	60	109,23 ($\pm$ 0,68)	0,259 ($\pm$ 0,009)	-23,6 ($\pm$ 0,46)
CIPRO 10%	0	116,30 ($\pm$ 0,700)	0,264 ($\pm$ 0,004)	-24,4 ($\pm$ 0,87)
	30	122,10 ($\pm$ 2,879)	0,255 ($\pm$ 0,012)	-25,1 ($\pm$ 0,60)
	60	-	-	-
CIPRO 20%	0	127,26 ($\pm$ 0,153)	0,267 ($\pm$ 0,005)	-27,1 ($\pm$ 1,55)
	30	133,50 ($\pm$ 4,158)	0,262 ($\pm$ 0,006)	-37,4 ($\pm$ 0,7)
	60	-	-	-
CIPRO 30%	0	130,36 ($\pm$ 0,802)	0,269 ($\pm$ 0,002)	-26,3 ($\pm$ 0,75)
	30	135,16 ($\pm$ 1,950)	0,251 ($\pm$ 0,005)	-24,5 ($\pm$ 0,15)
	60	-	-	-

Para as NLS de TB, foi observado também que nas concentrações de 1%, 5% e 10% houve pouca variação em relação à NLS sem fármaco, com pouca redução no diâmetro médio. Os diâmetros médios das NLS com 20% e 30% aumentaram um pouco. O valor de PDI praticamente não variou ao se aumentar a concentração de CIPRO.

Ao verificar o diâmetro e PDI das NLS de TB, ocorreu o mesmo que as NLS de MB, não havendo mudança no diâmetro e PDI das formulações. Com as NLS de TB contendo 10%, 20% e 30% de fármaco, também houve formação de precipitados e separação de fase, e por isso não foi feita a análise para estas formulações. Assim, decidiu-se escolher as formulações na faixa de 1 à 5% de CIPRO em relação à concentração de lipídeo para as outras análises.

Ao analisar os valores de PZ para as NLS de TB, não houve uma relação entre a quantidade de CIPRO e/ou o tempo de armazenamento com o valor de PZ. Porém observou-se que os valores estão numa faixa de -24,0 a -37,0 mV, próximo de ± 30 que é sugerido com um bom valor.

Estudos realizados com copolímeros de bloco ou poloxamers, relacionaram a característica destes materiais de gelificarem na temperatura do corpo humano com a possibilidade de controlar a saída do fármaco pelo transportador (GU e ALEXANDRIS, 2004, OLIVEIRA, 2006). Assim, optou-se por fazer a adição de um copolímero de bloco Pluronic[®] F-68 (PLU) às formulações de NLS de MB e NLS de TB.

A tabela 10 mostra os resultados obtidos de diâmetro médio, Pdl e PZ das NLS de MB-PLU obtidas em relação à concentração de CIPRO e do tempo de armazenamento sob temperatura de 25°C.

Tabela 10 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de MB-PLU na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco em relação à concentração de lipídeo, no período de 30 dias.

Amostras	Tempo (dias)	Diâmetro médio (nm)	PDI	PZ (mV)
Sem Fármaco	0	113,2 ($\pm$ 0,346)	0,264 ($\pm$ 0,003)	-28,20 ($\pm$ 0,70)
	30	144,4 ($\pm$ 3,470)	0,404 ($\pm$ 0,048)	-26,50 ($\pm$ 0,62)
1% CIPRO	0	129,2 ($\pm$ 1,49)	0,232 ($\pm$ 0,005)	-26,40 ($\pm$ 0,55)
	30	155,86 ($\pm$ 32,70)	0,333 ($\pm$ 0,050)	-28,60 ($\pm$ 1,01)
5% CIPRO	0	128,43 ($\pm$ 3,61)	0,227 ($\pm$ 0,006)	-21,60 ($\pm$ 0,40)
	30	178,5 ($\pm$ 7,77)	0,450 ($\pm$ 0,047)	-24,10 ($\pm$ 0,458)
10% CIPRO	0	114,00 ($\pm$ 1,65)	0,213 ($\pm$ 0,003)	-24,40 ($\pm$ 0,41)
	30	346,37 ($\pm$ 94,05)	0,413 ($\pm$ 0,064)	-25,06 ($\pm$ 0,68)
20% CIPRO	0	106,83 ($\pm$ 1,55)	0,218 ($\pm$ 0,004)	-19,00 ($\pm$ 1,28)
	30	131,10 ($\pm$ 28,11)	0,322 ($\pm$ 0,037)	-21,33 ($\pm$ 0,75)
30% CIPRO	0	128,03 ($\pm$ 2,15)	0,235 ($\pm$ 0,016)	-27,30 ($\pm$ 0,46)
	30	138,43 ($\pm$ 1,72)	0,294 ($\pm$ 0,015)	-25,66 ($\pm$ 0,71)

Para as NLS de MB-PLU, pode-se verificar que o diâmetro médio não ficou muito diferente das NLS de MB e TB. Após 30 dias houve aumento de diâmetro e PDI para as amostras. Pode-se dizer que o acréscimo do PLU não alterou o diâmetro médio das partículas e ou a sua quantidade não foi suficiente para fazer ocorrer a mudança.

Ao verificar os valores de PZ para as NLS de MB-PLU, não é possível perceber uma proporção entre a quantidade de CIPRO e/ou o tempo de armazenamento em relação ao PZ. Porém observou-se que os valores estão numa

faixa de -19,0 a -28,0 mV, uma faixa com valores de potencial zeta um pouco menor quando comparadas com as formulações sem o PLU.

A tabela 11 mostra os resultados obtidos de diâmetro médio e PDI das NLS de TB-PLU obtidas variando-se a concentração de CIPRO e também variando-se o tempo de armazenamento sob temperatura de 25°C.

Tabela 11 - Diâmetro médio, PDI e PZ das NLS de TB-PLU na ausência de fármaco e com diferentes concentrações de fármaco, no período de 30 dias.

Amostras	Tempo (dias)	Diâmetro médio (nm)	PDI	PZ (mV)
Sem Fármaco	0	185,96 ($\pm$ 1,87)	0,305 ($\pm$ 0,031)	-20,30 ($\pm$ 0,17)
	30	189,27 ($\pm$ 1,46)	0,271 ($\pm$ 0,019)	-23,76 ($\pm$ 0,32)
1% CIPRO	0	274,06 ($\pm$ 6,43)	0,435 ($\pm$ 0,008)	-23,30 ($\pm$ 0,69)
	30	270,45 ($\pm$ 1,55)	0,475 ($\pm$ 0,008)	-24,43 ($\pm$ 0,40)
5% CIPRO	0	186,33 ($\pm$ 1,68)	0,343 ($\pm$ 0,019)	-21,90 ($\pm$ 0,30)
	30	189,47 ($\pm$ 3,19)	0,271 ($\pm$ 0,015)	-21,77 ($\pm$ 0,40)
10% CIPRO	0	168,33 ($\pm$ 2,85)	0,167 ($\pm$ 0,012)	-25,60 ($\pm$ 0,95)
	30	177,30 ($\pm$ 4,20)	0,298 ($\pm$ 0,038)	-19,97 ($\pm$ 0,12)
20% CIPRO	0	258,73 ($\pm$ 0,862)	0,428 ($\pm$ 0,006)	-24,30 ($\pm$ 2,55)
	30	309,50 ($\pm$ 2,76)	0,464 ($\pm$ 0,009)	-16,73 ($\pm$ 0,64)
30% CIPRO	0	191,66 ($\pm$ 4,13)	0,281 ($\pm$ 0,024)	-28,10 ($\pm$ 1,10)
	30	172,37 ($\pm$ 2,56)	0,276 ($\pm$ 0,008)	- 21,40 ($\pm$ 0,95)

As NLS de TB-PLU sem o fármaco e com fármaco foram as que tiveram o maior aumento de diâmetro. Esse aumento pode ter sido causado pelo acréscimo do

PLU na formulação, de forma que este interagisse com a TRI podendo levar à um aumento no diâmetro.

Ao verificar os valores de PZ para as NLS de TB-PLU, não é possível perceber uma proporção entre a quantidade de CIPRO e/ou o tempo de armazenamento em relação ao PZ. Porém observou-se que os valores estão numa faixa de -17,0 a -28,0 mV, uma faixa com valores de potencial zeta um pouco menor quando comparadas com as formulações sem o PLU. Observou-se que as duas formulações com adição de PLU tiveram o valor em módulo do PZ reduzido, podendo o PLU ter influenciado nesta redução.

Para uma melhor visualização, nas figuras 8 e 9 encontram-se resumidos os resultados dos diâmetros médios e PDI respectivamente para cada uma das formulações.

Figura 8 - Valores das médias dos diâmetros das NLS de MB, TB, MB-PLU e TB-PLU em relação à concentração de CIPRO, obtidas no dia de preparo.

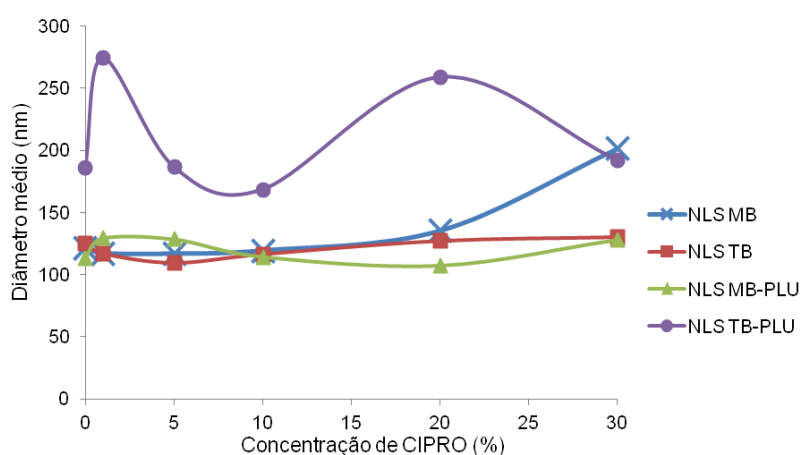
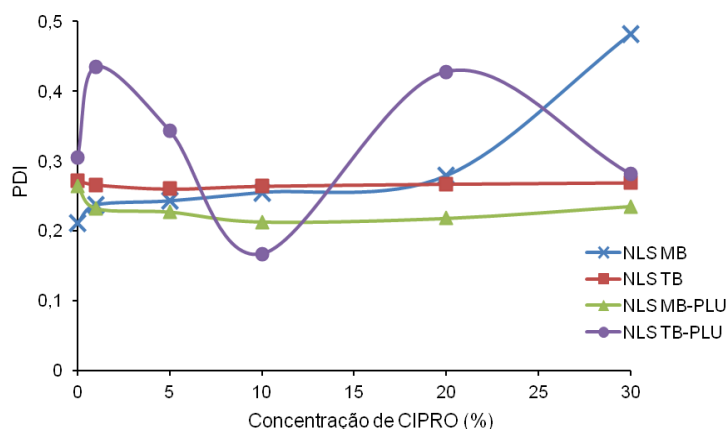


Figura 9 - Valores dos PDIs das NLS de MB, TB, MB-PLU e TB-PLU em relação à concentração de CIPRO, obtidas no dia de preparo.



Nas figuras 8 e 9 pode-se observar que a NLS de TB-PLU apresentaram os maiores valores de diâmetro médio e maiores valores de PDI. Com outras 3 formulações não consegue-se perceber uma diferença entre elas, podendo sugerir que a que teve diâmetro e PDI menores foi a NLS de MB-PLU.

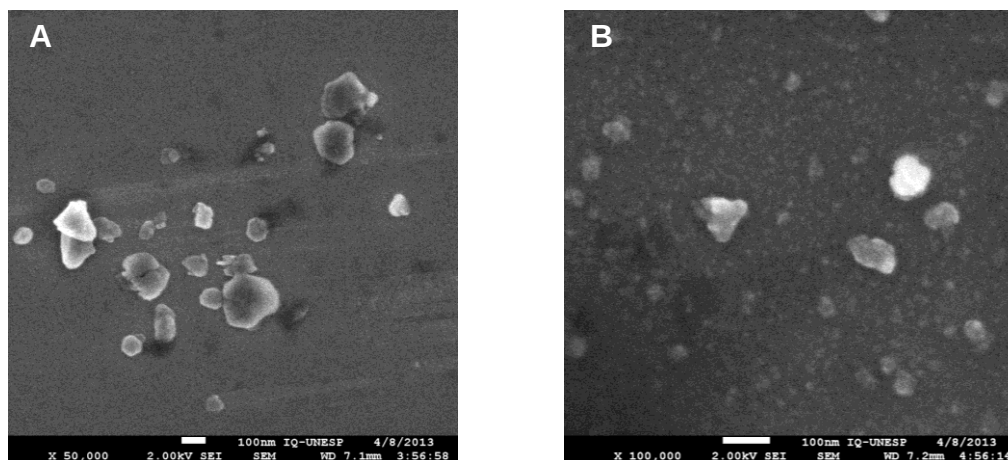
Todas as formulações de NLS testadas apresentaram valores de diâmetro médio, PDI e PZ adequados para serem utilizados para via intraocular.

