



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



MICROPARTÍCULAS DE METOTREXATO E ÁCIDO POLI LÁTICO-CO-GLICÓLICO OBTIDAS POR “SPRAY-DRYING”

MIRELA CARDOSO GARCIA

ARARAQUARA

2014



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



MIRELA CARDOSO GARCIA

MICROPARTÍCULAS DE METOTREXATO E ÁCIDO POLI LÁTICO-CO-GLICÓLICO OBTIDAS POR “SPRAY-DRYING”

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a. Dr. Maria Virgínia da Costa Scarpa

ARARAQUARA

2014

Ficha Catalográfica

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

G216m Garcia, Mirela Cardoso
Micropartículas de metotrexato e ácido poli lático-co-glicólico obtidas por "spray-drying"
/ Mirela Cardoso Garcia. — Araraquara, 2014
81 f.

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

Orientador: Maria Virginia Costa Scarpa

1. Metotrexato. 2. Spray-drying. 3. Micropartículas. 4. PLGA. I. Scarpa, Maria Virginia
Costa, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Dedico todo meu trabalho aos meus pais João Tarcísio e Mari, pessoas admiráveis, que apesar das diferenças, de vivermos aos “trancos e barrancos”, sempre me deram apoio, suporte, se dedicaram da maneira que puderam e fizeram o possível e o impossível para eu estar aqui.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois nele mantenho minha Fé e tenho certeza que sem ele nada disso teria sido realizado, nada teria sido feito e ele é soberano. Muitas vezes eu deixei determinadas situações nas mãos dele e tudo foi resolvido. Senhor MUITO OBRIGADA! Como sempre digo ELE ESTÁ NO COMANDO!

A minha família, em especial aos meus pais, **João Tarciso e Mari**, por toda minha educação, pela honestidade, por saber distinguir o correto do errado, pelo esforço para me proporcionar o melhor que podiam; ao meu irmão **Igor**, a minha cunhada **Larine**, pelo incentivo desde o começo desta etapa e companheirismo. Só o fato de saber da existência destas pessoas já me basta. A dona Inês uma pessoa fantástica que faz parte da família!

Agradeço a minha orientadora **Prof^a. Dr. Maria Virgínia da Costa Scarpa** primeiramente por ter me aberto as portas, pela dedicação, paciência e por todo conhecimento adquirido durante a realização desse trabalho.

À minha família que é enorme, mas em especial à minha tia **Ilza**, meu tio **Yataro**, meus primos **Guilherme, Danubia, Vinícius, Doug, Vivi** e suas filhinhas **Mari e Manu**, por todos finais de semana que me aguentaram em sua casa, por todos os passeios e viagens que fizemos, por todo divertimento que conseguiram me distrair, por todas as conversas, desabafos, auriculoterapia, acupuntura entre outras coisas.

Às amigas que fiz durante a realização desse trabalho **Ana Cláudia, Márcia e Nathalia** que fazem parte do meu laboratório e dividimos diversos trabalhos e ajudamos umas as outras. Agradecimento especial a **Kamila** uma pessoa tão parecida comigo que também trabalhamos juntas e nos tornamos tão amigas e companheiras de divertimento, de risadas, histórias, cantorias, danças e comilanças.

Amigos de outros laboratórios como a **Elô, Ju, Mariane, Dani, Danila, João, Profª Leila, Marininha, Bruno, Carol, Josi, Andressa, Lilian, Samir, Fernanda, Mariana, Ariane, Márcia, Ana Luiza e Charlene** agradeço pela força, companheirismo, ajuda em alguns experimentos, incentivo e por todos os momentos que passamos juntos, em especial a **Lilian** que toda vez esteve comigo nos experimentos onde usei o “spray-dryer”, contas de liberação entre outros.

Aos amigos de São Paulo que sinto saudades **Simone, Ricardo, Belle, Carols, Ro, Aninhas, Bruna, Murilo, família Mattos, Pri, Mooca, School, Erick, Carneiro, Di** e outros que durante o tempo de faculdade fizeram diferença e até hoje nos encontramos, os que conheci durante a vida e embelezam minha jornada.

Ao professor **Dr. Anselmo Gomes de Oliveira** por ter cedido um espaço no laboratório de Farmacotécnica para a realização deste trabalho e por permitir a utilização do “Spray-Dryer”, além do apoio e orientações fundamentais para a realização deste trabalho.

À professora **Dr. Hérica Regina Nunes Salgado** por ter cedido um espaço no laboratório de Controle Biológico para a realização deste trabalho e por permitir a utilização do espectrofotômetro de infravermelho.

Ao professor **Dr. Celso Santilli** do Departamento de físico-química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela utilização do DSC, TG e Raios X e sua técnica **Danubia**.

À técnica de laboratório **Fátima Rodrigues (Fati)** por toda a ajuda necessária, pelas conversas diárias, pelo apoio e dedicação.

Aos professores **Gustavo Rossanezzi e Marco Vinícius Chaud** pelas contribuições prestadas no exame geral de qualificação.

À **Neuzinha** que mantém nosso laboratório sempre limpinho e está sempre de bom humor. E à **Olivia** que fica na portaria e responde todos os meus “bom dia” com alegria.

Minha companheira de apartamento, de viagens, de passeios, de corrida, de histórias, de praticamente TUDO, minha cachorrinha chamada **VIDA**! Que literalmente trouxe vida à minha vida!

À Seção de **Pós-graduação**

À **FAPESP**, pela ajuda financeira com a bolsa de mestrado e a reserva técnica.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, meu agradecimento.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”.

Louis Pasteur

Resumo

O metotrexato (MTX) é um antineoplásico de meia vida curta, pouco solúvel em água, álcool, éter e clorofórmio, o que compromete sua biodisponibilidade. O ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) é um polímero biodegradável, que sofre hidrólise no organismo, comumente usado em sistema de liberação prolongada devido suas características de degradação. Micropartículas de PLGA/fármaco obtidas por spray-drying têm sido empregadas em diversas patologias, incluindo doenças do segmento anterior e posterior do olho. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar micropartículas de PLGA contendo MTX obtidas por spray-drying para potencial administração intraocular. Micropartículas de PLGA contendo MTX em duas diferentes concentrações foram obtidas. A morfologia das micropartículas demonstraram-se de forma esférica e quanto mais se adiciona fármaco, a partícula tende a se deformar e o fármaco a se depositar na superfície da partícula. As análises de infravermelho (FTIR) sugerem a ocorrência de uma mistura física entre o PLGA e o MTX, provavelmente da interação entre os ácidos carboxílicos e aminas presentes no MTX com os ésteres da molécula do PLGA. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X resultam que o MTX está disperso na matriz polimérica com a prevalência de estado amorfo, favorecendo a eficiência de encapsulação (superior a 80%) e liberação, onde as micropartículas PLGA contendo MTX 10% obtiveram um perfil de liberação prolongada após 72 horas, enquanto as contendo 50% caracterizaram um efeito “burst” inicial e uma liberação mais lenta. Os resultados experimentais conclui êxito na obtenção das micropartículas de PLGA contendo MTX por spray drying e seu potencial como sistema de liberação prolongada de fármaco podendo ser interessante no tratamento ocular.

Palavras chaves: metotrexato; poli (ácido lático-co-ácido glicólico) PLGA; spray drying; micropartículas biodegradáveis; liberação prolongada.

Abstract

Methotrexate (MTX) is an antineoplastic agent of a short half-life, poorly soluble in water, alcohol, ether and chloroform, which affects your bioavailability. Poly lactic acid-co-glycolic acid (PLGA) is a biodegradable polymer that is hydrolyzed in the body, often used in controlled release system because of your characteristics the degradation. Microparticles PLGA / drug obtained by spray drying have been used in various pathologies, including anterior and posterior segment of the eye diseases. The aim of this study was to develop and characterize PLGA microparticles containing MTX obtained by spray-drying for a potential intraocular administration. PLGA microparticles containing MTX at two different concentrations were obtained. The morphology of the microparticles was spherical and the more drug is added, the particle tends to deform and the drug to be deposited on the particle surface. The infrared analysis (FTIR) suggest the occurrence of a physical mixture of PLGA and MTX, probably the interaction between carboxylic acids and amines present in MTX and the esters in PLGA molecule. The differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction result that MTX is dispersed in the polymeric matrix with the prevalence of amorphous state, favoring the encapsulation efficiency (greater than 80%) and release, where PLGA microparticles containing 10% MTX showed sustained release profile after 72 hours, while containing 50% MTX characterize an initial "burst effect" and a slower release. The experimental results concludes successfully in obtaining microparticles PLGA containing MTX by spray drying and its potential as sustained drug release system may be interesting in treatment of eye diseases.

Keywords: Methotrexate; poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA; spray drying; biodegradable microparticles; drug delivery systems.

Sumário

Lista de abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iv
1. Introdução	02
1.1. Metotrexato	02
1.2. Sistema de liberação controlada	03
1.3. PLGA	04
1.4. Micropartículas	05
1.5. Spray Drying	06
1.6. Terapia Ocular	08
2. Objetivos	12
3. Materiais	13
3.1. Reagentes e solventes	14
3.2. Equipamentos e acessórios	14
4. Métodos	15
4.1.1. Obtenção das micropartículas de PLGA	16
4.1.2. Obtenção das micropartículas de PLGA contendo MTX	16
4.2. Validação do método analítico	17
4.2.1. Seleção do comprimento de onda representante do MTX por espectrofotometria UV-Vis	17
4.2.2. Curva de Ringbom e Linearidade	17
4.2.3. Especificidade	18
4.2.4. Precisão	18
4.2.5. Exatidão	19
4.2.6. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	19

4.2.7.	Robustez	19
4.3.	Eficiência de incorporação	20
4.4.	Características Morfológicas	20
4.4.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	20
4.4.2.	Microscopia de Força Atômica (MFA)	20
4.4.3.	Determinação do tamanho de partículas por espalhamento de luz e potencial zeta	21
4.5.	Difração de Raios X	22
4.6.	Análise Térmica	23
4.6.1.	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	23
4.6.2.	Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)	23
4.7.	Espectroscopia na região do infravermelho	23
4.8.	Liberação “in vitro” das micropartículas de PLGA+ MTX	24
5.	Resultados e Discussão	25
5.1.	Obtenção das micropartículas de PLGA contendo MTX	26
5.2.	Validação do método analítico	26
5.2.1.	Seleção do comprimento de onda representante do MTX por espectrofotometria UV-Vis	26
5.2.2.	Curva de Ringbom e Linearidade	28
5.2.3.	Especificidade	31
5.2.4.	Precisão	32
5.2.5.	Exatidão	33
5.2.6.	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	33
5.2.7.	Robustez	34
5.3.	Análise quantitativa do fármaco encapsulado	35
5.4.	Características Morfológicas	35
5.4.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
5.4.2.	Microscopia de Força Atômica (MFA)	38
5.4.3.	Determinação do tamanho de partículas por espalhamento de luz e potencial zeta	42
5.5.	Difração de Raios X	43
5.6.	Análise Térmica	46
5.6.1.	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	46