Morfologia

5.3.3 - Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A figura 10 apresenta as fotomicrografias obtidas por MEV das NLS de MB (A) e TB (B) na ausência de CIPRO. Nas imagens, observa-se que as partículas de MB e TB possuem formato irregular.

Figura 10 - Fotomicrografias das NLS de MB (A) e TB (B) obtidas por técnica de ultrassonicação.

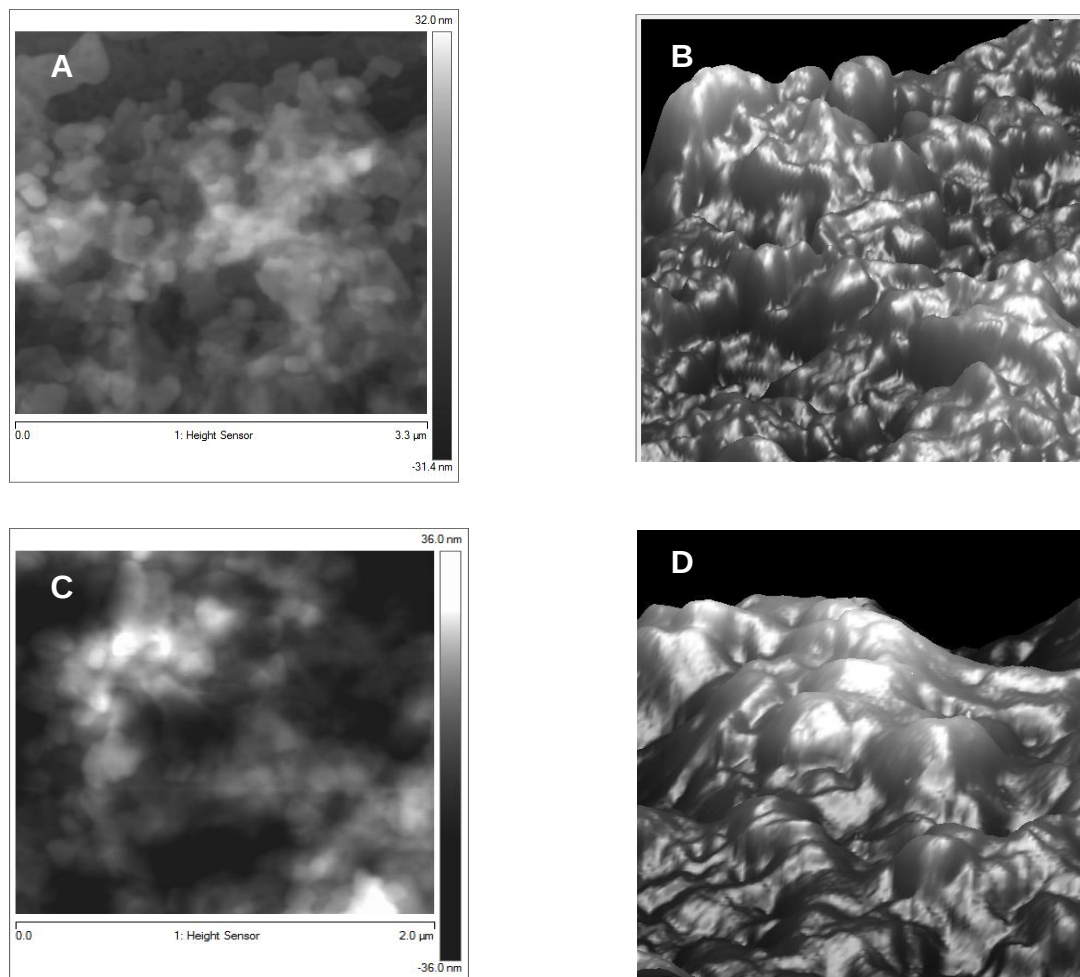


Na figura 10 são observadas partículas de diâmetro nanométrico e também partículas grandes e aglomeradas. A presença das partículas aglomeradas pode ser devido ao modo de preparo para análise por MEV, já que são secas à temperatura ambiente, e conforme ocorre a evaporação da água, elas tendem a formar aglomerados.

5.3.4 - Microscopia de Força Atômica (AFM)

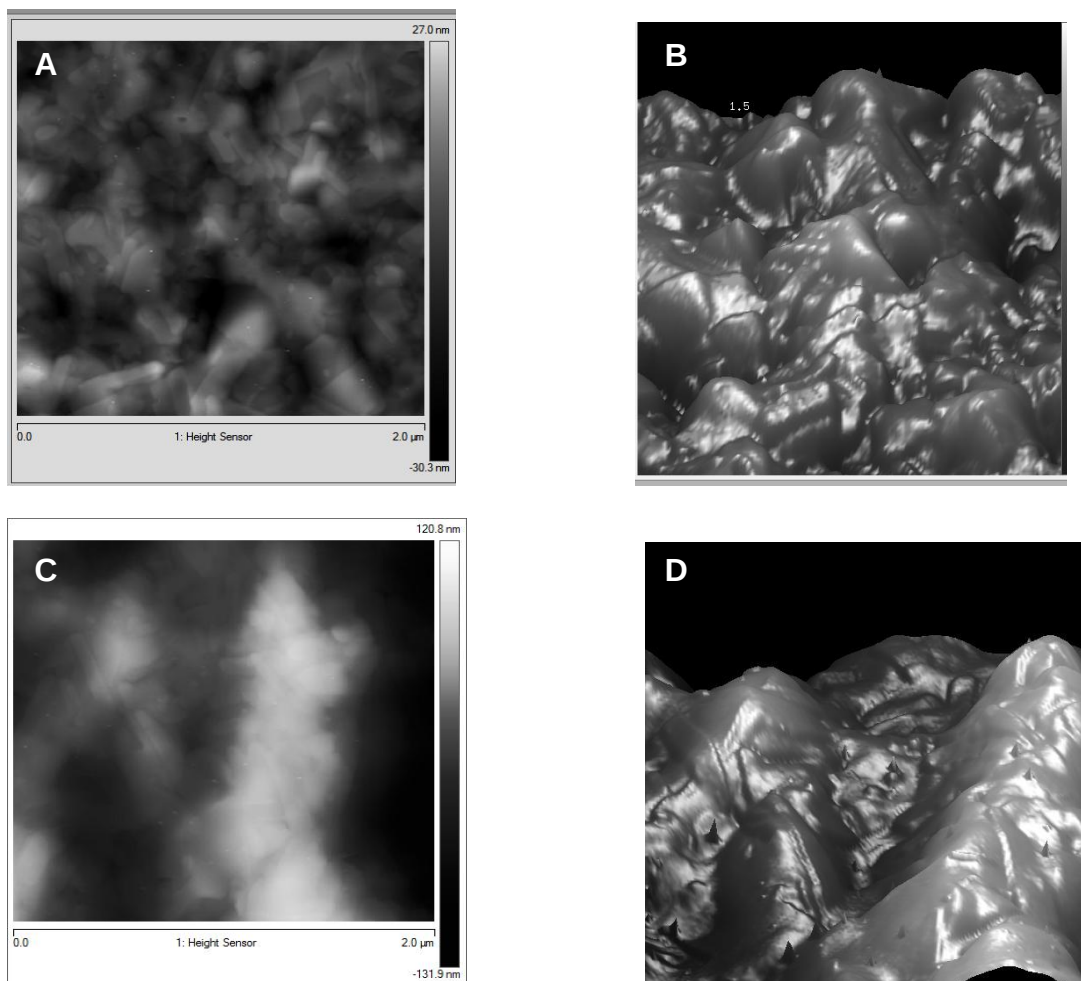
A figura 11 apresenta as fotomicrografias obtidas por AFM das NLS de MB na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D). Pode-se observar nas figuras um grande aglomerado de partículas com diâmetro nanométrico.

Figura 11 - Fotomicrografias das NLS de MB na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D), obtidas por técnica de ultrassonicação.



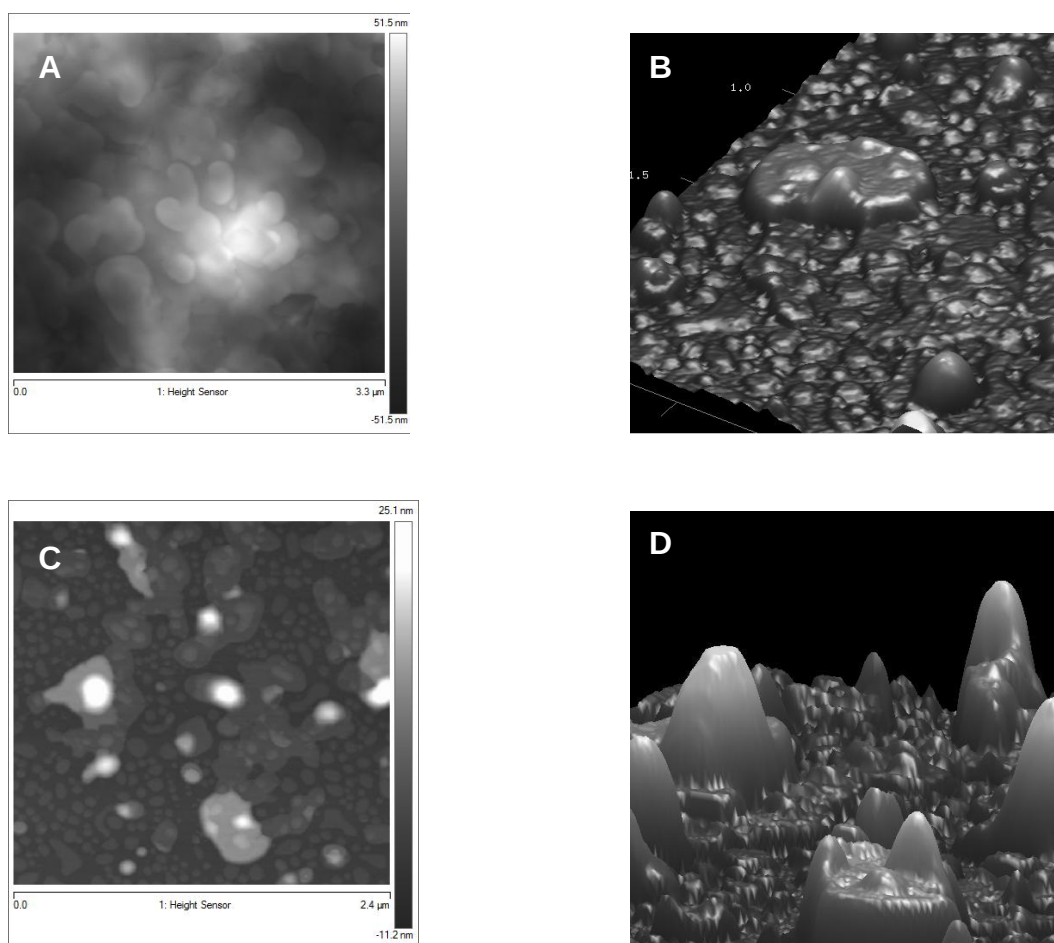
A figura 12 apresenta as fotomicrografias obtidas por AFM das NLS de TB na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D). Pode-se observar um aglomerado de partículas com formato retangulares.

Figura 12 - Fotomicrografias das NLS de TB na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D), obtidas por técnica de ultrassonicação.