5.6.2.	Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)	46
5.7.	Espectroscopia na região do infravermelho	52
5.8.	Liberação “in vitro” das micropartículas de PLGA+ MTX	55
6.	Conclusões	58
7.	Referências Bibliográficas	59

Lista de Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EE%	Eficiência de encapsulação em percentagem
FTIR	Espectrometria no infravermelho por transformação de Fourier
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
MTX	Metotrexato
PLA	Ácido poli-lático
PLGA	Ácido poli-lático-co-glicólico
rpm	Rotações por minuto
TGA	Termogravimetria
UV	Radiação ultravioleta
VIS	Visível

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular do metotrexato	02
Figura 2. Síntese de poli (L-ácido láctico co-ácido glicólico) – PLGA (MIDDLETON, TIPTON, 2000)	05
Figura 3. Representação esquemática de um “spray dryer” (LANNES; MEDEIROS, 2003)	07
Figura 4. Representação esquemática do olho humano (SANDERS, PEETERS, DEMEESTER <i>et al.</i> , 2007)	08
Figura 5: Representação esquemática do processo de administração intraocular por via tópica (HUGHES; OLEJNIK; CHANG-LIN, <i>et. al.</i> , 2005)	09
Figura 6. Esquema de administração por injeção intravitreal (THRIMAWITHANA; YOUNG; BUNT, <i>et. al.</i> , 2011)	10
Figura 7. Espectro de absorção em UV-Vis do MTX, concentração de 5µg/mL, tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4	27
Figura 8: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 303nm para solução de MTX em tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4.	29
Figura 9. Curva padrão de soluções de MTX, concentrações entre 5 e 12µg/mL	30
Figura 10. Espectro de absorção do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA+MTX	31
Figura 11. Fotomicrografia do MTX sob aumento de 100x e 1500x	36
Figura 12. Fotomicrografia das micropartículas de PLGA sob aumento de 5000x e 15000x	36
Figura 13. Fotomicrografia das micropartículas PLGA+MTX 10% sob aumento de 3500x e 9000x	37
Figura 14. Fotomicrografia das micropartículas 50% sob aumento de 3500x e 9000x	38
Figura 15 Imagem de tamanho, fase e amplitude de MFA das micropartículas de PLGA em escala de 3,3µm e para amplitude de 10µm	39
Figura 16. Imagem de tamanho, fase e amplitude de MFA das	

micropartículas PLGA+MTX 10% em escala de 3,0 μ m e para amplitude 16 μ m	39
Figura 17. Imagem de tamanho e de fase de MFA das micropartículas PLGA+MTX 50% em escala de 3,0 μ m e para amplitude 19,9 μ m	40
Figura 18. Imagem topográfica de MFA (A) micropartículas de PLGA; (B) micropartículas PLGA+MTX 10%; (C) micropartículas PLGA+MTX 50% em escala de 3,0 μ m	41
Figura 19. Difratoograma de raios X obtido para o MTX em 2 θ 4° e 50°	44
Figura 20. Difratoograma de raios X obtido para micropartículas PLGA em 2 θ 4° e 50°	45
Figura 21. Difratoograma de raios X obtido para micropartículas PLGA+MTX 10%(A) e 50% (B) em 2 θ 4° e 50°	45
Figura 22. Curva de DSC das micropartículas de PLGA	47
Figura 23. Curvas de TG/DTG das micropartículas de PLGA	47
Figura 24. Curva de DSC do MTX	48
Figura 25. Curvas de TG/DTG do MTX	48
Figura 26. : Curva de DSC das micropartículas de PLGA+MTX 10%	49
Figura 27. : Curvas de TG/DTG das micropartículas de PLGA+MTX 10%	49
Figura 28. Curva de DSC das micropartículas de PLGA+MTX 50%	50
Figura 29. Curva de TG/DTG das micropartículas de PLGA+MTX 50%	51
Figura 30: Espectro de infravermelho do MTX e estrutura molecular do MT	52
Figura 31: Espectro de infravermelho do PLGA	53
Figura 32: Espectro de infravermelho de micropartículas contendo 50% MTX	54
Figura 33: Espectro de infravermelho do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGAMTX 10% e 50%	54
Figura 34: perfil de liberação das micropartículas de PLGA contendo MTX 10% e 50% (n=9)	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Obtenção da curva de Ringbom do método espectrofotométrico UV-Vis para análise do MTX a 303 nm.	28
Tabela 2. Resultados obtidos na análise intra-corrida, da solução de metotrexato, por espectrofotometria , $\lambda = 303\text{nm}$	32
Tabela 3. Resultados obtidos na análise inter-corrida, da solução de metotrexato, por espectrofotometria, $\lambda = 303\text{nm}$	32
Tabela 4. Resultados obtidos de exatidão do método espectrofotométrico para determinação analítica de micropartículas de PLGA+MTX, $\lambda = 303\text{nm}$	33
Tabela 5. Resultados obtidos na análise de robustez em diferentes comprimentos de ondas, da solução de metotrexato, em espectrofotômetro Shimadzu UV- vis Uv-mini 1240.	34
Tabela 6. Resultados obtidos na análise de robustez em comprimento de onda de 303nm, da solução de metotrexato, em espectrofotômetro Shimadzu UV- vis Uv- 1800 e Shimadzu UV- vis Uv-mini 1240.	34
Tabela 7. eficiência de encapsulação das micropartículas de PLGA+MTX 10% e 50% pelo método de spray-drying.	35
Tabela 8: Valores de potencial zeta e tamanho de partícula do metotrexato e das micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX nas concentrações de 10% e 50%.	42
Tabela 9: Resultado TG/DTG do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA+MTX 10% e 50% referenciando os eventos e suas respectivas temperaturas (°C) e perdas de massa (%)	51

1. Introdução

1. Introdução

Sistemas de liberação prolongada de fármacos vêm sendo desenvolvidos no intuito de promover concentrações plasmáticas adequadas e efeito terapêutico durante um determinado período de tempo, visando também diminuição de toxicidade.

Diferentes estratégias são utilizadas para obtenção do perfil de liberação prolongada, como formação de micro e nanopartículas e o uso de polímeros. Dentre os polímeros estão os biodegradáveis, como a quitosana, PLA e PLGA, pois são absorvidos pelo organismo e possuem baixa toxicidade.

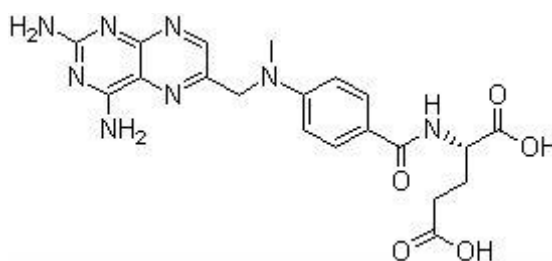
Dentre as patologias as mais estudadas com sistema de liberação controlada são as que possuem sucessivas doses de medicamentos diárias ou semanais, incluindo as neoplasias que além de possuírem um grande acometimento em serem humanos atualmente também possuem um quadro medicamentoso delicado.

A relevância desta pesquisa é a obtenção de micropartículas de PLGA para liberação prolongada de metotrexato (MTX).

1.1. Metotrexato

O metotrexato (Figura 1), também chamado de ametofterina, é análogo do ácido fólico. O ácido fólico é indispensável no ciclo celular, sobretudo na fase S (síntese), durante a qual ocorre alta atividade de síntese de DNA e de algumas proteínas. Por esse motivo o MTX é utilizado como antineoplásico desde 1953 (OLSEN; DURHAM, 1991; NAGULU; KIRAN; REDDY, *et. al.*, 2009).

Figura 1: Estrutura molecular do metotrexato.



Quanto às suas propriedades físico-químicas, o MTX caracteriza-se por ser um pó cristalino amarelo de peso molecular 454,4. Insolúvel em água, etanol, éter e clorofórmio. A molécula possui dois grupos carboxílicos com constantes de dissociações (pKa) de 3,36 e 4,70 e uma função nitrogenada com pKa de 5,70 (RUBINO, 2001).

Quando administrado por via oral, o MTX possui meia vida relativamente curta (cerca de 45 minutos), possuindo a necessidade de doses elevadas ou repetidas do fármaco para manutenção de concentração no tecido alvo. Portanto, o encapsulamento do MTX com polímeros pode aumentar sua meia vida, além de propiciar um sistema de liberação prolongado, seja por via oral, parenteral ou subcutâneo (SINGH; UDUPA, 1996).

Além de possuir meia vida curta, o MTX é excretado pelos rins e tem como efeito secundário nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, supressão da medula óssea entre outros efeitos indesejáveis e para superar tais efeitos da droga e doses uma alternativa é desenvolver um sistema de liberação diferenciado para o órgão alvo diretamente (PEREIRA; COSTA; SANTOS, *et. al.*, 2014).

O MTX vem sendo usado cada vez mais na oftalmologia, tanto na administração local, como sistêmica, incluindo as injeções intravitreaais. Segundo Hardwig e colaboradores (2006), injeções intravitreaais com metotrexato já foram utilizadas seguramente no tratamento de pacientes com doenças oculares obtendo-se sucesso.

Para o tratamento de uveites e edemas na mácula também já foram utilizadas esse tipo de injeções intravitreaais contendo MTX (TAYLOR; HABOT-WILNER; PACHECO *et. al.*, 2009) e para retinoblastoma (KIVELÃ; ESKELIN; PALOHEIMO, 2011), porém com doses repetitivas num curto intervalo de tempo.

1.2. Sistema de Liberação Controlada

Ansel e colaboradores (2005) definiu sistema de liberação modificada (SLM) como qualquer sistema que possua um perfil de liberação do medicamento diferente do convencional. Dentre suas definições estão liberação de forma controlada, prolongada e sustentada. Na liberação controlada o fármaco é liberado em quantidades semelhantes em intervalos de tempo; na liberação prolongada o

fármaco possui liberação num período de tempo maior quando comparado ao sistema de liberação convencional; e a liberação sustentada o fármaco é liberado de modo que se mantenha constante a taxa de liberação em certo intervalo de tempo.

A administração convencional, como a administração oral, geralmente não proporciona liberação controlada de fármaco, com direcionamento ao órgão alvo, baixa concentração de fármaco e baixa toxicidade. Portanto, estudos de novos sistemas de liberação controlada vêm sendo desenvolvidos no intuito de sanar esses obstáculos (FREIBERG; ZHU, 2004).