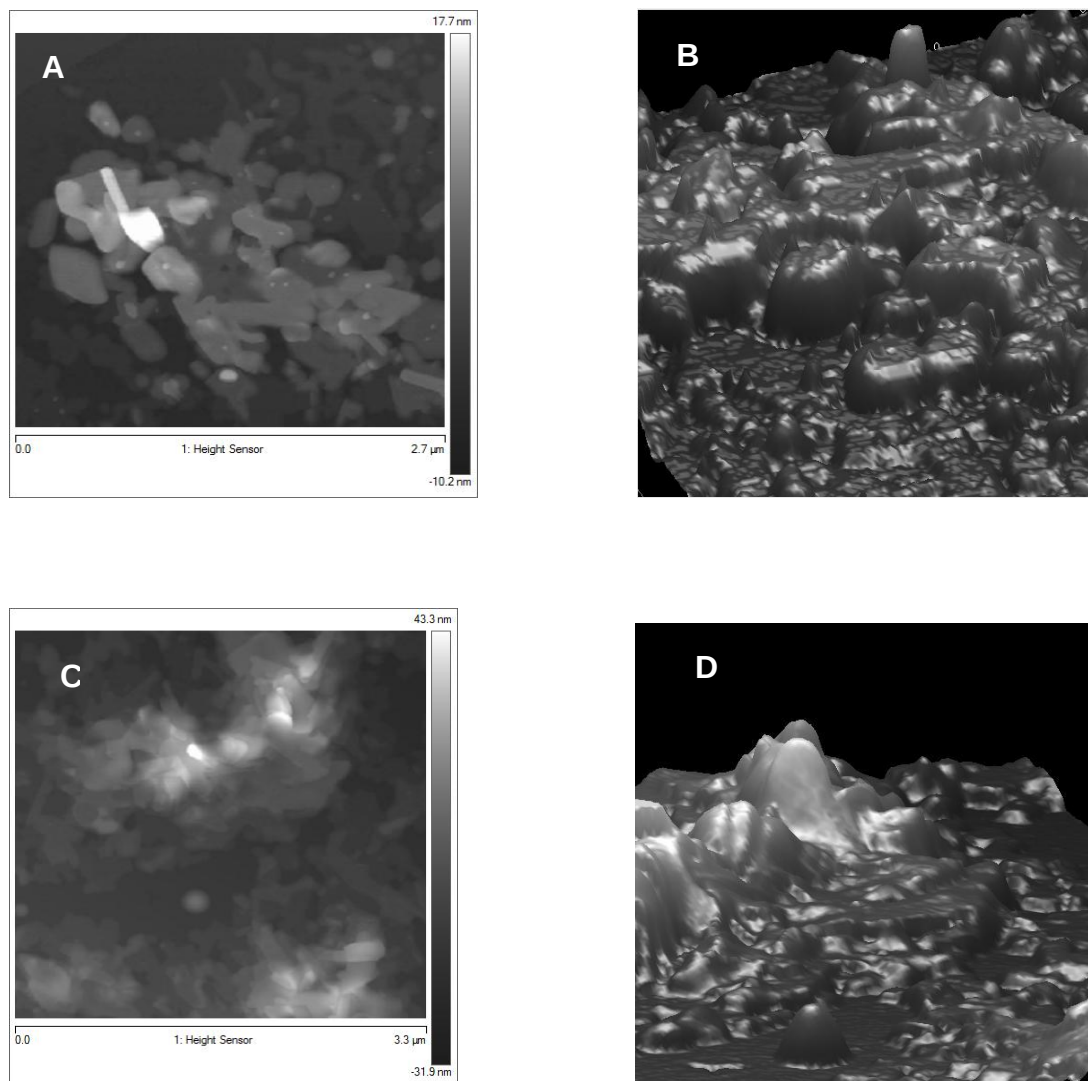
A figura 13 apresenta as fotomicrografias obtidas por AFM das NLS de MB-PLU na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D). Pode-se observar um aglomerado de partículas de formato esférico.

Figura 13 - Fotomicrografias das NLS de MB-PLU na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D), obtidas por técnica de ultrassonicação.



A figura 14 apresenta as fotomicrografias obtidas por AFM das NLS de TB-PLU na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D). Pode-se observar aglomerados de partículas de formato irregular.

Figura 14 - Fotomicrografias das NLS de TB-PLU na ausência (A) e presença do CIPRO (C) e em formato 3D, na ausência (B) e presença do CIPRO (D), obtidas por técnica de ultrassonicação.



As análises por AFM demonstraram que as NLS de MB e MB-PLU possuem um formato irregular, mais próximas de um formato esférico do que as NLS de TB e TB-PLU.

As análises por microscopia demonstraram que as NLS de TB possuem um formato não esférico. BUJES et. al, 2007, demonstraram a partir da técnica de

microscopia eletrônica de criofratura que partículas de TRI na forma α apresentam um formato esferoidal com camadas concêntricas. No entanto, o resfriamento lento leva a formação de partículas com formatos não esféricos. Desta forma, verifica-se que as NLS de TB possuem formato retangular, estando de acordo com a literatura (DORA, et. al, 2012). Também foi observado para as NLS de TB-PLU um achatamento de maior intensidade do que para as demais.

Os formatos das NLS podem ser esferoidais, anisométricas ou partículas achatadas (BUNJES et al, 2007). Esta última forma proporciona uma superfície de contato maior quando comparados com esferas e por este motivo são necessárias altas concentrações de tensoativos para a estabilização (UNRUH, 1999; MEHNERT e MADER, 2001).

5.3.5 - Análise Térmica

5.3.5.1 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)/ Termogravimetria derivada (DTG).

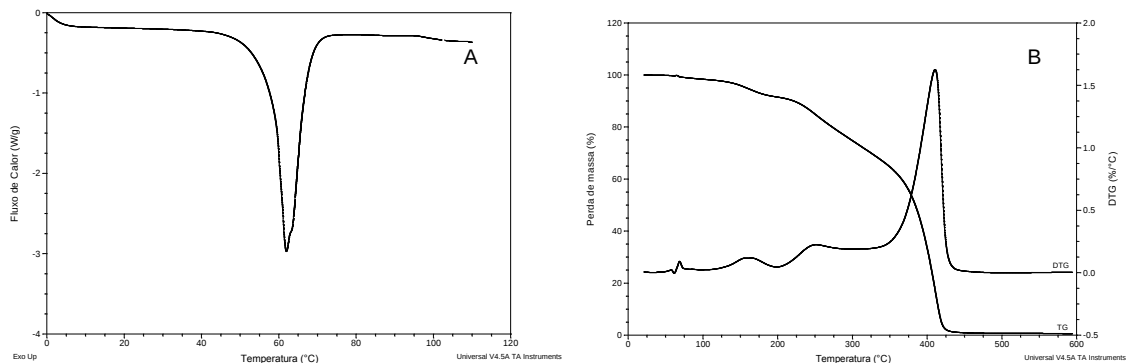
Com o objetivo de caracterizar as NLS para obter informações sobre cristalinidade e interações entre o fármaco e lipídeos, as técnicas de DSC e TG/DTG foram empregadas. Foram analisados os componentes separados, as misturas-físicas, e as formulações obtidas após o processo de ultrassonicação.

A curva DSC do MEG, (figura 15A) apresenta um evento endotérmico de fusão com início em 58,43°C e T_{pico} em 61,91°C (ΔH 120,9 J/g), e está de acordo com YAJIMA et al., 2002 e GARDOUH et al., 2013.

Nas curvas TG/DTG (figura 15B), o início de degradação térmica do MEG ocorre próximo a 150°C, ocorrendo em várias reações secundárias menores e por

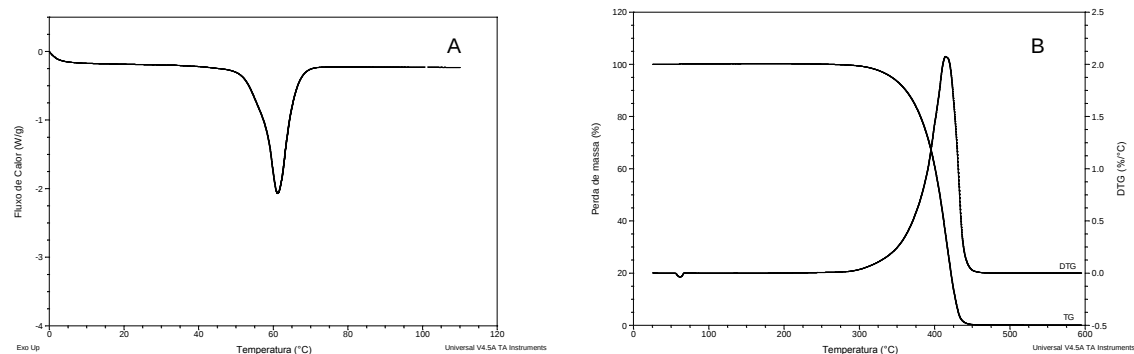
uma principal que ocorre em aproximadamente 450°C, com uma perda de massa de 94,66%.

Figura 15 – Curvas DSC (A) e TG/DTG do MEG.



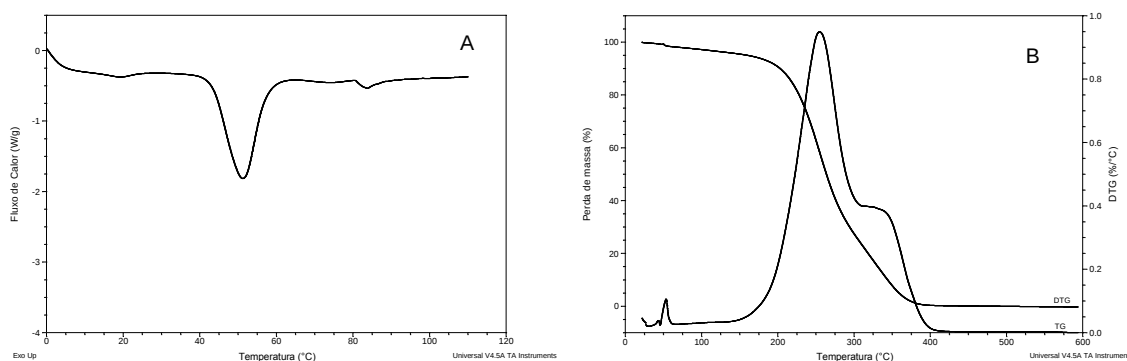
A curva DSC da TRI, representada na figura 16A, apresenta um único evento endotérmico de fusão, com início em 59,06°C e T pico em 61,17°C (ΔH 151,06 J/g), estando de acordo com a literatura (MAC NAUGHTAN et al., 2006). Nas curvas TG/DTG (figura 16B), observa-se uma perda de massa de 99,25% no intervalo de 300-450°C.

Figura 16 – Curvas DSC (A) e TG/DTG da TRI.



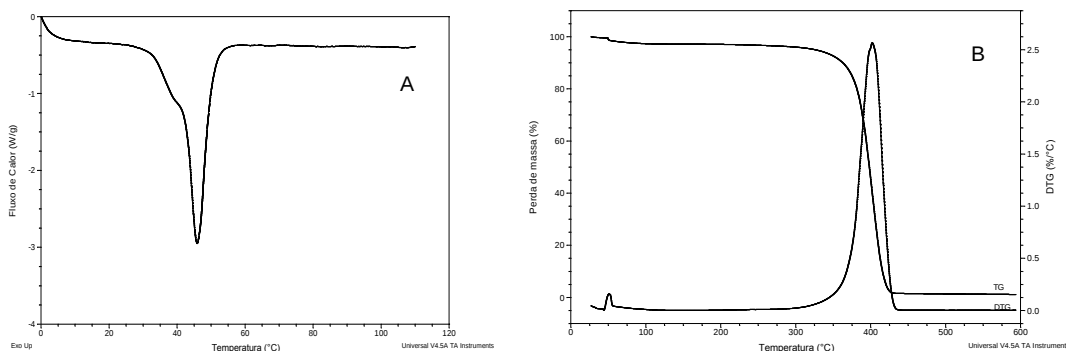
A curva DSC do BRIJ 72 (figura 17A) apresentou dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro evento o mais intenso com início em 43,24°C e T_{pico} em 51,42°C (ΔH 80,62 J/g). O segundo evento endotérmico tem início em 81,36°C e T_{pico} em 83,76°C (ΔH 1,4467 J/g), cujos resultados estão de acordo com a literatura (AYTEKIN et al., 2013). Nas curvas TG/DTG (figura 17B), observa-se uma perda de massa de 95,87% no intervalo de 130-425°C.

Figura 17 – Curvas DSC (A) e TG/DTG (B) do Brij 72.



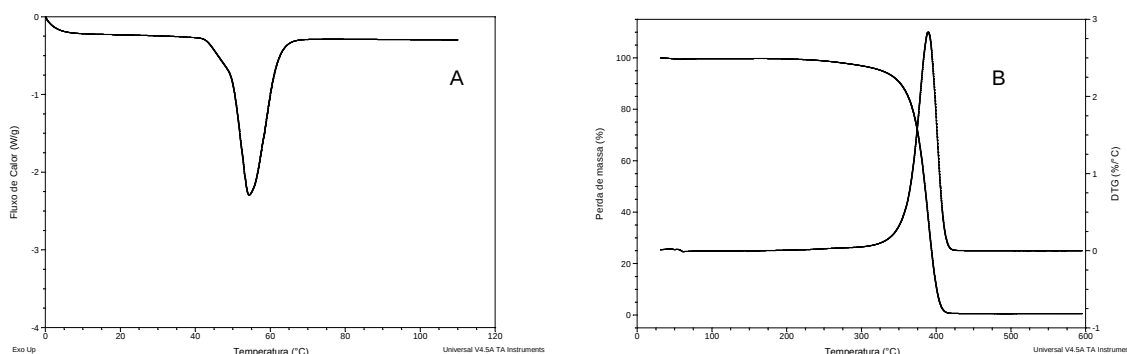
A curva DSC do BRIJ 78 (figura 18A) apresentou um evento endotérmico de fusão, com início em 41,46°C e T_{pico} em 45,85°C (ΔH 121,6 J/g), cujos resultados estão de acordo com o estudo de BRONSTEIN et al., 2006. Nas curvas TG/DTG (figura 18B) observa-se uma perda de massa de 94,63% no intervalo de 300-450°C.