Os sistemas de liberação controlada compreendem o uso de microemulsões, microesferas, lipossomas, polímeros, géis, nanopartículas lipídicas sólidas entre outros para aumentar absorção e retenção do fármaco e consequentemente melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco no olho (LUO; ZHAO; ZHANG, *et. al.*, 2011).

Dentre os polímeros utilizados, os mais recomendados são os biodegradáveis, como aqueles de origem biotecnológica PLA (LI; GUO; FAN, *et. al.*, 2013), PLGA (SILVA-JUNIOR; SCARPA; PESTANA, *et. al.*, 2008) e de origem natural como a quitosana (VASILE; OPREA; VOICU, *et. al.*, 2013).

No sistema ocular, por possuir determinada limitação de absorção, também são desenvolvidas diferentes formas de administração de medicamentos em busca de três objetivos principais:

- 1- melhorar a biodisponibilidade do fármaco (URICH, 1999).
- 2- aperfeiçoar o controle da liberação (HUGHES, 2005).
- 3- aumentar disponibilidade no sítio de absorção, aumentando assim o efeito terapêutico (DING, 1998).

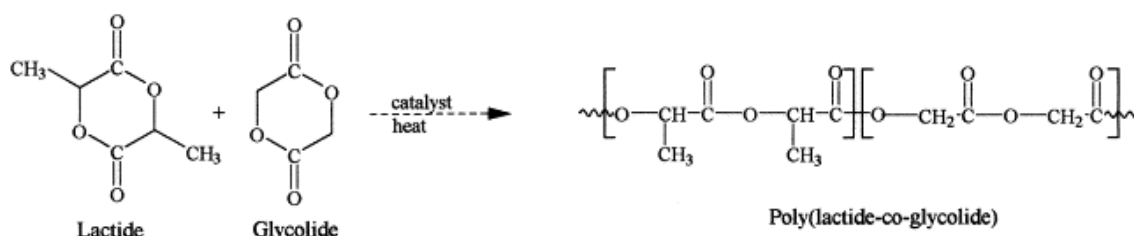
1.3. PLGA

Existem diversos polímeros biodegradáveis, porém o PLGA (Figura 2) é um polímero que sofre degradação por hidrólise no organismo gerando o ácido glicólico e o ácido láctico que são absorvidos. Possui baixa toxicidade e seu tempo de degradação pode ser ajustado pela proporção de ácido glicólico e láctico no polímero (SANTOS-JUNIOR; WADA, 2007).

Micropartículas preparadas com PLGA têm sido utilizadas, pois possui diversas vantagens, como liberação controlada de fármacos, por ser biodegradável

não precisam ser removidas do organismo, possui uma ótima biocompatibilidade e possuem segurança para o uso em humanos (KLOSE; DELPLACE; SIEPMANN, 2011).

Figura 2: Síntese de poli (L-ácido láctico co-ácido glicólico) – PLGA (MIDDLETON, TIPTON, 2000).



1.4. Micropartículas

As micropartículas podem ter tamanho de cerca de 1µm até alguns milímetros, a forma geralmente esférica e serem constituídas de microesferas nas quais o fármaco pode estar incorporado. São aplicáveis para sistemas intraoculares, pois dependendo da sua composição são biodegradáveis, biocompatíveis e apresentarem baixa toxicidade (OLIVEIRA; SCARPA; BUENO, *et. al.*, 1992).

Para uso ocular é conveniente que as micropartículas não ultrapassem o tamanho de 10µm, para não causarem incomodo e irritação. Portanto, quanto menor a partícula, maior conforto proporcionará ao paciente, resultando em maior adesão ao tratamento medicamentoso (ZIMMER; KREUTER, 1995).

Geralmente as micropartículas são mais adequadas quando comparadas às nanopartículas, pois sua liberação pode ser por um período maior, devido sua área de superfície (NATH; SON; SADIASA, *et. al.*, 2013).

Há diversos métodos de formação das micropartículas: métodos físicos (*spray-drying*, liofilização, co-cristalização, emulsificação e leito fluidizado), químicos (polimerização interfacial e inclusão molecular) e físico-químicos (emulsificação seguida de evaporação do solvente e coacervação) (SUAVE; DALL'AGNOL; PEZZIN, *et. al.*, 2006).

1.5. Spray Drying

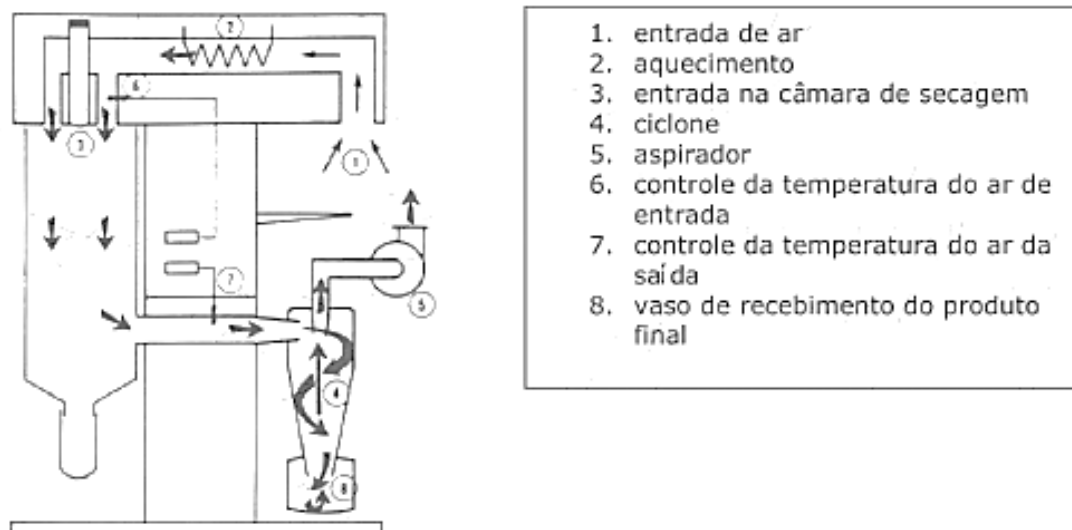
A técnica de secagem por atomização (spray drying) consiste em dispersar ou dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico e atomizar via aspersor criando microgotas. Quando as mesmas entram em contato com o ar na câmara de secagem à temperatura superior ao ponto de ebulição do solvente fazem com que o solvente evapore formando micropartículas (FU; SHYU; SU, *et. al.*, 2002).

Spray drying pode ser utilizado na indústria alimentícia (transformação em pó, mascarar sabor), produção industrial de aerossóis de pó seco, microencapsulação (liberação controlada) e secagem de materiais termo-sensíveis (CHAN; TAN; HENG, 2008).

Alguns parâmetros do spray-dryer, representado na Figura 3, devem ser controlados durante o processo, tais como a temperatura de entrada e saída da dispersão, sendo que a temperatura de entrada deve ser maior que a temperatura de ebulição do solvente utilizado para sua total evaporação. A temperatura deve diminuir durante o processo, antes da amostra de micropartículas entrar no ciclone, e esta é considerada a temperatura de saída. Somente então se obtém as micropartículas atomizadas e secas. O aspirador retira o ar seco e ao mesmo tempo produz um vácuo parcial. O fluxo de ar pressurizado necessário, para atomizar a dispersão da amostra de forma eficiente, pode variar entre 100 – 800 NL/h (NL= Normliter). O ar pode ser substituído por outro gás se necessário (BUSCHI; CARDOSO; LUCHESI, *et. al.*, 2003).

O rendimento de todo processo de secagem por atomização também é influenciado pelo aspirador, além da concentração da amostra a ser seca, ponto de ebulição do solvente orgânico, entre outros (JENSEN; CUN; MALTESEN, *et. al.*, 2010).

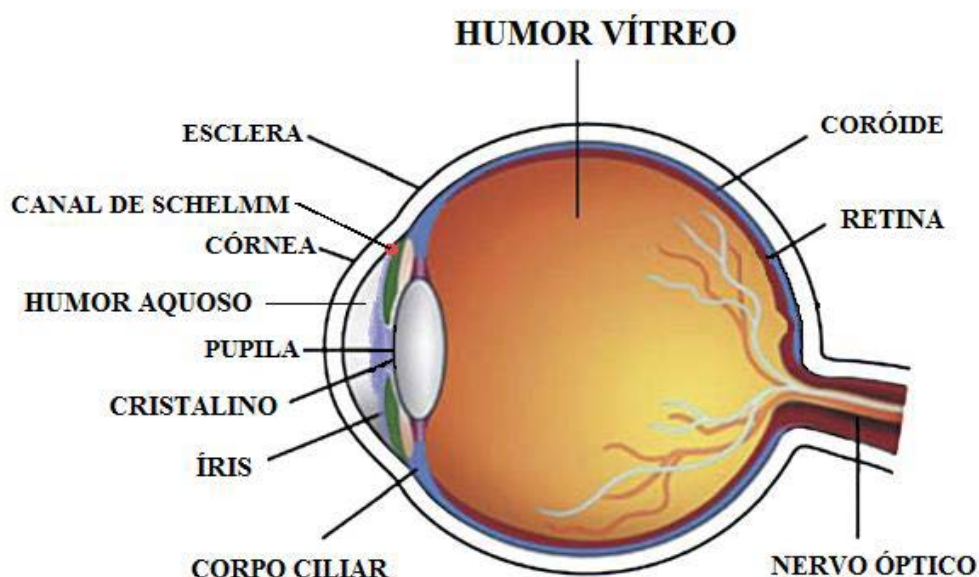
Figura 3: Representação esquemática de um “spray dryer” (LANNES; MEDEIROS, 2003).



1.6. Terapia Ocular

O olho humano é dividido em segmento anterior e posterior como pode ser observado na Figura 4. O segmento anterior é composto pela córnea, íris, pupila, cristalino, canal de Schelmm e corpo ciliar. O segmento posterior é composto pela retina, coroide e nervo óptico.

Figura 4: representação esquemática do olho humano (SANDERS, PEETERS, DEMEESTER *et. al.*, 2007).