Figura 18 – Curvas DSC (A) e TG/DTG do Brij 78.

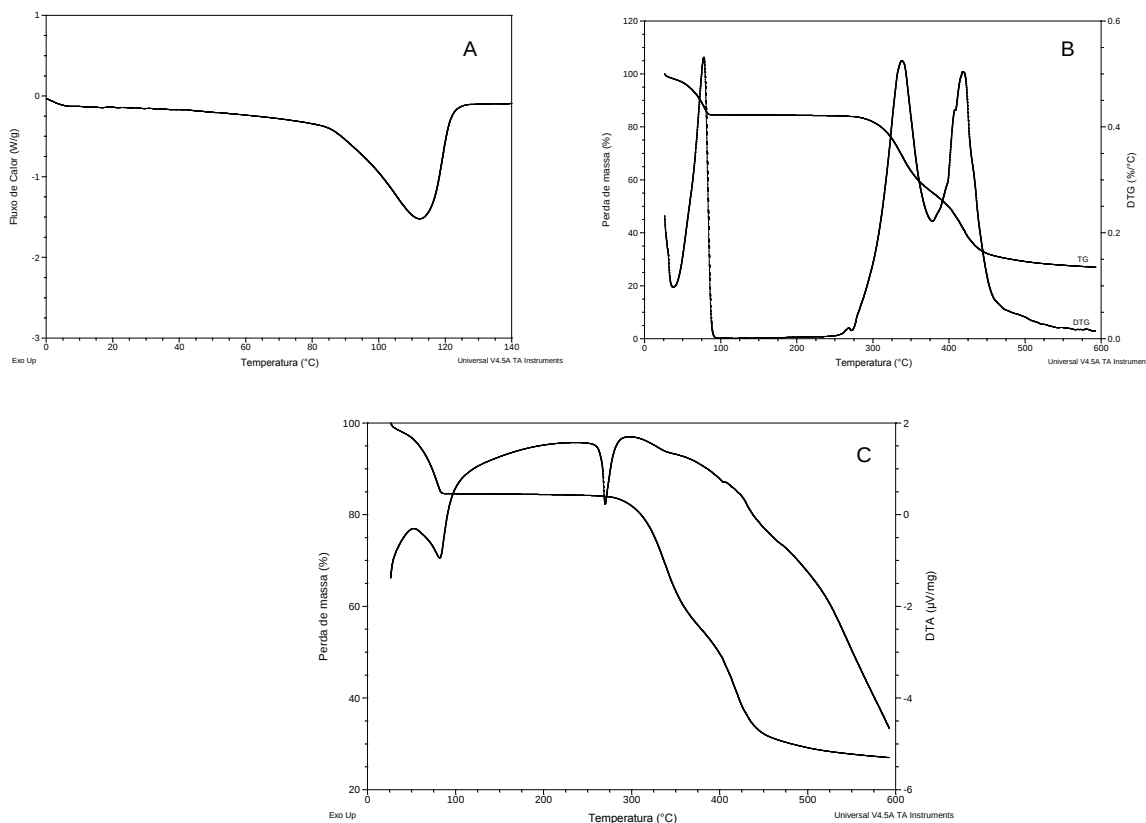


A curva DSC do PLU (figura 19A) apresentou um evento endotérmico de fusão, com início em 48,92°C e T_{pico} em 54,29°C (ΔH 108,8 J/g), estando de acordo com ROWE et al., 2006. Nas curvas TG/DTG (figura 19B), observa-se uma perda de massa de 96,80% no intervalo de 300-450°C.

Figura 19 – Curvas DSC (A) e TG/DTG do PLU.



A curva DSC do Ciprofloxacino (figura 20A) apresentou um evento endotérmico correspondente à desidratação, com início em 88,66°C e T_{pico} em 112,80°C (ΔH 191,5 J/g). Nas curvas TG/DTG (figura 20B), observa-se um evento correspondente à perda de massa no valor de 9% devido à desidratação. A decomposição é observada com temperatura superior a 275°C com perda de massa de 86,13% no intervalo de 275-550°C. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por SILVA-JÚNIOR et al., 2008. Na curva TG/DTA (figura 20C) observa-se um evento com início em 50°C e T_{pico} em 82,09°C, que são valores menores do que observado na curva DSC, correspondente à desidratação. Isto pode ter ocorrido pelo fato da análise de DSC ter sido feita em cadinho fechado e por isso a temperatura de desidratação do fármaco foi deslocado para valores maiores. É possível observar nesta curva o pico de fusão do ciprofloxacino em 296,66°C.

Figura 20 – Curvas DSC (A) , TG/DTG (B) e TG/DTA (C) do Ciprofloxacino.

O estudo da estabilidade térmica das misturas-físicas (MF) e das formulações após o processo de ultrassonicação foi realizado na presença e na ausência do fármaco.

A figura 21 mostra as curvas DSC para as misturas-físicas (MF) de MB na presença e na ausência do fármaco e suas formulações correspondentes.

O DSC da MF MB apresentou um evento endotérmico de pré-fusão, seguida por um pico de fusão em 45,52°C e outro em 60,50°C. A curva DSC da NLS MB apresentou um primeiro evento endotérmico de fusão em 39,16°C, e um segundo em 55,09°C.

A curva DSC para a MF MB CIPRO apresentou um evento endotérmico de pré-fusão, seguida por um pico em 45,30°C e outro em 60,76°C. O DSC para a NLS

MB CIPRO apresentou o primeiro evento endotérmico de fusão em 39,12°C e o segundo em 56,46°C.

Para uma melhor visualização dos resultados, na tabela 12 encontram-se os valores das $T_{\text{início}}$, T_{pico} e entalpia para cada uma das amostras. Na tabela 12 observa-se que houve redução nas entalpias obtidas em relação às entalpias esperadas, sugerindo que houve um desarranjo na estrutura do lipídeo.

Nesta tabela 12, pode-se observar com os valores de ΔH obtido que não houve indicativo de influência da adição do CIPRO na formulação, pois os valores de entalpia das formulações na ausência e na presença de CIPRO foram próximos.

Figura 21 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) MB na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.

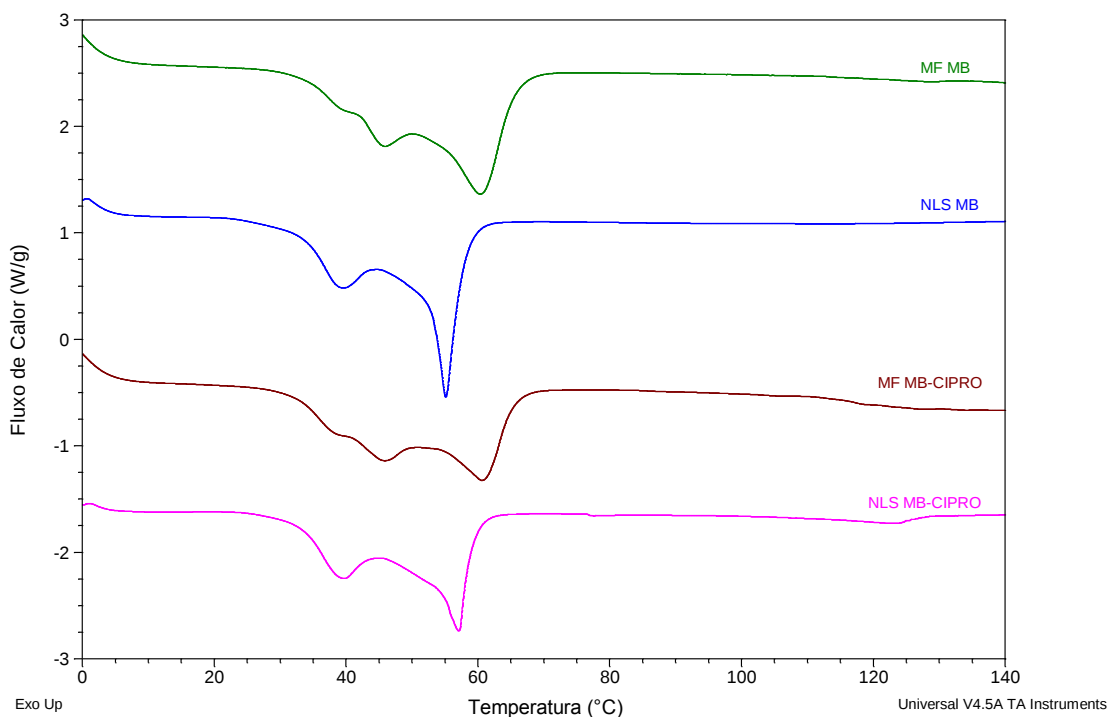


Tabela 12 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) compostas por Monoestearato de Glicerila: Brij 72: Brij78 (MB) na presença e na ausência do ciprofloxacino e valores de entalpia.

Amostras	1° evento		2° evento		ΔH (J/g) obtido	ΔH (J/g) esperado
	T _{início} (°C)	T _{pico} (°C)	T _{início} (°C)	T _{pico} (°C)		
MF MB	38,25	45,52	53,62	60,50	114,4	117,3
NLS MB	33,45	39,16	52,40	55,09	95,05	117,3
MF MB CIPRO	35,18	45,30	54,28	60,76	107,9	118,65
NLS MB CIPRO	34,73	39,12	50,90	56,46	92,50	118,65

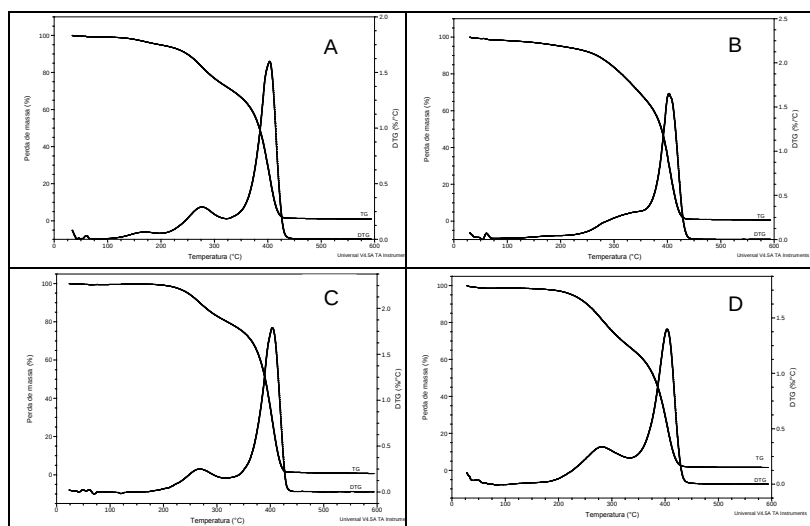
As curvas DSC para a MF MB CIPRO e NLS MB CIPRO apresentaram um pequeno evento endotérmico em 142,92° e 122,73° respectivamente, sugerindo ser correspondente a fração do fármaco não associado à matriz lipídica.

Pode-se observar que as temperaturas de início e de fusão das NLS foram menores do que as suas respectivas MF. Tanto as MF quanto as NLS apresentaram as T_{pico} menores do que a do MEG isolado (61,91°C). A partir desses resultados, pode-se sugerir que há uma maior interação entre a matriz lipídica com o fármaco após a estruturação do sistema. Portanto ocorre a recristalização dos componentes da micropartícula em formas menos estáveis, estando de acordo com Craig, 2007.

Nas curvas TG/DTG na MF MB (fig.22A) a degradação térmica tem início em aproximadamente 100°C, ocorrendo em várias etapas e apresenta uma perda de massa de 97,72%. Na MF MB CIPRO (fig. 22B) a degradação térmica tem início em aproximadamente 200°C e apresenta perda de massa de 93,01%. Para NLS MB (fig.22 C) o início da degradação ocorre em 200°C com perda de massa de 97,57%.

A NLS MB CIPRO (fig. 22D) tem o início da degradação térmica em 200°C e perda de massa de 96,41%.

Figura 22 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de MB na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS MB na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).



A figura 23 mostra as curvas DSC para as misturas-físicas (MF) de MB-PLU na presença e na ausência do fármaco e suas respectivas formulações.

O DSC da MF MB-PLU apresentou um evento endotérmico de pré-fusão, seguida por um pico de fusão em 48,59°C e outro em 59,87°C. A curva DSC da NLS MB-PLU apresentou um evento endotérmico de pré-fusão, seguida por um pico de fusão em 46,24°C, e um segundo em 55,60°C.