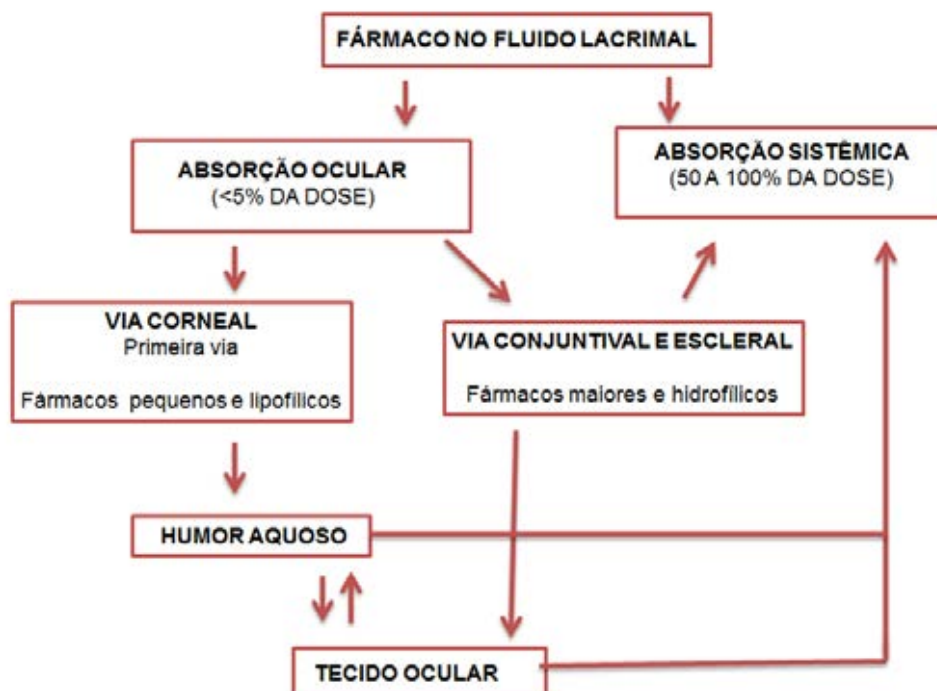


No segmento anterior a estrutura relevante é a córnea, constitui de um tecido avascular, resistente, com diâmetro cerca de 12 mm e espessura 520µm. Corresponde a principal estrutura de proteção com cinco camadas (epitélio, membrana basal, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio) que formam uma barreira anatômica contra partículas “estranhas” ao olho. (HORNOF; TOROPAINEN; URTTI, 2005).

Na terapia ocular os fármacos são preferencialmente administrados por via tópica, devido à facilidade de acesso e adesão ao paciente (HUGHES; OLEJNIK; CHANG-LIN, *et. al.*, 2005). Porém, após a administração o fármaco permanece no

olho por um período muito curto (1-2min), pelo fato de entrar em contato com fluido lacrimal, que é produzido e liberado constantemente (0,5 – 2,2 μ L/min) e com isso apenas uma pequena fração do fármaco é absorvida comparada à quantidade administrada conforme observado na Figura 5 (URTTI, 2006).

Figura 5: Representação esquemática do processo de administração intraocular por via tópica (HUGHES; OLEJNIK; CHANG-LIN, et. al., 2005).

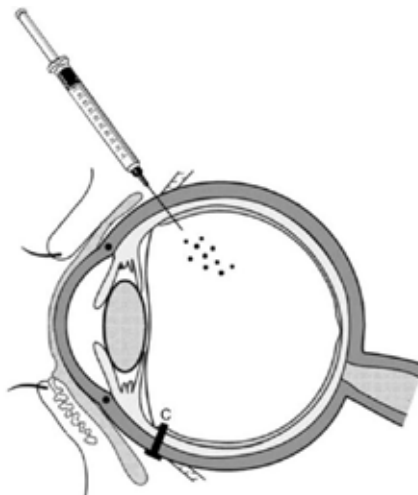


A efetividade da via de administração tópica compreende doenças no segmento anterior do olho, pois não permite alcançar o segmento posterior do olho (NAGARWAL; KANTS; SINGH, et. al., 2009). Pela dificuldade do fármaco em atingir o segmento posterior do olho, devido às barreiras anatômicas e fisiológicas, passando pela córnea e o fluxo do humor aquoso (segmento anterior) estando presente em todo humor vítreo, desenvolveu-se a técnica de injeção intravítrea direta (SCHULMAN; PEYMAN, 1993).

A injeção intravítrea direta representada na Figura 6 não precisa ultrapassar as barreiras descritas, e vêm sendo empregada na administração de antibióticos, corticosteroides e antineoplásicos. No entanto, para atingir níveis terapêuticos

eficazes são necessárias aplicações frequentes por esta via, o que causa desconforto ao paciente, além do alto custo (BOCHOT; FATTAL, 2012).

Figura 6: esquema de administração por injeção intravítrea (THRIMAWITHANA; YOUNG; BUNT, *et. al.*, 2011).



Os três tipos de tumores oculares mais frequentes são retinoblastoma, carcinoma de conjuntiva e o melanoma de coroide (COSTA, 1997).

O retinoblastoma é um tumor maligno, desenvolvido na retina, normalmente de caráter hereditário, decorrente de mutações genéticas e acomete principalmente crianças (KNUDSON-JUNIOR, 1971).

Os tumores ligados à conjuntiva representam amplo espectro de tumores malignos e benignos, que acarretam desde perda de visão até perda da vida. O carcinoma de conjuntiva é muito comum e aparece na região entre a esclera e a córnea. São raros os casos em que aparece na conjuntiva palpebral ou no epitélio corneano (COSTA, 1997).

O melanoma de coroide acomete mais adultos, principalmente maiores de 55 anos e representam cerca de 5 a 6% de todos os melanomas diagnosticados, porém sua incidência é baixa com cerca de 6 casos em 1 milhão (BINDA; CEJAS; ZUK, *et. al.*, 2005).

Os tumores oculares em geral podem ser tratados com laser, radioterapia (BINDA; CEJAS; ZUK, *et. al.*, 2005), tratamentos auxiliares, que incluem as injeções intravítreas de metotrexato (NAKAUCHI; TAKASE; SUGITA, *et. al.*, 2010) e alguns casos quimioterapia e até remoção do olho.

2. Objetivos

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo desenvolver por spray-drying micropartículas de PLGA contendo MTX capazes de liberar de forma controlada o fármaco.

Para alcançar este objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- Preparação das micropartículas PLGA contendo MTX;
- Validação da técnica de análise quantitativa do fármaco nas micropartículas;
- Caracterização físico-química das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA), determinação do tamanho médio de partículas por espalhamento de luz, potencial zeta, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e espectroscopia na região do infravermelho.
- Obtenção do perfil de liberação “*in vitro*” das micropartículas de PLGA contendo MTX.

3. Materiais

3.1. Reagentes e Solventes

- Metotrexato (pó) Genix (China) / grau de pureza 99,8%.
- D, L-PLGA 50/50, Purac (USA).
- Ácido acético glacial QUEMIS (Brasil) / grau de pureza 99,8%.
- Água deionizada, ultrapura, obtida em equipamento Milli-Q-Plus.
- Acetona LABSYNT (Brasil).
- Tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4.

3.2. Equipamentos e acessórios

- Spray Dryer de laboratório, BUCHI, modelo B191.
- Balança analítica, METTLER, modelo H51.
- Espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu, modelo Prestige-21.
- Termobalança Shimadzu, modelo TGA-50.
- Espectrofotômetro Shimadzu UV- vis, modelo Uv-mini 1240.
- Espectrofotômetro Shimadzu UV- vis, modelo Uv- 1800.
- Centrífuga Fischer Scientific, modelo 225 (rotação máx. 4137 rpm).
- Microscópio eletrônico de varredura JEOL® modelo JSM T330A.
- DSC Q100 – TA®;
- Medidor de pH B474 – Micronal®.
- Microscópico de Força Atômica Bruker® - modelo ICON.
- Light Scattering Zetasizer Nano - Malvern®.
- Difratorômetro de raio X Rigaku®, modelo Dmax 2500PC.
- Dessecador com sílica.
- placa de mica.
- cubeta de quartzo.
- vidrarias necessárias e outros acessórios.

4. Métodos

4.1. Obtenção das micropartículas

4.1.1. Micropartículas de PLGA

PLGA foi dissolvido em acetona e acrescentou-se ácido acético glacial, mantendo os mesmos parâmetros do item 4.1.2. (mesmas quantidades).

4.1.2. Micropartículas de PLGA contendo MTX

MTX foi dissolvido em ácido acético glacial (A) enquanto PLGA foi dissolvido em acetona (B), após estas etapas, verteu-se A em B delicadamente (Figura 7) e obtiveram-se soluções finais de proporção fármaco-polímero 10% e 50%, que foram testadas posteriormente quanto à eficiência de encapsulação e liberação para a escolha da formulação mais viável.

Essas soluções foram atomizadas no “spray-dryer” utilizando aspensor padrão de 0,7 mm e operado nas seguintes condições:

- temperatura de entrada de ar: 85°C
- temperatura de saída de ar: 50°C
- fluxo de ar de atomização: 450 NL/h
- fluxo da bomba de alimentação: 20%
- eficiência do aspirador: 80%

O equipamento foi previamente estabilizado utilizando apenas o sistema solvente com o intuito de estabilizar as condições de temperatura, para passar as amostras. As micropartículas obtidas foram coletadas com o auxílio de uma espátula e armazenadas em frascos de vidro em dessecador.

4.2. Validação do método analítico

A validação do método de análise quantitativa do MTX por espectroscopia UV-Visível foi realizada a fim de garantir adequabilidade e confiabilidade do método utilizado segundo ICH 2005.

Entre os parâmetros analíticos estão:

- especificidade
- linearidade
- precisão
- exatidão
- limite de detecção (LD)
- limite de quantificação (LQ)
- robustez

4.2.1. Seleção do comprimento de onda representante do MTX por espectrofotometria UV-Vis

Partindo-se de uma solução inicial de MTX em tampão fosfato monobásico 0,1M pH 7,4 de 500 µg/mL, foi feita diluição para concentração final de 5 µg/mL e foi realizada varredura de 200 a 600nm em cubeta de quartzo em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV- vis, modelo Uv-mini 1240), a fim de verificar o comprimento de onda de máxima absorção do MTX.

4.2.2. Curva de Ringbom e Linearidade

A curva de Ringbom foi feita com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método UV-Vis obedece à linearidade. Foram preparadas concentrações crescentes de MTX em tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4 para obtenção da curva analítica de 22 pontos. As análises foram feitas em triplicada para cada concentração.

A partir da Curva de Ringbon, a linearidade do método espectrofotométrico foi determinada através da obtenção da curva analítica a partir de uma solução estoque de MTX em tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4, concentração 500 µg/mL.

Diferentes alíquotas foram preparadas a fim de obter concentrações entre 2 e 13 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração.

Foi construído o gráfico da concentração do fármaco (µg/mL) em função dos valores de absorvância ($\lambda=303$ nm), determinou-se a equação da reta pela regressão linear e o coeficiente de correlação da curva analítica do fármaco (r^2).

4.2.3. Especificidade

Este parâmetro foi determinado através do espectro de absorção do UV-Vis do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA com MTX na finalidade de avaliar presença de interferentes, como impurezas e verificar a existência de interferência entre polímero e o fármaco.