A curva DSC para a MF MB-PLU-CIPRO apresentou um evento endotérmico de pré-fusão, seguida por um pico em 48,0°C e outro em 59,0°C. O DSC para a NLS MB-PLU-CIPRO apresentou um evento de pré-fusão, seguida por um pico de fusão em 58,0°C.

Para uma melhor visualização dos resultados, na tabela 13 encontram-se os valores das $T_{\text{início}}$, T_{pico} e entalpia para cada uma das amostras. Nesta tabela

observa-se que houve também a redução nas entalpias obtidas em relação às entalpias esperadas.

Na tabela 13 é possível observar que houve uma redução do ΔH obtido da formulação de NLS MB-PLU-CIPRO em relação à sua MF, indicando que houve influência do PLU quando o fármaco foi adicionado na formulação.

Figura 23 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de MB-PLU na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.

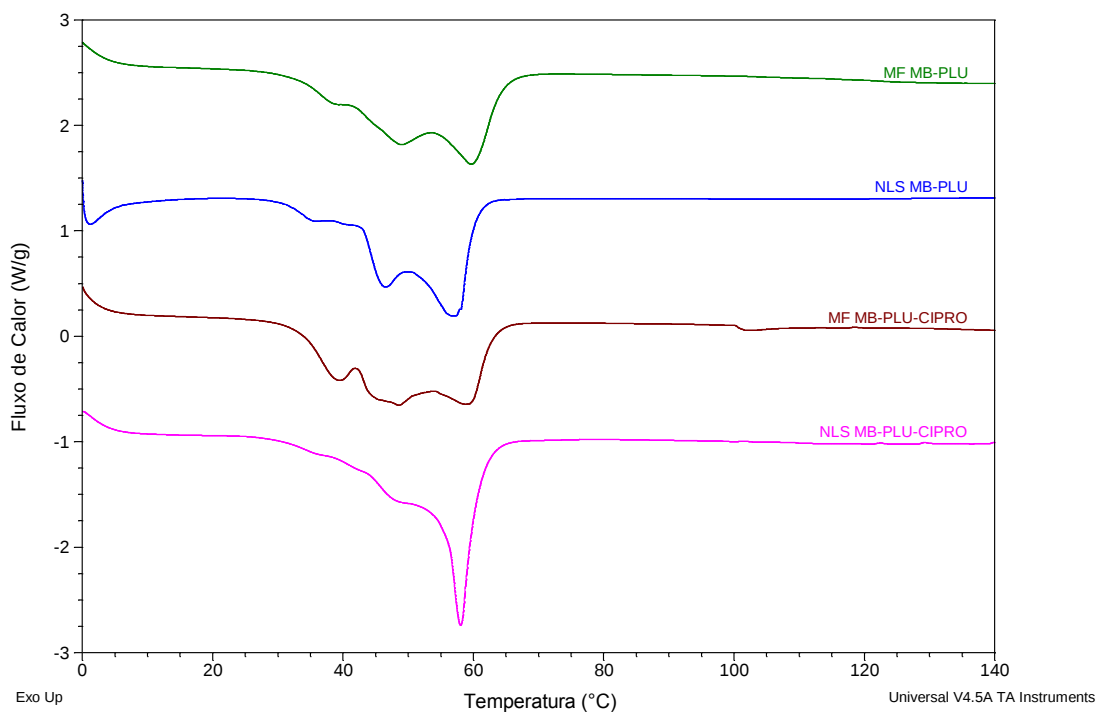


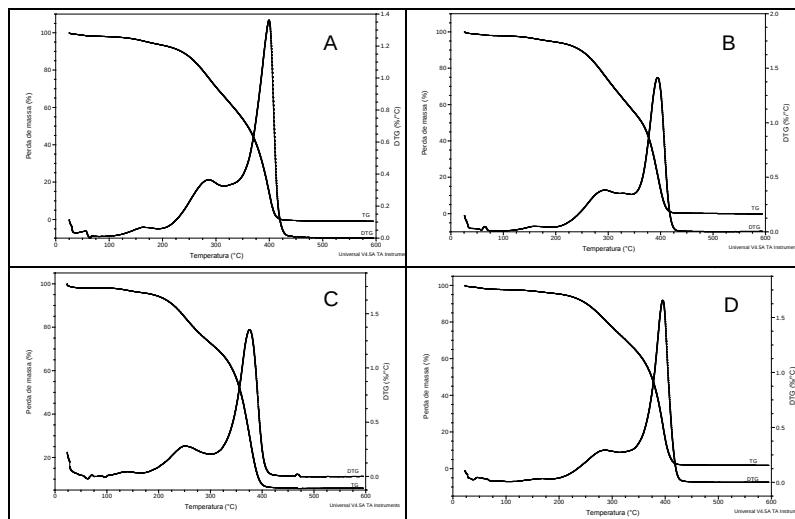
Tabela 13 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas de monoestearato de glicerila com adição de pluronic F-68 (NLS MEG F-68) na presença e na ausência do ciprofloxacino e valores de entalpia.

Amostras	1° evento		2° evento		ΔH (J/g) obtido	ΔH (J/g) esperado
	T _{início} (°C)	T _{pico} (°C)	T _{início} (°C)	T _{pico} (°C)		
MF MB-PLU	41,91	48,59	54,70	59,87	97,38	115,31
NLS MB-PLU	31,86	46,24	51,56	56,60	96,15	115,31
MF MB-PLU-CIPRO	35,47	48,0	58,81	59,00	108,2	112,8
NLS MB-PLU-CIPRO	56,76	58,00	—		98,62	112,8

As Curvas DSC para as NLS e as respectivas misturas-física (MF) demonstraram que houve deslocamento de eventos térmicos para valores menores de faixa de temperatura para as NLS quando comparadas com as suas respectivas MF e que todas tiveram a T_{pico} menores do que a do MEG isolado (61,91°C). A T_{início} foi menor também para as NLS quando comparadas com as respectivas MF, podendo sugerir que há uma maior interação entre a matriz lipídica com o fármaco após a estruturação dos componentes na forma de NLS, como ocorreu no item anterior.

Nas curvas TG/DTG na MB-PLU (fig. 24A) a degradação térmica tem início em aproximadamente 100°C, ocorrendo em várias etapas e apresenta uma perda de massa de 98,02%. Na MF MB-PLU-CIPRO (fig. 24B) a degradação térmica tem início em aproximadamente 125°C e apresenta perda de massa de 97,17%. Para NLS MB-PLU (fig.24C) o início da degradação ocorre em 100°C com perda de massa de 92,20%. A NLS MB-PLU CIPRO (fig. 24D) tem o início da degradação térmica em 200°C e perda de massa de 95,46%.

Figura 24 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de MB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS de MB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).



A figura 25 mostra as curvas DSC para as misturas-físicas (MF) de TB na presença e na ausência do fármaco e suas respectivas formulações.

As Curvas DSC para as MF na ausência e na presença do fármaco apresentaram um evento de pré - fusão seguido por um pico de fusão, enquanto que as NLS na ausência e na presença do fármaco apresentaram dois picos de fusão.

As Curvas DSC para as NLS e as respectivas misturas-física (MF) demonstraram que houve deslocamento de eventos térmicos para valores menores de faixa de temperatura para as NLS quando comparadas com as suas respectivas MF e que todas tiveram a T_{pico} menores do que a da TRI isolada ($61,17^{\circ}\text{C}$). Na tabela abaixo (14), encontram-se os valores das $T_{\text{início}}$, T_{pico} e entalpia para cada uma das amostras. Nesta tabela observa-se que também houve a redução nas entalpias obtidas em relação às entalpias esperadas.

Na tabela 14 é possível observar a redução do ΔH obtido para a formulação de NLS TB-CIPRO em relação à sua MF, indicando que a adição do fármaco modificou a estruturação das NLS.

Figura 25 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.

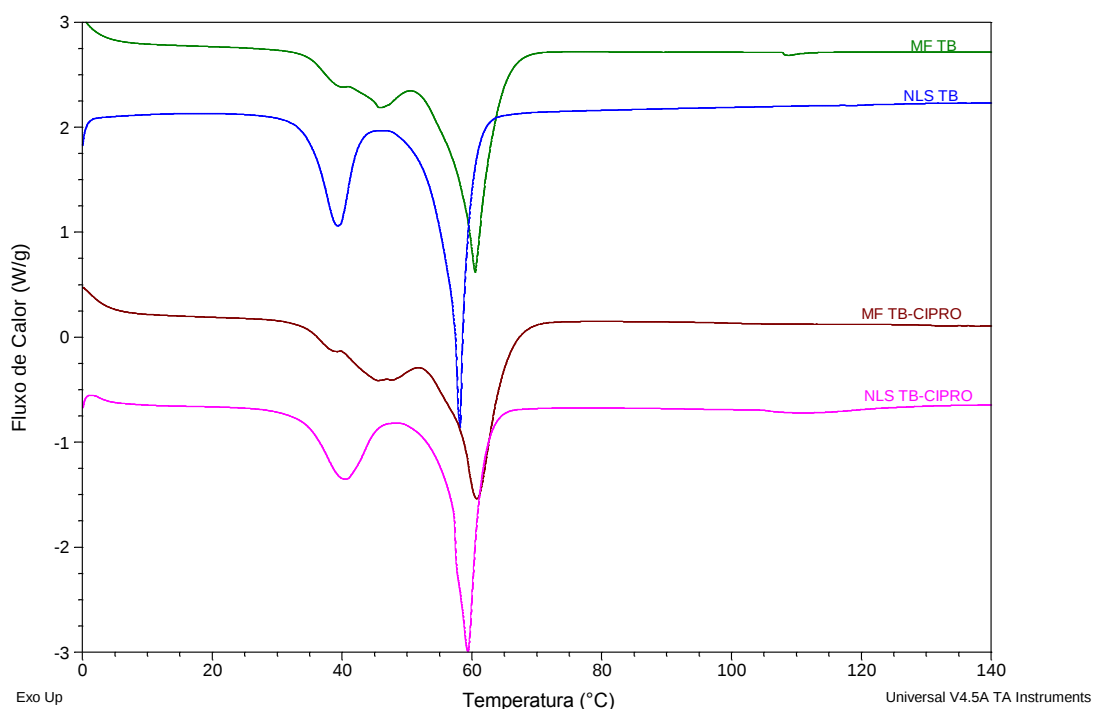
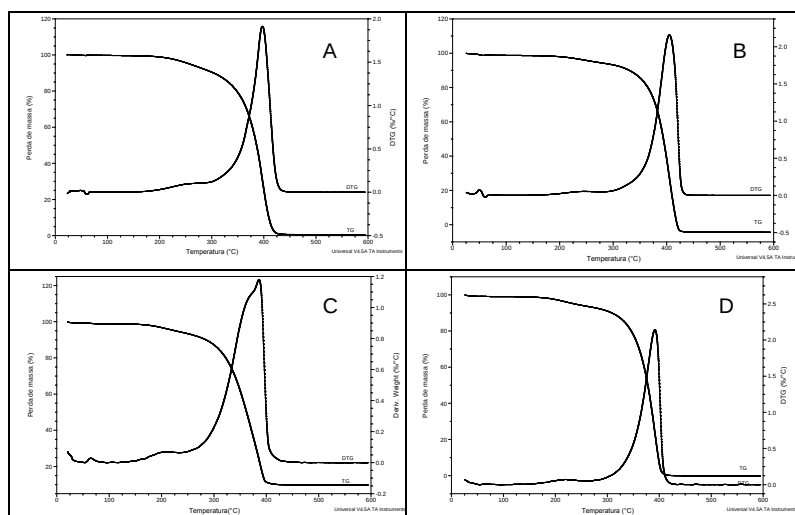


Tabela 14 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB na presença e na ausência do ciprofloxacino.

Amostras	1° evento		2° evento		ΔH (J/g) obtido	ΔH (J/g) esperado
	T _{início} (°C)	T _{pico} (°C)	T _{início} (°C)	T _{pico} (°C)		
MF TB	56,08	60,48	—		126,6	136,1
NLS TB	34,96	39,38	56,49	58,14	122,1	136,1
MF TB CIPRO	55,92	60,69	—		126,0	135,6
NLS TB CIPRO	34,50	40,21	56,69	59,36	104,5	135,6

Nas curvas TG/DTG na MF TB (fig. 26A) a degradação térmica tem início em aproximadamente 200°C e apresenta uma perda de massa de 98,29%. Na MF TB CIPRO (fig.26B) a degradação térmica tem início em aproximadamente 250°C e apresenta perda de massa de 98,70%. Para NLS TB (fig. 26C) o início da degradação ocorre em 150°C com perda de massa de 88,65%. A NLS TB CIPRO (fig. 26D) tem o início da degradação térmica em 175°C e perda de massa de 98,51%.

Figura 26 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de TB na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS de TB na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).



A figura 27 mostra as curvas DSC para as misturas-físicas (MF) de TB-PLU, na presença e na ausência do fármaco e suas respectivas formulações.

As Curvas DSC para as MF e NLS na ausência e na presença do fármaco apresentaram um evento de pré - fusão seguido por um pico de fusão.

As Curvas DSC para as NLS e as respectivas misturas-física (MF) demonstraram que houve deslocamento de eventos térmicos para valores menores de faixa de temperatura para as NLS quando comparadas com as suas respectivas

MF e que todas tiveram a T_{pico} menores do que a da TRI isolada ($61,17^{\circ}\text{C}$). Na tabela 15, encontram-se os valores das $T_{\text{início}}$, T_{pico} e entalpia para cada uma das amostras. Nesta tabela observa-se que também houve a redução nas entalpias obtidas em relação às entalpias esperadas.

Na tabela 15 é observada a redução do ΔH obtido da NLS TB-PLU-CIPRO em relação à sua MF e em relação à NLS TB-PLU, podendo indicar que houve tanto influência do PLU e da adição do fármaco, modificando a estrutura após o processo de emulsificação-ultrassonicação.

Figura 27 – Curvas DSC das misturas-físicas (MF) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB-PLU na presença e na ausência do CIPRO e suas respectivas formulações.

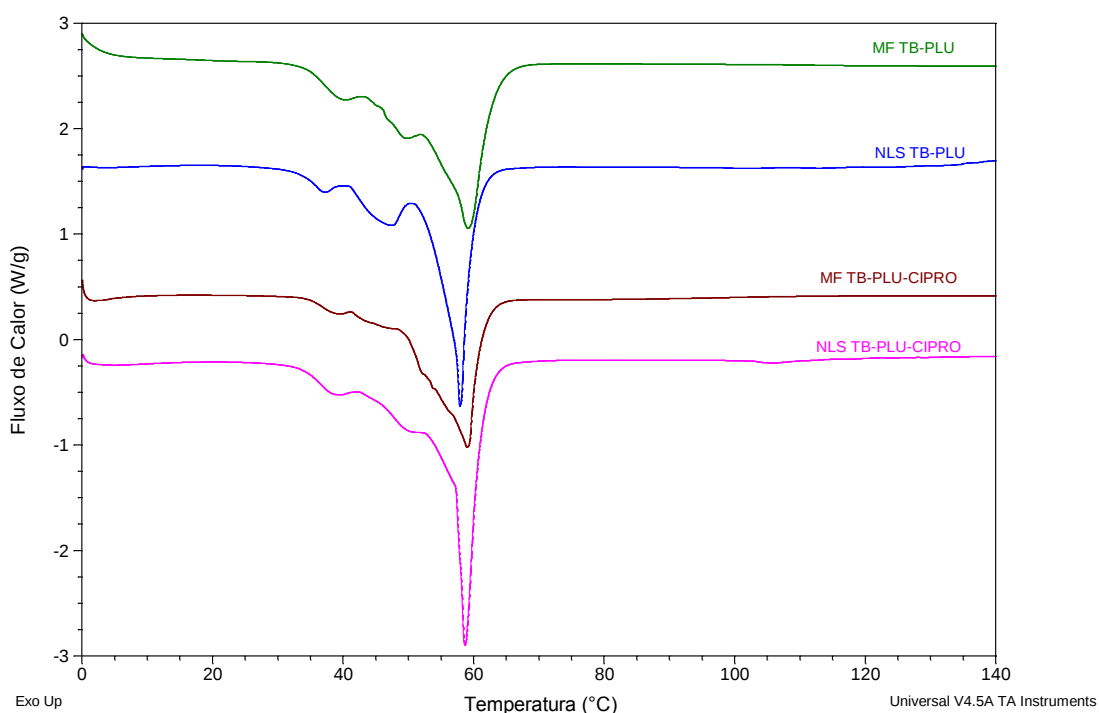
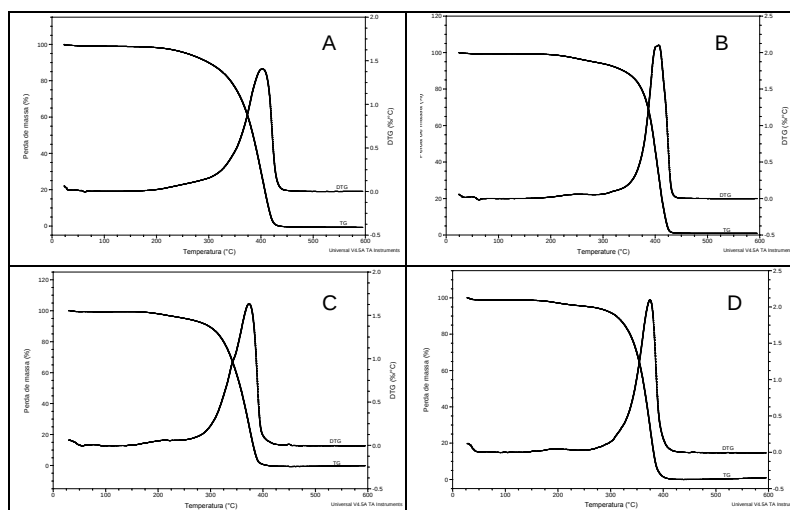


Tabela 15 - Dados de DSC das misturas-físicas (MF) e das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de TB-PLU na presença e na ausência do ciprofloxacino.

Amostras	T _{início} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (J/g) obtido	ΔH (J/g) esperado
MF TB-PLU	52,93	59,13	116,1	133,9
NLS TB-PLU	53,45	57,34	100,5	133,9
MF TB-PLU-CIPRO	47,94	58,99	119,4	121,2
NLS TB-PLU-CIPRO	56,86	58,67	83	121,2

Nas curvas TG/DTG na MF TB-PLU (fig. 28A) a degradação térmica tem início em aproximadamente 175°C e apresenta uma perda de massa de 98,7%. Na MF TB-PLU CIPRO (fig. 28B) a degradação térmica tem início em aproximadamente 225°C e apresenta perda de massa de 97,10%. Para NLS TB-PLU (fig. 28C) o início da degradação ocorre em 150°C com perda de massa de 99,80%. A NLS TB-PLU CIPRO (fig.28 D) tem o início da degradação térmica em 175°C e perda de massa de 98,23%.

Figura 28 – Curvas TG e DTG das misturas-físicas (MF) de TB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras A e B, respectivamente) e das NLS de TB-PLU na ausência e na presença do CIPRO (figuras C e D, respectivamente).



Nas curvas DSC, todas as formulações de NLS apresentaram temperatura de fusão e valor de entalpia menores em relação às suas misturas físicas, demonstrando que ocorreu diminuição no grau de cristalinidade das partículas, o que é desejável para o processo de encapsulação do fármaco. Portanto pode-se sugerir que foram obtidas NLS em formas menos estáveis.

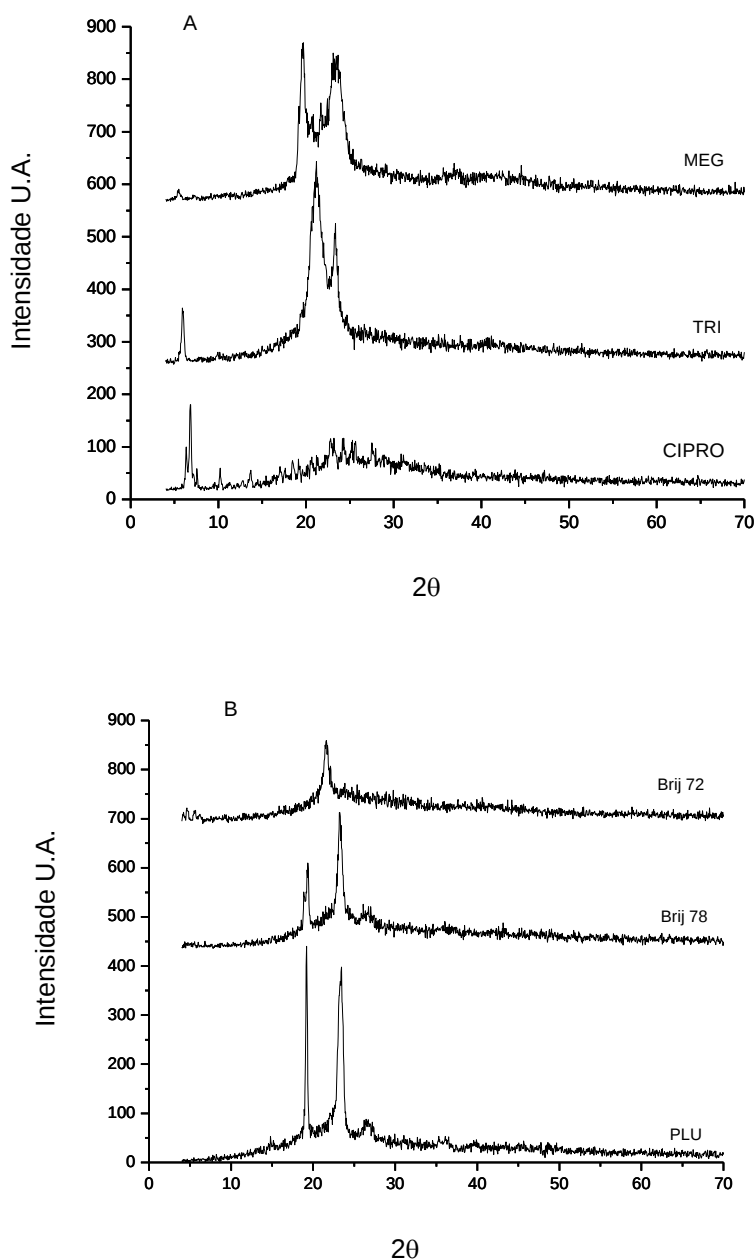
Exceto para a NLS de MB, as demais não apresentaram evento correspondente ao CIPRO, sugerindo que o fármaco esteja solubilizado ou disperso na matriz lipídica, estando de acordo com estudos de SILVA et al., 2011.

5.3.6 - Difração de Raios-X

O estudo pela técnica de difração de raios-X complementa os estudos de DSC para o melhor entendimento da estrutura física das NLS e a interação do fármaco com elas.

Foram analisados os componentes separados, as misturas-físicas, e as formulações obtidas após o processo de ultrassonicação.

A figura 29 mostra os difratogramas dos componentes separados.

Figura 29 - Difratomogramas dos componentes das NLS separados.

O difratograma do MEG apresenta 2 picos de difração bem definidos em $19,60^\circ$ e $23,24^\circ$, que estão de acordo com YAJIMA et al., 2002 e são característicos da estrutura cristalina do seu polimorfo β .

O difratograma da TRI apresenta picos característicos em $5,9^\circ$, $21,13^\circ$ e $23,39^\circ$ que correspondem aos resultados encontrados por MAC NAUGHTAN et al., 2006.

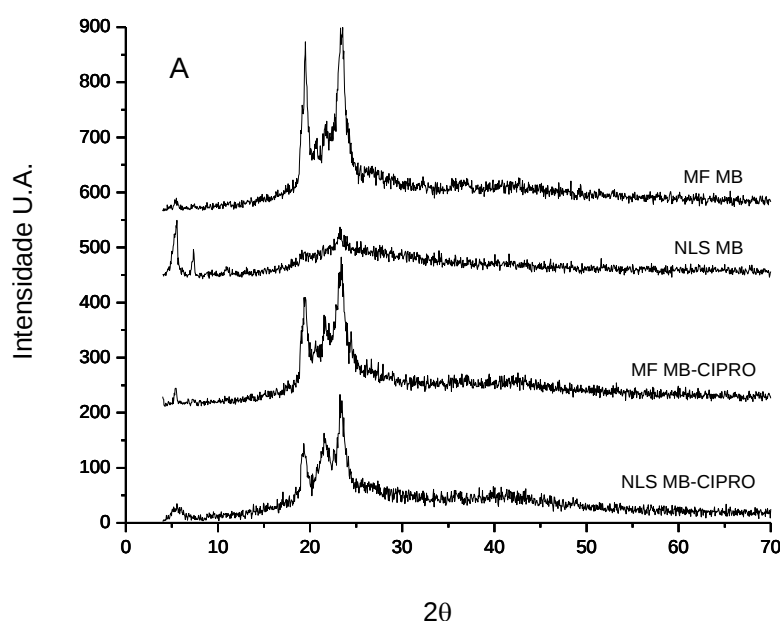
O difratograma de raios-X confirma os picos característicos do ciprofloxacino nas regiões $2\theta = 6-30^\circ$, de acordo com os estudos mostrados por LI et al., 2007.