4.2.4. Precisão

A precisão foi calculada descrevendo o desvio padrão (DP) e coeficiente de variação percentual (CV%) dos valores de absorvância obtidos na análise espectrofotométrica de três amostras com concentrações conhecidas (uma baixa, uma média e uma alta) 5, 8 e 12µg/mL, de três soluções diferentes.

- intra-corrida: averiguaram-se os resultados obtidos no mesmo dia, com 3 soluções diferentes, no mesmo aparelho e pelo mesmo analista.

-inter-corrida: foram analisados os resultados em 3 dias diferentes, com 3 soluções diferentes e realizados por outro analista.

Os testes foram feitos em triplicata. A equação 1 descreve o cálculo do CV%.

$$\text{Equação 1:} \quad \text{CV\%} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

No qual: CV= coeficiente de variação

DP= desvio padrão

CMD= concentração média determinada

4.2.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação, utilizando concentrações conhecidas (baixa, média e alta) 5, 8 e 12µg/mL, em triplicata, e foi aplicada a equação 2 para se apurar a percentagem de recuperação do MTX:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Real}} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

4.2.6. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados pela análise quantitativa de três amostras em triplicata, nas mesmas concentrações escolhidas anteriormente (5, 8 e 12µg/mL), usando-se as equações 3 e 4, respectivamente (ICH, 2005):

$$\text{LD} = (\text{DP} \times 3,3)/\text{IC} \quad (\text{equação 3})$$

$$\text{LQ} = (\text{DP} \times 10)/\text{IC} \quad (\text{equação 4})$$

Nas quais, DP refere-se ao desvio padrão e IC é o valor da inclinação da curva analítica.

4.2.7. Robustez

A robustez foi analisada com relação à variação do comprimento de onda utilizado ($\lambda = 303 \text{ nm}$) na concentração média, 8 µg/mL, alterando-se o comprimento de onda (2nm abaixo do analisado e 2nm acima), ou seja, em 301nm e 305 nm, em triplicata.

A segunda análise foi alterando o equipamento utilizado para leitura e empregando o Espectrofotômetro Shimadzu UV- vis, modelo Uv- 1800, procedendo-se a leitura em 303nm em triplicata.

Com os resultados obtidos calculou-se o teste de T-Student, um teste estatístico aplicado tanto para amostras independentes quanto para amostras emparelhadas, com o objetivo de testar hipóteses sobre médias de uma variável quantitativa.

4.3. Eficiência de incorporação

A partir de uma solução estoque de 500 µg/mL das micropartículas de PLGA contendo MTX 10% e 50%, foram realizadas diluições a fim de se obter uma concentração final de 10 µg/mL em ácido acético glacial.

Foi realizada a análise em espectrofotômetro UV-Vis em triplicata e para o branco foram utilizadas as micropartículas PLGA.

O teor do fármaco incorporado foi calculado utilizando a curva analítica previamente validada e a eficiência de incorporação (EI) foi calculada empregando a equação 5:

$$EI (\%) = \frac{\text{Quantidade de fármaco determinada analiticamente}}{\text{quantidade teórica de fármaco}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.4. Características Morfológicas

4.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), do MTX, das micropartículas de PLGA e das micropartículas de PLGA contendo MTX (10% e 50%), que foram depositadas sobre uma fita de carbono e analisadas utilizando Microscópio eletrônico de varredura JEOL® modelo JSM T330A com aumento de 100 a 15000 vezes dependendo da amostra.

4.4.2. Microscopia de Força Atômica (MFA)

Foi realizada uma segunda análise morfológica por MFA das micropartículas de PLGA e das micropartículas de PLGA contendo MTX (10% e 50%), empregando o equipamento da Bruker-Dimension Icon Scan Asyst do Instituto de Física de São Carlos (USP).

O modo de operação foi o de contato intermitente (tapping mode) à temperatura de 25°C, frequência de oscilação da ponta 300.000 Hz e constante de mola do cantilever de 70N/m.

Para o preparo da amostra foi realizada amostra diluída em água ultra-pura, sendo esta depositada no substrato de mica previamente clivado, conforme a técnica de “Dip” ou gotejamento. A secagem da amostra sobre a mica foi à temperatura ambiente (cerca de 23°C) por 15 minutos.

O ensaio de microscopia foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Roberto Mendonça Faria e com o Prof. Dr. Marcelo de Assunção Pereira da Silva.

4.4.3. Determinação do tamanho das micropartículas por espalhamento de luz e potencial Zeta

A análise foi realizada pela técnica de espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering), diluída 100x das micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX (10% e 50%), submetidas 10 minutos no ultrassom, em triplicata.

A técnica consiste num feixe de laser atravessar a amostra, onde as micropartículas espalham a luz de determinado modo onde se capta um sinal enviado ao correlator e processa os dados, envia ao software, que executa os cálculos de tamanho médio das micropartículas e índice de polidispersidade.

As micropartículas dispersas num líquido adquirem uma carga em sua superfície, que afeta a distribuição de íons de sua vizinhança aumentando a concentração de outros íons junto à superfície, formando uma dupla camada elétrica na interface da partícula, chamada de camada de Stern. O potencial Zeta foi determinado no intuito de identificar as cargas elétricas que se encontram na superfície das micropartículas. Para realização das medidas do potencial Zeta as amostras foram diluídas em tampão fosfato monobásico 0,1M pH 7,4, analisadas em triplicata.

As análises de tamanho de partículas por espalhamento de luz e potencial Zeta foram realizadas no ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments. Foram realizados cálculos de valores médios e desvio padrão.

4.5. Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos a partir do difratômetro Rigaku®, modelo Dmax 2500PC, com velocidade do goniômetro de 0,02/min sob agitação de Cu-K α ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 50° .

A análise de raio X foi realizada para o MTX e micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX (10% e 50%).

4.6. Análise Térmica

4.6.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas na faixa de -90 a 350°C sob atmosfera de N₂ (50mL min⁻¹), com razão de aquecimento de 5°C min⁻¹, no equipamento DSC Q100 – TA Universal.

As amostras foram alocadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, contendo cerca de 2mg de amostra. A célula de DSC foi previamente calibrada utilizando-se como padrão o Índio.

As amostras analisadas foram MTX e micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX (10% e 50%).

4.6.2. Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas TG foram obtidas a partir do equipamento SDT 600 Simultaneous DTA-TG da TA Instruments na faixa de 30° a 600°C, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50mL min⁻¹) e com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹.

As amostras foram alocadas em cadinhos de platina, contendo uma massa de amostra de cerca de 4mg.

As curvas de DTG foram obtidas através da primeira derivada das curvas TG e as amostras analisadas foram MTX e micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX (10% e 50%).

4.7. Espectroscopia na região do infravermelho

Com o objetivo de verificar alguma ocorrência de interação química entre o PLGA e o MTX, foram obtidos os espectros de absorção na região do infravermelho por transformação de Fourier (FTIR) do MTX, das micropartículas de PLGA e micropartículas de PLGA contendo MTX.

Para o ensaio foram preparadas pastilhas contendo cerca de 2mg da amostra e 148 mg de KBr (brometo de potássio), com auxílio de prensa hidráulica, que foram analisadas em espectrofotômetro de infravermelho entre 4000 a 400 cm⁻¹.

4.8. Liberação “*in vitro*” das micropartículas de PLGA+MTX

O ensaio de liberação “*in vitro*” foi realizado com as duas formulações de micropartículas de PLGA contendo MTX 10% / 50% e um controle contendo apenas o MTX.

tubo 1 : MTX;

tubo 2: micropartículas PLGA+MTX 10%;

tubo 3: micropartículas PLGA+MTX 50%;

Foram colocadas 1mg de amostra em cada tubo com 4 mL de tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4 e mantidos em banho a $\pm 37,5^{\circ}\text{C}$. Em períodos de tempo pré-determinados (0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas) os tubos foram centrifugados a 4000rpm por 15 minutos, 4 mL de sobrenadante foram retirados e quantificados por espectrofotometria em 303nm.

Um volume de 4 mL de solução tampão foi adicionada aos tubos para restaurar o volume inicial. A leitura foi feita em triplicata.

A concentração pontual foi calculada de acordo com a equação da reta obtida pela linearidade. A concentração liberada foi calculada pela somatória das concentrações pontuais do tempo atual e dos anteriores:

$$\text{ex: } t_{2h} = [] t_{0h} + [] t_{1h} + [] t_{2h}$$

A percentagem de concentração liberada foi calculada a partir da concentração liberada e do meu 100%, no caso 1mg e aplicada a equação 6:

$$\% \text{ MTX liberada} = \frac{[\text{Ct} \cdot \text{V meio}]}{\text{MF}} \times 100 \quad \text{equação 6}$$

% MTX liberada: percentual de massa de fármaco liberada

Ct: concentração de fármaco determinada no tempo “t”

V meio: volume do tampão utilizado

MF: massa de fármaco usada no experimento

5. Resultados **e** **Discussão**

5.1. Obtenção das micropartículas

5.1. Obtenção das micropartículas de PLGA contendo MTX

O método de spray-drying pode ser utilizado com fármacos muito ou pouco solúveis, também com fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos, produzindo pós ou grânulos (MU; FENG, 2001). No caso, o MTX é um fármaco pouco solúvel em água, etanol e solventes orgânicos (CLARKE; JUNKINS-HOPKINS; SEYKORA, *et. al.*, 2007) e obteve-se micropartículas de PLGA+MTX, que se apresentaram visualmente como um pó amarelo (cor característica do MTX).

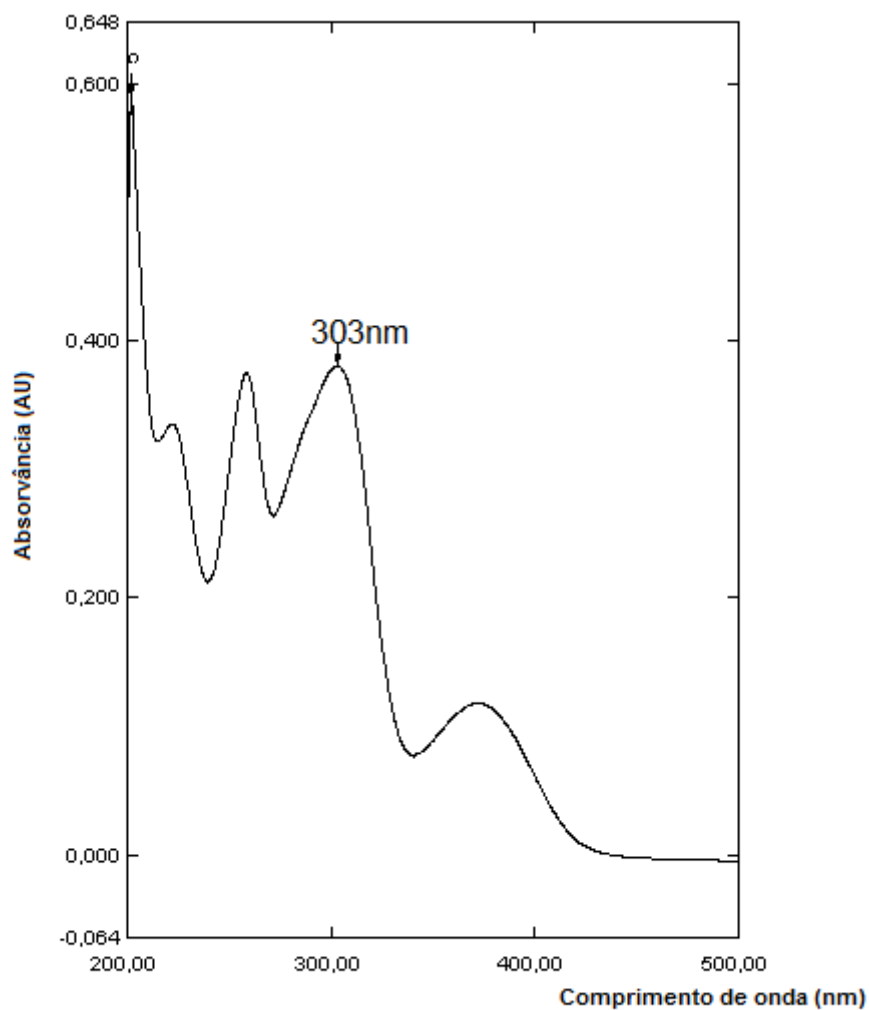
5.2. Validação do método analítico

O objetivo de validar um método analítico é garantir a segurança e a reprodutibilidade da técnica, no qual o valor de amostragem está próximo ao valor verdadeiro (padrão) e para isso devem ser realizados distintos testes, como precisão, exatidão, especificidade, robustez, limites de quantificação e detecção (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

5.2.1. Seleção do comprimento de onda representante do MTX por espectrofotometria UV-Visível

A Figura 7 mostra o espectro de absorção do MTX entre 200 e 600nm, com dois picos de máxima absorção nos comprimentos de onda 303 e 256,5nm.

Figura 7: Espectro de absorção do MTX em UV-Vis, concentração de 5µg/mL, tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4.



Os picos de comprimentos de onda baixos geralmente sofrem interferências, assim como os mais altos e não convém que sejam selecionados, portanto o comprimento de onda de máxima absorção mais adequado para ser utilizado na análise quantitativa do MTX foi o de 303nm.

5.2.2. Curva de Ringbom e Linearidade

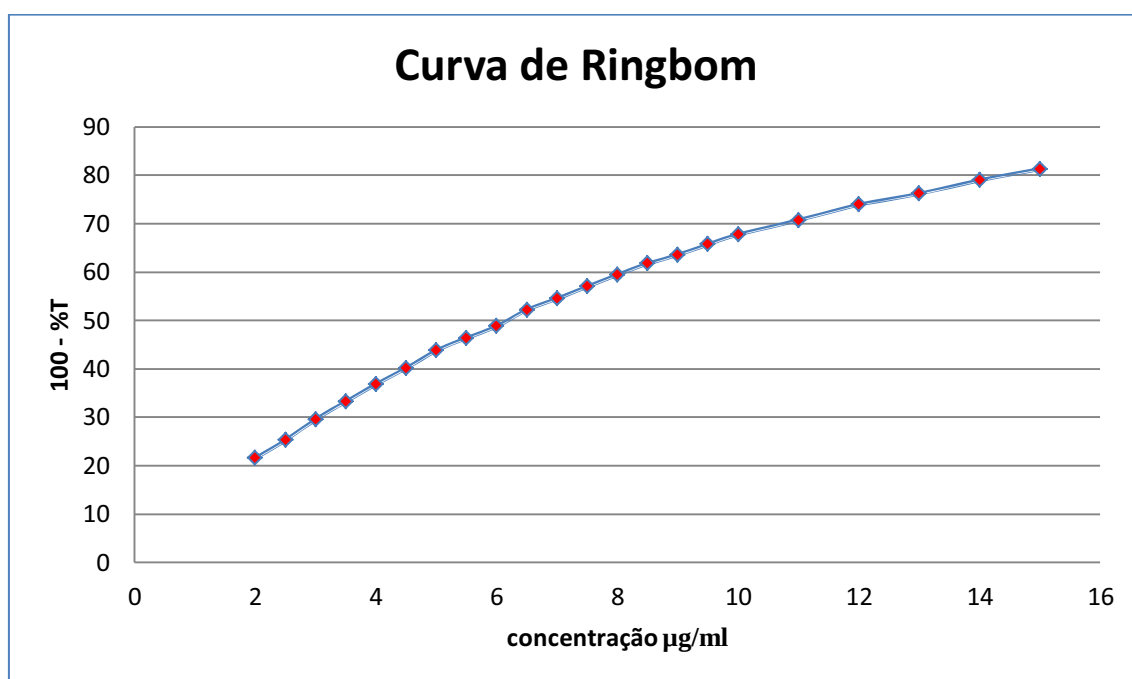
A curva de Ringbom determinou a faixa linear, e de acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 2 a 15 $\mu\text{g/mL}$ em 22 pontos, mostrados na Tabela 1. A curva de Ringbom foi expressa com os valores de transmitância e de concentração em $\mu\text{g/mL}$ *versus* absorvância ($100-T\%$), como representada na figura 8.

Tabela 1. Obtenção da curva de Ringbom do método espectrofotométrico UV-Vis para análise do MTX a 303 nm.

Pontos	Concentração de MTX ($\mu\text{g/mL}$)	Média Abs. 303nm
1	2,0	0,1053
2	2,5	0,1263
3	3,0	0,1521
4	3,5	0,1753
5	4,0	0,1994
6	4,5	0,2228
7	5,0	0,2500
8	5,5	0,2706
9	6,0	0,2906
10	6,5	0,3203
11	7,0	0,3422
12	7,5	0,3665
13	8,0	0,3919
14	8,5	0,4175
15	9,0	0,4382
16	9,5	0,4651
17	10,0	0,4914
18	11,0	0,5335

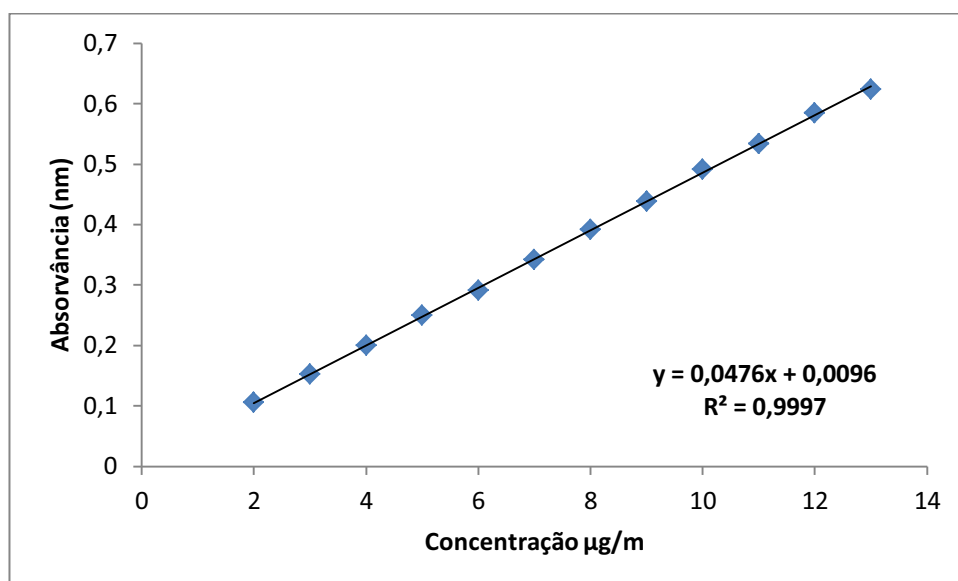
19	12,0	0,5838
20	13,0	0,6232
21	14,0	0,6773
22	15,0	0,7280

Figura 1. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 303nm para solução de MTX em tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4.



A Figura 9 exibe a curva analítica de absorvância em função da concentração de MTX e apresenta equação da reta: $y = 0,0479x + 0,008$ e $r^2=0,9998$.

Figura 9: Curva padrão de soluções de MTX, concentrações entre 2 e 12 µg/mL.

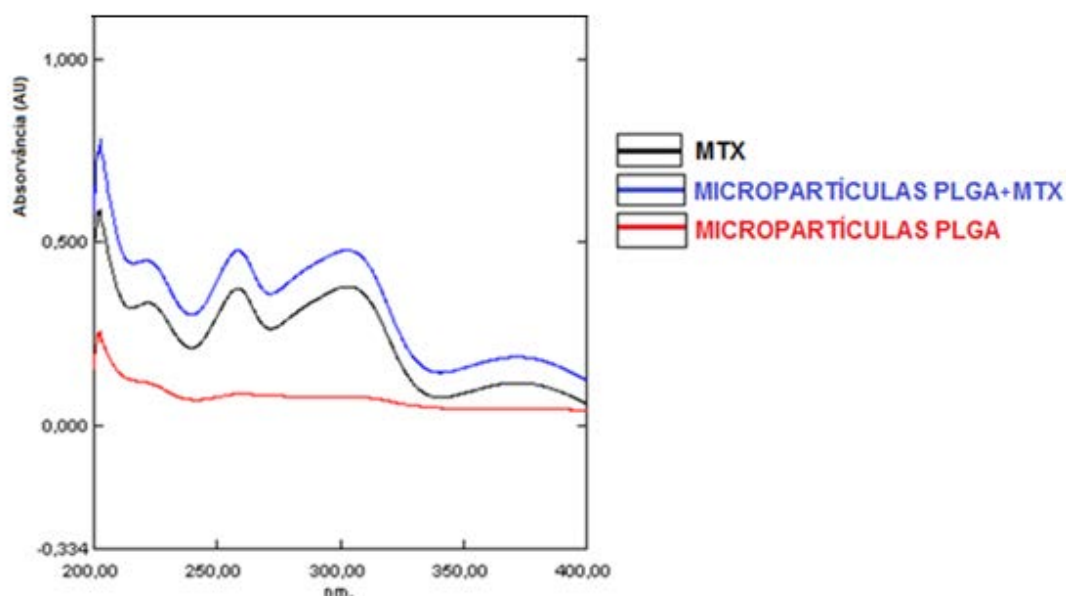


De acordo com a literatura (BRASIL, 2003), o coeficiente de correlação $r^2 = 0,9998$ encontra-se dentro dos limites estabelecidos e podemos concluir que o método é considerado linear dentro da faixa de concentração 2 e 13 µg/mL.