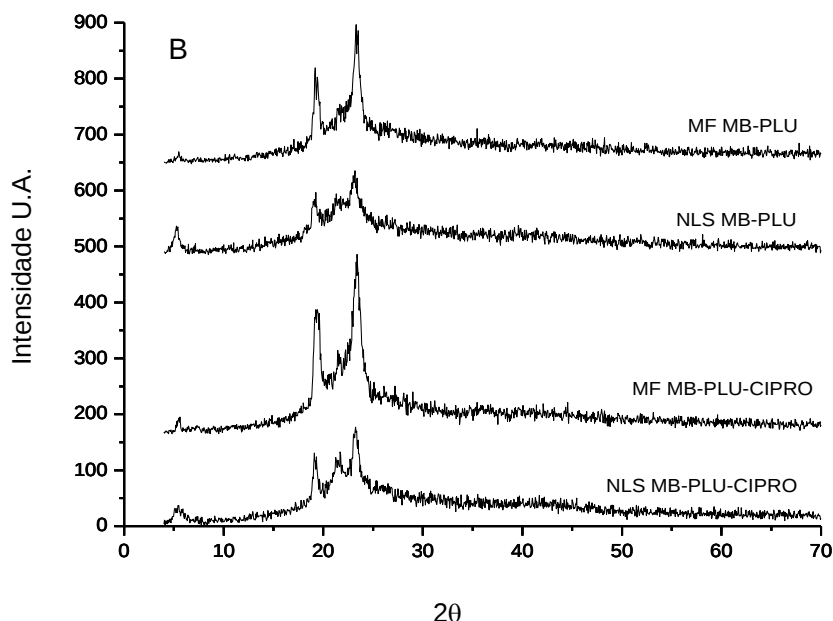
O Brij 72 apresenta um pico característico em $21,63^\circ$, e o Brij 78 apresenta dois picos em $19,37^\circ$ e $23,24^\circ$.

O PLU apresenta 2 picos característicos em $19,25^\circ$ e $23,50^\circ$.

Pode-se verificar na figura (30A) a diferença entre as misturas físicas com as NLS obtidas por ultrassonicação. Nesta figura é visto que a NLS de MB ficou menos cristalina e quando o CIPRO foi adicionado houve um aumento da cristalinidade. No entanto na região de $2\theta = 6^\circ$ observa-se um alargamento do pico da NLS MB CIPRO em relação à sua MF, podendo sugerir que houve redução da cristalinidade e portanto alguma fração do fármaco adicionado na formulação pode ter sido incorporado à matiz lipídica.

Figura 30 - Difratogramas das misturas físicas (MF) e NLS de MB na ausência e na presença de CIPRO (A) e das misturas físicas (MF) e NLS de MB-PLU na ausência e na presença de CIPRO (B).



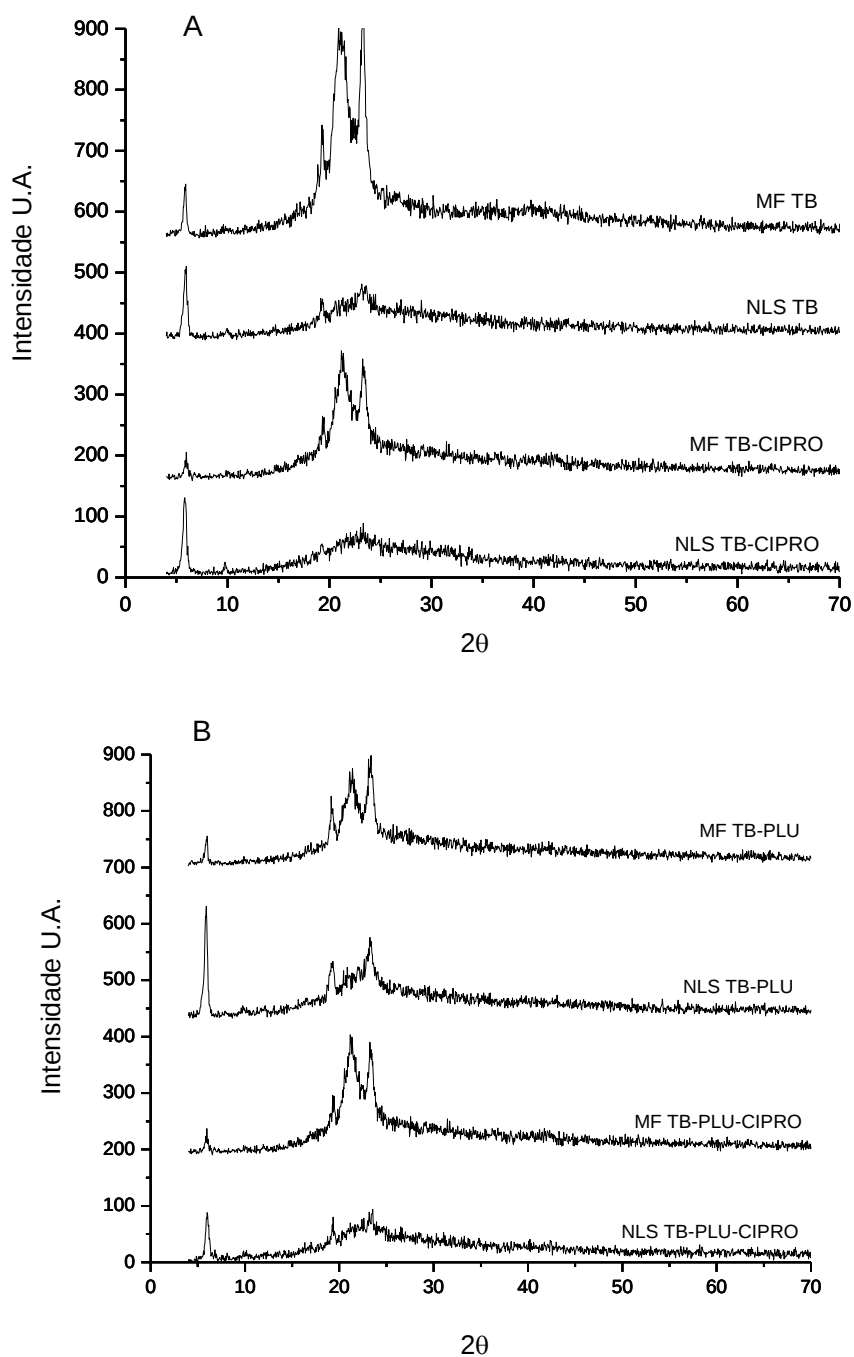


Na figura 30B também há alargamento do pico na região $2\theta = 6^\circ$, indicando redução no grau de cristalinidade das NLS.

Nas figuras 30A e 30B pode-se observar também que existem picos característicos de cristalinidade para as NLS obtidas, no entanto houve alargamento dos picos. Isto pode indicar que o processo de sonicação possibilitou uma desestruturação da matriz lipídica, podendo haver possibilidade para a incorporação do fármaco. No entanto a mudança dos difratogramas das MF e das NLS não foram tão grande quando comparadas ao do MEG puro, podendo indicar um resultado de baixa incorporação do fármaco.

Na figura 31A não foi possível observar os picos de CIPRO nas misturas físicas, porém ele também não foi registrado nas NLS de TB, sendo mais evidente a interação com a matriz lipídica.

Figura 31 - Difratomogramas das misturas físicas (MF) e NLS de TB na ausência e na presença de CIPRO (A) e das misturas físicas (MF) e NLS de TB-PLU na ausência e na presença de CIPRO.



Na figura 31B também não foi possível verificar os picos de CIPRO nas misturas físicas nem nas NLS. Como nas NLS ele não foi visto, pode-se supor que ele interagiu de alguma forma com a matriz lipídica.

Nas figuras 31A e 31B também foi verificado houve alargamento dos picos das NLS em relação às respectivas misturas-físicas. Pode sugerir que houve maior redução do grau de cristalinidade das NLS de TB e TB-PLU quando comparadas com as NLS de MB e MB-PLU. Isto pode indicar que o processo de sonicação possibilitou uma maior desestruturação da matriz lipídica, o que poderia indicar um fator para possibilidade de maior encapsulação do fármaco (SILVA, 2011).

Os dados de difração corroboram com os resultados obtidos por DSC quanto à mudança da cristalinidade dos componentes após a obtenção das NLS por emulsificação seguida de ultrassonicação.

5.4 - Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) é a porcentagem de fármaco que é incorporada nas NLS em relação à quantidade total do fármaco colocada na formulação. A fração livre do fármaco é a quantidade que não está associada e encapsulada nas NLS. Foram calculadas as EE das formulações com a variação da concentração do fármaco, cujos resultados estão mostrados nas tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Eficiência de encapsulação para as NLS de MB e MB-PLU.

Amostras	Concentração Ciprofloxacino			
	2%	3%	4%	5%
NLS MB	56,01±1,17	64,82±2,00	65,15±0,41	66,54±0,40
NLS MB-PLU	51,61±0,08	62,12±2,23	66,18±0,50	68,16±0,72

Tabela 17 – Eficiência de encapsulação para as NLS de TB e TB-PLU.

Amostras	Concentração Ciprofloxacino			
	2%	3%	4%	5%
NLS TB	62,41±0,60	75,27±0,46	79,68±0,10	85,00±0,32
NLS TB-PLU	74,36±0,99	77,01±1,41	89,06±0,20	89,99±0,31

Pode-se observar que a EE foi menor para as NLS de MB e MB-PLU, o que é confirmado pela análise de difração de raio-X. As NLS de TB e TB-PLU tiveram maior porcentagem na EE. Quanto a quantidade de fármaco é aumentada, o valor da EE aumenta também.

Este resultado demonstra que todas as NLS tiveram um bom valor de EE, pois foram usados lipídeos que se estruturam de forma menos organizada, o que está de acordo com os estudos realizados por SOUTO et al., 2011.

6 - CONCLUSÃO

- As NLS desenvolvidas neste trabalho apresentaram resultados de diâmetro, PDI e potencial zeta adequados para servirem como sistemas de liberação por via intraocular, de forma que foram armazenados por período de 60 dias e não houve grande mudança em seus valores.
- As análises por microscopia revelaram que as partículas possuem um formato irregular (anisométrico), e pode-se verificar que as NLS MB tendem a um formato mais próximo do esférico.
- As análises de DSC sugeriram que houve interação entre o fármaco e as matrizes lipídicas, gerando estruturas menos organizadas.
- As análises por DRx demonstraram que principalmente as NLS de TB e TB-PLU apresentaram aspecto menos cristalino quando comparadas com as respectivas misturas-física. Isto pode indicar que o fármaco está incorporado à matriz lipídica.
- A EE demonstrou valores menores para as NLS MB e MB-PLU. Os melhores resultados foram para as NLS TB e TB-PLU. Estes resultados podem estar relacionados com o menor grau de cristalinidade em relação às NLS MB e MB-PLU.
- A Utilização do PLU pode ter contribuído para uma eficiência de encapsulação melhor. Quando ele foi adicionado nas formulações de MB e TB, houve um aumento na EE em relação nas formulações na ausência dele.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.H.; ALLEN JUNIOR, L.V., *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*, 8.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005, 775 p.

APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present, and future perspectives. *Internatinal journal antimicrobialc agents*, v.16, p. 5–15, 2000.

ARAUJO, J.; GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications *Int. J. Pharm.*, v. 393, p. 168-176, 2010.

ATTAMA, A.A.; MÜLLER – GOYMANN, C.C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticles crystallinity. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 315, n. 1-3, p. 189–195, 2008.

ATTAMA, A.A.; SCHICKE, B.C.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Further characterization of theobroma oil beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 64, n. 3, p. 294–306, 2006.

AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 677p., 2005.

AYTEKIN, M.; NESLIHAN GURSOY, R.; IDE, S.; SOYLU, E. H.; HEKIMOGLU, S. Formulation and characterization of liquid crystal systems containing azelaic acid for topical delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 39, n. 2, p. 228–239, 2013.

BRONSTEIN, L. M.; DIXIT, S.; TOMASZEWSKI, J.; STEIN, B.; SVERGUN, D.I.; KONAREV, P. V.; SHITYKOVA, E.; WERNER-ZWANZIGER, U.; DRAGNEA, B. Hybrid Polymer Particles with a Protective Shell: Synthesis, Structure, and Templating. *Chem. Mat.*, v. 18, p. 2418 – 2430, 2006.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n.6, p. 379-402, 2007.

CRAIG, D. Q. M. Pharmaceutical Applications of DSC.In: CRAIG, D. Q. M.; READING, M. Thermal analysis of pharmaceuticals. New York: Taylor & Francis Group, 2007, p. 87-91.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, v.12, n. 1, p. 62-76, 2011.

DEMIREL, M.; YAZAN, Y.; MÜLLER, R.H.; KILIÇ, F.; BOZAN, B. Formulation and in vitro/in vivo evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, v.18, n3, p. 359-371, 2001.

DIEBOLD, Y.; CALONGE, M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in retinal and eye research*, v.29, p. 596-609, 2010.

DIAMOND, J.P.; WHITE, L.; LEEMING, J.P.; BING HOH, H.; EASTY, D.L. Topical 0.3% ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin in treatment of bacterial keratitis: a new method for comparative evaluation of ocular drug penetration. *Br J Ophthalmol.*, v. 79, p. 606–609, 1995.

DORA, C.L.; PUTAUX, J.L.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; DUBREUIL, F.; SOLDI, V.; BORSALI, R.; LEMOS-SENA, E. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.23, n.11, p. 1972-1981, 2012.

FINSY, R.; DE JAEGER, N. Particle Sizing by Photon Correlation Spectroscopy. Part II: Average values. *Particle & Particle Systems Characterization*, v.8 n.1-4, p. 187-193, 1991.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; A.A. SILVA-JÚNIOR; GREMIÃO, M.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev. Bras. Ciên. Farmac.*, v.41, p.301-313, 2005.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International Journal Pharm.*, v. 168, p. 221–229, 1998a.

FREITAS, C., MÜLLER, R. H. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN™). *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.46, n.2, p.145-151, 1998b.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. *US Patent Nº 5250236*, 1993.

GARDOUH, A. R.; GAD, S.; GHONAIM, H. M.; GHORAB, M. M. Design and Characterization of Glyceryl Monostearate Solid Lipid Nanoparticles Prepared by High Shear Homogenization. *British Journal of Pharmaceutical Research*, v.3, n.3, p. 326-246, 2013.

GROSS, R.D.; HOFFMAN, R.O.; LINDSAY, R.N. A comparison of ciprofloxacin and tobramycin in bacterial conjunctivitis in children. *Clin Pediatr (Phila)*., v.36, p. 435–444, 1997.

GU, Z.; ALEXANDRIDIS, P. Osmotic stress measurements of intermolecular forces in ordered assemblies formed by solvated block copolymers. *Macromolecules*, v.37, p. 912-924, 2004.

HALL, S. S., MITRAGOTRI, S., DAUGHERTY, P. S. Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes. *Biotechnol. Prog.*, v.23, n.3, p.749-754, 2007.

HARTEL, R. *Crystallization in foods*. Aspen Publishers:USA, p. 15-22, 2001.

HELGASON, T.; AWAD, T. S.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science*, Oxford, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HERRERA, J.E.; SAKULCHAICHAROEN, N. Microscopic and spectroscopic characterization of nanoparticles, in Drug delivery nanoparticles formulation and characterization, Y. Pathak and D. Thassu, Editors. *Informa healthcare: New York*. p. 239-251, 2009.

HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, M.F. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v.52, p. 5-16, 2001.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physical-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, v. 24, p. 4283 – 4300, 2003.

HIELSHER, T. Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions. *Paris, France*, p.14 – 16, 2005.

HOSNY, K.M. Ciprofloxacin as ocular liposomal gel. *AAPS Pharmscitech.*, v.11, p. 241-246, 2010.

HUGHES, P.M.; OLEJNIK, O.; CHANG-LIN, J.E.; WILSON, C.G. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Advanced drug delivery reviews*, v.57, p. 2010-2032, 2005.

HWANG, D.G. Fluoroquinolone resistance in ophthalmology and the potential role for newer ophthalmic fluoroquinolones. *Survey Ophthalmol.* v.49, p.579-583, 2004.

KABANOV, A.; NAZAROVA, I.; ASTAFIEVA, I.; BATRAKOVA, E.; ALAKHOV, V.; YAROSLAVOV, A.; KABANOV, V. Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-coxypropylene-b-oxyethylene) solutions, *Macromolecules* v. 28, p. 2303–2314, 1995.

KEISTER, J.C.; COOPER, E.R.; MISSEL, P.J.; LANG, J.C.; HAGER, D.F. Limits on optimizing ocular drug delivery. *Journal Pharm. Sci.*, v. 80, p. 50-53, 1991.

KUNTSCHKE, J.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Handbook of materials of nanomedicine*. V. Torchillinn e M. M. Amiji editors, Pan standorford publ., chapter nine, p. 383-444, 2010.

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.

- LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H.; MÄDER, K. Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. *International Journal Pharm.* v.196, p. 227-230, 2000.
- LIU, C.H.; WU, C.T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 353, n. 2-3, p. 149-156, 2010.
- 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. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, p. 247-256, 2008.
- MAA, Y.F.; HSU, C.C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. *Pharmaceutical development of technology*, v.4, n.2, p. 233 – 240, 1990.
- MAC NAUGHTAN, W.; FARHAT, I. A.; HIMAWAN, C.; STAROV, V. M.; STAPLEY, A. G. F. A Differential Scanning Calorimetry Study of the Crystallization Kinetics of Tristearin-Tripalmitin Mixtures. *JAOCs*, v.83, n. 1, p. 1- 9, 2006.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*, v.1, p. 221 – 241, 1991.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; KHALIL, N. M.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Colloidal Carriers for Ophthalmic Drug Delivery. *Current Drug Targets*, v. 6, n. 3, p. 363-371, 2005.
- MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista eletrônica de farmácia*, v. VI (2), p. 1-37, 2009.
- MATOS, J. R.; MACHADO, L.D.B. Análise térmica – termogravimetria. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, p. 209-228, 2004.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles - production, characterization, and applications. *Advanced drug delivery reviews.*, v.47, p.165–196, 2001.
- MELLO-FILHO, P. A. A.; MAIA, M.; RODRIGUES, E. B.; FARAH, M. E. Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 294-9, 2010.
- MENDONÇA DA SILVA, G.C. Penetração do moxifloxacino, ofloxacino e ciprofloxacino na córnea e no humor aquoso de olhos humanos enucleados. Dissertação de doutorado em Ciências Médicas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- MEISNER, D.; MEZEI, M. Liposome ocular delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, v.16, p.75-93, 1995.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for Oral Drug Delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 34, p. 1394-1405, 2008.

MÜLLER, R. H.; LUCKS, J. S. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). *Eur. Patent N° 0605497*. Germany, 1996.

MÜLLER, R.H.; MADER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 50, n.1, p.161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE J. Nanostructured lipidcarriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, n. 6, p. 522–530, 2007.

MÜLLER, R.H.; RADTCKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, p. 121-128, 2002.

MÜLLER, R.H.; RUNGE, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN[®]) for controlled drug delivery, in: S. Benita (Ed.), submicron emulsions in drug targeting and delivery. *Harwood academic publishers, Amsterdam*, p. 219-234, 1998.

NAGARWAL, R.; KANT, S.; SINGH, P.N.; MAITI, P.; PANDIT, J.K. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. *Journal of controlled release*, v. 136, p. 2-13, 2009.

NAYAK, A. P.; TIYABOONCHAI, W.; PATANKAR, S.; MADHUSUDHAN, B.; SOUTO, E. B. Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: Novel approach towards malaria treatment. *Colloids Surf., B*, v. 81, p. 263-273, 2010.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segment of eye. *Advanced drug delivery rev.*, v. 52, p.1-3, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química. Nova*, v.27, p.131-138, 2004.

OLIVEIRA, L.C. Ciprofloxacino encapsulado em lipossomas revestidos com ácido poli-lático-co-glicólico ou veiculados em gel de copolímeros de bloco 'Pluronic[®] F-127'. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

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.; DARE, A. R. J.; MELO JR., L. A. S.; LUCENA, D. R.; SILVA JR., A. A.; OLIVEIRA, A. G.; PIZZOLITTO, A. C.; LAVINSKY, D.; SKAF, M.; SOUZA-FILHO, A. A.; HÖFLING-LIMA, A. L.; NGUYEN, Q. D.; KUPPERMANN, B. D.; HERRERO-VANRELL, R.; BELFORT JR., R. Controlled transscleral drug delivery formulations to the eye: establishing new concepts and paradigms in ocular anti-inflammatory therapeutics and antibacterial prophylaxis. *Expert Opin. Drug Deliv.*, v. 7, n. 8, p. 955-965, 2010.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, v.366, p. 170-184, 2009.

PARHI, R.; SURESH, P. Production of solid lipid nanoparticles – drug loading and release mechanism. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, v.2, n.1., p. 211–227, 2010.

PATHAK, P.; NAGARSENKER, M. Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, n. 3, p. 985-92, 2009.

RADTKE, H.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. Nanostructured lipid carriers: a novel generation of solid lipid drug carriers. *Pharmaceutical technology europe*, v.17, p. 40-45, 2005.

RAWAT, M. K.; JAIN, A.; SINGH, S. *In vivo* and cytotoxicity evaluation of repaglinide-loaded binary solid lipid nanoparticles after oral administration to rats. *J. Pharm. Sci.*, v. 100, p. 2406 - 2417, 2011.

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.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S. C. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and The American Pharmaceutical Association, p. 536 e 739, 2006.

RUKTANONCHAI, U.; SAKULKHU, U., BEJRAPHA, P.; OPANASOPIT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Effect of lipid types on physicochemical characteristics, stability and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded lipid nanoparticles. *Journal of microencapsulation*, v.26, n. 7, p. 614-626, 2009.

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

SANTOS, J. S. Nanopartículas - Aplicações cosméticas e farmacêuticas. Pharmabooks editora, 139 p., 2010.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v.208, p.71-80, 2000.

SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S., FREITAS, L.L., POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, p. 726 – 737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.56, n.3, p.501-505, 2003b.

SCHÄFERT-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, p.427-443, 2007.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Emulsões. *Cosmet. Toiletries*, v.12, n.3, p. 71-74, 2000.

SEYFODDIN, A.; SHAW, J.; AL- KASSAS. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug delivery*, v. 17 (7), p. 467- 489, 2010.

SILVA, A. C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, R.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 86, p. 158-165, 2011.

SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.3, p.347-356, 2007.

SILVA, E. L. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ácido retinóico e ácido láurico para o tratamento tópico da acne vulgaris. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SILVA, P. *Farmacologia*, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SILVA-JÚNIOR, A.A. Micropartículas de ácido poli láctico-co-glicólico obtidas por “spray drying” para liberação prolongada intra-ocular de fármacos. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SILVA-JÚNIOR, 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. *Thermochimica Acta*, v. 467, p. 91-98, 2008.

SILVA, J.R. Nanopartículas com superfície modificada do tipo núcleo-coroa de novos copolímeros de dextrana-policaprolactona para conjugação de ligantes de reconhecimento. Tese de pós-graduação (Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

SNYDER-PERLMUTTER, L.S.; KATZ, H.R.; MELIA, M. Effect of topical ciprofloxacin 0.3% and ofloxacin 0.3% on the reduction of bacterial flora on the human conjunctiva. *Journal cataract refract surg.*, v.26, p.1620-1625, 2000.

SOUTO, E.B.; ALMEIDA, A.J.; LLER, R.H. Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v.3, n.4, p. 317-331, 2007.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídeos sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. *Quim. Nova*, vol. 34, n. 10, 1762-1769, 2011.

STEVENS, S.X; FOURAKER, B.D.; JENSEN, H.G. Intraocular safety of ciprofloxacin. *Arch Ophthalmol.*, v.109, n. 12, p. 1737- 1743, 1991.

SWARBRICK, J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. *Informa Healthcare*, England, 2007.

TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. Lipid - based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update. *Advanced drug delivery reviews.*, v. 60, p. 702 - 716, 2008.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie*, v.61, n.5, p.375-386, 2006.

UNRUH, T.; BUNJES, H.; WESTESEN, K.; KOCH, M.H.J. Observation of size dependent melting in lipid nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, v. 103, p. 10373–10377, 1999.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v.58, p. 1131-1135, 2006.

VANDERWOOT, J.; LUDWIG, A. Ocular drug delivery: nanomedicines application. *Nanomedicine* v.2, p.11- 21, 2007.

VELEZ, G.; WHITCUP, S.M. New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular disease. *Br. J. Ophthalmol.*, v.83, p. 1225-1229, 1999.

VENKATARAM, S.; KHOHLOKWANE, M.; WALLIS, S.H. Differential scanning calorimetry as a quick scanning technique for solid state stability studies. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 21, p. 847-855, 1995.

WANCZINSKI, B. J. Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina veiculados em copolímero termosensível (pluronic F127) para aplicação intraocular. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

WISSING, S.A.; KAYSERB, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, n.9, p. 1257– 1272, 2004.

WONG, H.L; BENDAYAN, R.; RAUTH, A.M.; LI, Y.; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, v.59 n(6), p. 491- 504, 2007.

YAJIMA, T.; ITAI, S.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Determination of Optimum Processing Temperature for Transformation of Glyceryl Monostearate1. *Chem. Pharm. Bull*, v. 50, n. 11, p. 1430-1433, 2002.

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

ZHANG, J.; SMITH, E. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, v.100, p. 896 - 903, 2011.

ZHANG, L.; PORNPATTANANANGKUL, D.; Hu M. J; Huang, C.M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, v.17, p.585-594, 2010.