5.2.3. Especificidade

Na Figura 10 pode ser observado o espectro dos componentes utilizados e o pico de absorção máxima em 303nm, previamente selecionado para quantificação do MTX.

Figura 10: Espectro de absorção do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX.



Analisando o espectro, observou-se que as micropartículas de PLGA não apresentaram absorvância em 303nm, não interferindo na absorvância do MTX, deste modo é possível afirmar que o método é específico para o MTX.

5.2.4. Precisão

Os resultados apresentados na Tabela 2 são referentes aos ensaios para análise intra-corrida e na Tabela 3 aos ensaios para análise inter-corrida.

Tabela 2: Resultados obtidos na análise intra-corrida, da solução de metotrexato, por espectrofotometria, $\lambda = 303\text{nm}$.

[MTX] ($\mu\text{g/ml}$)	Média Abs. ($\lambda = 303\text{nm}$)	DP	DPR* (CV%)
5	0,2442	0,0034	1,4
8	0,391	0,0096	2,46
12	0,5832	0,0054	0,93

*Desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual

Tabela 3: Resultados obtidos na análise inter-corrida, da solução de metotrexato por espectrofotometria, $\lambda = 303\text{nm}$.

[MTX] ($\mu\text{g/ml}$)	Média Abs. ($\lambda = 303\text{nm}$)	DP	DPR (CV%)
5	0,2544	0,0013	0,5
8	0,3868	0,0062	1,6
12	0,5894	0,0072	1,23

O método mostrou-se preciso, visto que todas as amostras obtiveram coeficiente de variação abaixo de 5%, de acordo com as normas vigentes (BRASIL, 2003).

5.2.5. Exatidão

A exatidão foi determinada como percentual de recuperação identificado na análise quantitativa em três diferentes concentrações e os resultados obtidos se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos de exatidão do método espectrofotométrico para determinação analítica de micropartículas de PLGA contendo MTX, $\lambda = 303\text{nm}$.

[] teórica MTX ($\mu\text{g/ml}$)	Média Abs ($\lambda = 303\text{nm}$)	Recuperação %
5	4,92	98,40
8	8,04	100,54
12	12,00	100,00

Exatidão expressa proximidade entre o valor real e o resultado analítico obtido. São desejáveis valores próximos a 100%, porém aceitos entre 80-120% (BRASIL, 2003). Os resultados apresentados encontram-se dentro dos limites estabelecidos.

5.2.6. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD é a menor concentração do analito na amostra que consegue ser detectada pelo método adotado. O LQ é a menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão (ICH, 2005).

Os LD e LQ foram calculados, pela análise quantitativa de três amostras utilizando as equações descritas em metodologia.

$$\text{LD} = 0,16022$$

$$\text{LQ} = 0,48551$$

Os LD e LQ são valores de limites inferiores da curva analítica e o LQ pode ser utilizado para calcular a concentração de fármaco presente nas micropartículas formadas.

5.2.7. Robustez

A Tabela 5 apresenta os resultados de robustez obtidos em diferentes comprimentos de onda, 2 abaixo (301nm) e 2 acima (305nm); na Tabela 6 encontram-se os resultados de robustez na leitura $\lambda = 303\text{nm}$ em diferentes espectrofotômetros constatando-se a susceptibilidade do método adotado.

Tabela 5: Resultados obtidos na análise de robustez em diferentes comprimentos de ondas, da solução de MTX, em espectrofotômetro Shimadzu UV- vis Uv-mini 1240.

Soluções MTX	$\lambda = 301 \text{ nm}$	$\lambda = 303 \text{ nm}$	$\lambda = 305 \text{ nm}$
1	0,3948	0,3807	0,4025
2	0,3764	0,4109	0,3824
3	0,396	0,384	0,4053

Tabela 6: Resultados obtidos na análise de robustez em comprimento de onda de 303nm, da solução de metotrexato, em espectrofotômetro Shimadzu UV- vis Uv-1800 e Shimadzu UV- vis Uv-mini 1240.

Soluções MTX	espectrofotômetro 1800	espectrofotômetro 1240
1	0,389	0,381
2	0,383	0,411
3	0,4	0,384

O método mostrou-se robusto, pois não houve variância significativa nas leituras das absorvâncias segundo o teste estatístico (teste T- Student), onde em todos os casos $p < 0,05$.

5.3. Eficiência de incorporação

A partir da curva analítica foi calculado o teor do fármaco incorporado e a eficiência de encapsulação, que estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7: eficiência de incorporação das micropartículas PLGA contendo MTX de 10% e 50% pelo método de spray-drying.

Micropartículas	Teor teórico de MTX (%)	Teor de fármaco incorporado (%) $\pm$ DP	Eficiência de incorporação (%) $\pm$ DP
PLGA 10% MTX	10	8,2 $\pm$ 0,2	82,1 $\pm$ 1,8
PLGA 50% MTX	50	40,1 $\pm$ 1,7	80,3 $\pm$ 3,4

$p=0,0879$ ($<0,5$)

Foi aplicado teste T student e obtido o valor de $p=0,0879$. Por critérios convencionais esta diferença não é considerada significativa entre as formulações, o que sugere interação entre o fármaco e a matriz polimérica quando utilizado o método de obtenção por “spray drying”.

As micropartículas obtiveram uma eficiência de incorporação acima de 80%. Isso indica que o método escolhido para a obtenção das micropartículas é considerado adequado.

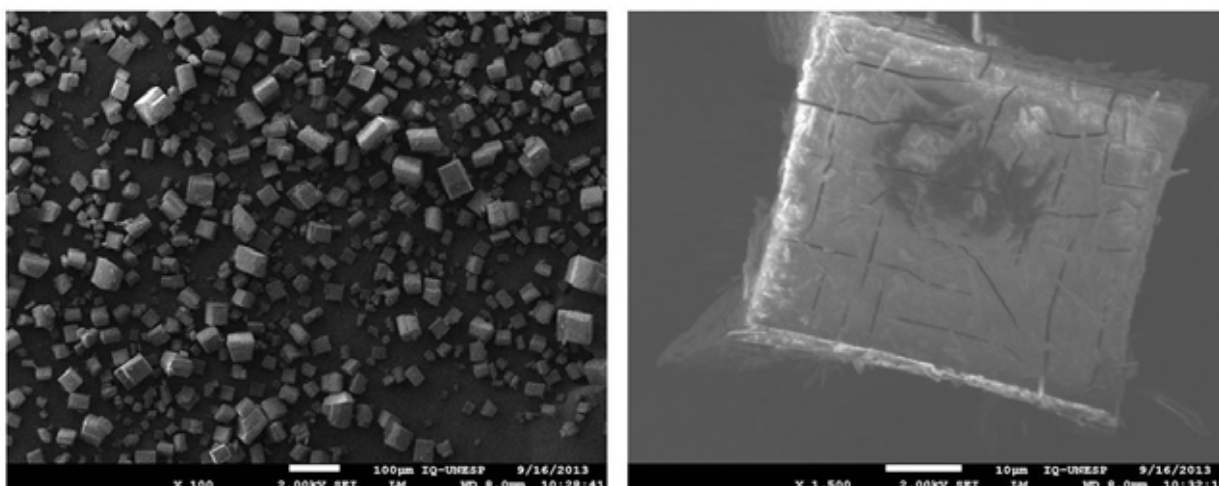
5.4. Características Morfológicas

5.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 11 apresenta fotomicrografias do MTX que revelam partículas isoladas, com forma cúbica, superfície em escamas e cada partícula medindo acima de 10 μ m. Esta forma é dificilmente observada macroscopicamente, visto que o MTX é um pó bem fino e amarelo.

Segundo Chadha e colaboradores (2009) há diferenças em morfologias do MTX segundo as condições ambientais e solventes sob os quais os cristais são desenvolvidos, porém normalmente se apresentam com escamas na forma cristalina.

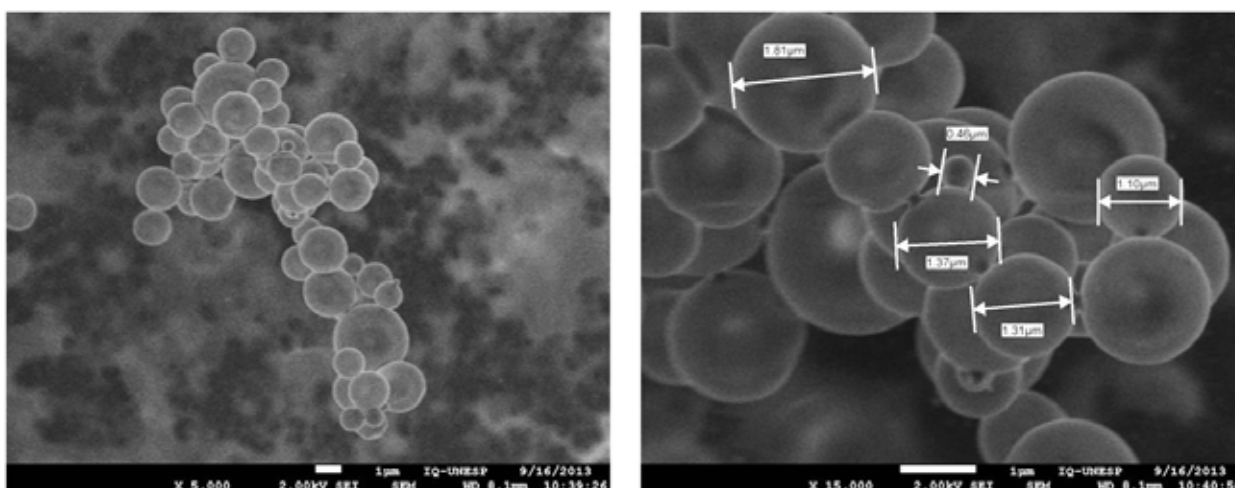
Figura 11: Fotomicrografia do MTX sob aumento de 100x e 1500x.



Nas micropartículas foram utilizadas a técnica de spray-drying, segundo Bilancetti e colaboradores (2010) os parâmetros utilizados no processo influenciam no tamanho, disposição e carga das partículas.

A Figura 12 mostra fotomicrografias das micropartículas de PLGA, onde se visualiza partículas aglomeradas, esféricas, superfície lisa e com variação de diâmetro entre 1 e 2µm.

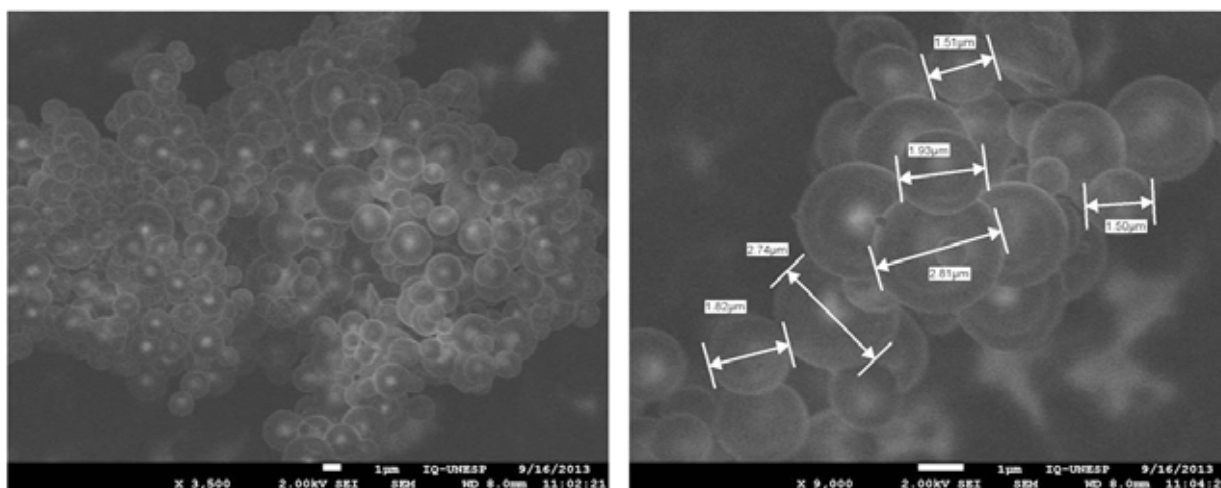
Figura 12: Fotomicrografia das micropartículas de PLGA sob aumento de 5000x e 15000x



As micropartículas contendo 10% de MTX também se apresentaram esféricas, conforme a Figura 13, com diâmetros que variam entre 1,50 e 3µm e agrupadas. Pelo fato destas micropartículas apresentarem-se esféricas, semelhante ao PLGA e diâmetro médio em condições microparticuladas pode-se inferir que o

fármaco está incluso na partícula, pois o mesmo não foi visto em sua superfície, ou disperso, como apresentado na Figura 12, na forma cúbica e com superfície na forma de escamas.

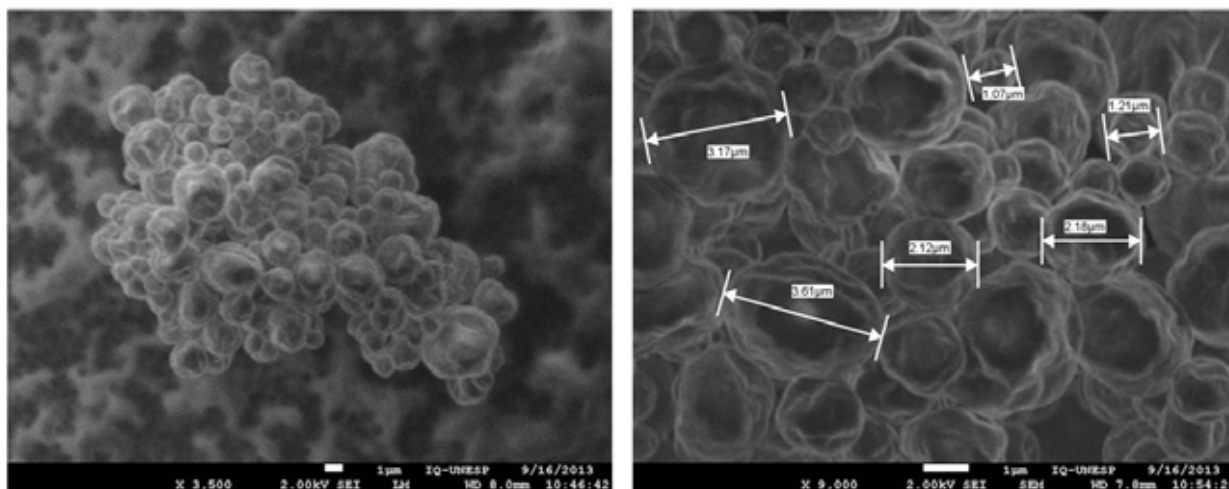
Figura 13: Fotomicrografia das micropartículas de PLGA+MTX 10% sob aumento de 3500x e 9000x.



As micropartículas contendo 50% de MTX se apresentaram aglomeradas, conforme a Figura 14, com diâmetro variando entre 1 e 4µm, porém disformes, sem uma forma definida. Podemos sugerir a presença de fármaco na superfície da partícula, alterando assim seu formato quando comparada a formulação contendo 10% de fármaco.

Estudos realizados por Wischle & Schwendeman (2008), caracterizam o PLGA com uma superfície uniforme e esférica, porém quanto mais fármaco ou sal adicionado à partícula ocorre uma deformação, ou porosidade na mesma, o que poderia esclarecer o que foi observado na formulação contendo 50% de MTX.

Figura 14: Fotomicrografia das micropartículas de PLGA+MTX 50% sob aumento de 3500x e 9000x.

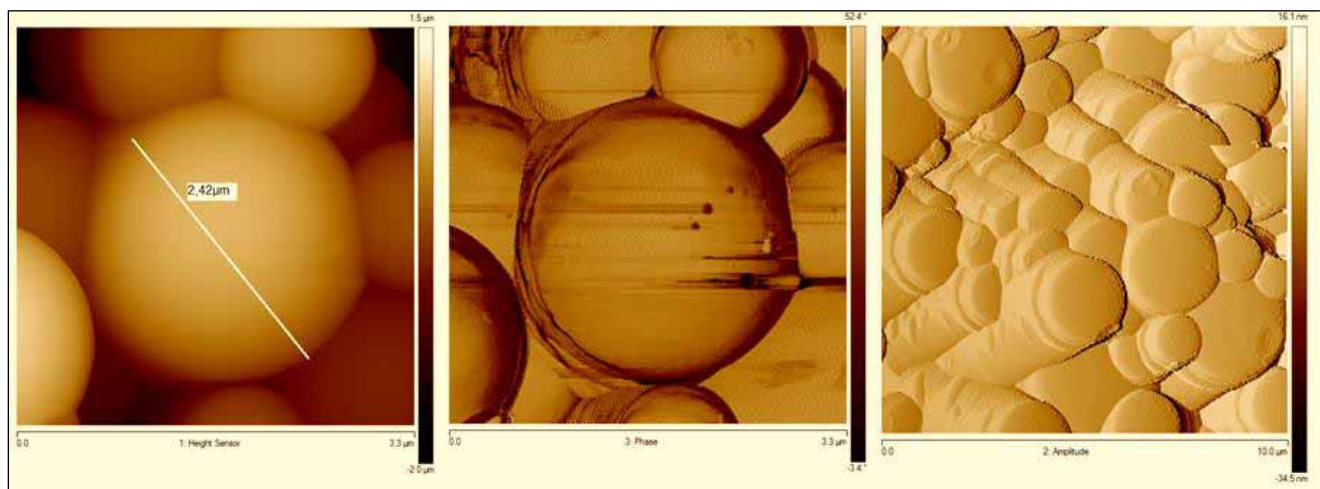


5.4.2. Microscopia de Força Atômica (MFA)

A técnica de MFA é uma técnica sensível e consiste em estudar as características da superfície das amostras, como uniformidade, tamanho, dimensão e forma das partículas. Sua vantagem é fornecer dados em altas resoluções, três dimensões em escala de micrometros até nanômetros (LAL; ARNSDORF, 2010). Com isso a análise de MFA foi realizada a fim de verificar a morfologia das micropartículas. Foram feitas análises das micropartículas de PLGA e de PLGA+MTX (10% e 50%).

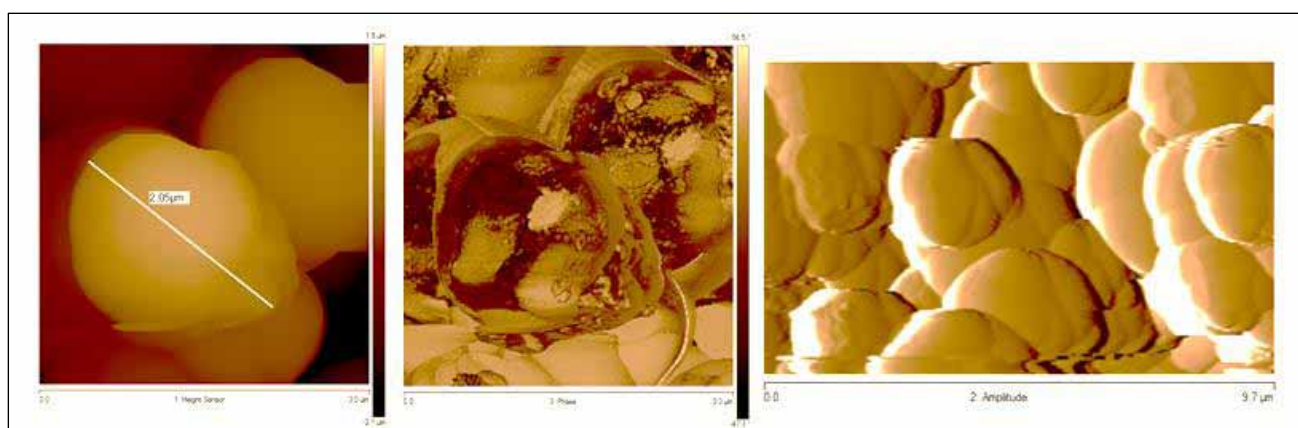
De acordo com as imagens de tamanho, fase e amplitude (Figura15) das micropartículas de PLGA conseguimos verificar sua forma esférica, diversos tamanhos, aglomerados, predominando partículas com tamanho médio de 2,40µm, confirmando o MEV.

Figura 15: Imagem de tamanho, fase e amplitude, respectivamente, de MFA das micropartículas de PLGA em escala de $3,3\mu\text{m}$ e para amplitude de $10\mu\text{m}$.



A Figura 16 mostra as imagens de tamanho, fase e amplitude respectivamente, das micropartículas de PLGA contendo MTX 10%. O tamanho da partícula na imagem é de $2,05\mu\text{m}$, estando novamente de acordo com o MEV, assim como a aglomeração de micropartículas, visto na imagem de amplitude. Na imagem de fase as partes escuras mostram o fármaco incluído na partícula, ou seja, em grande quantidade, a partícula praticamente completa de fármaco.

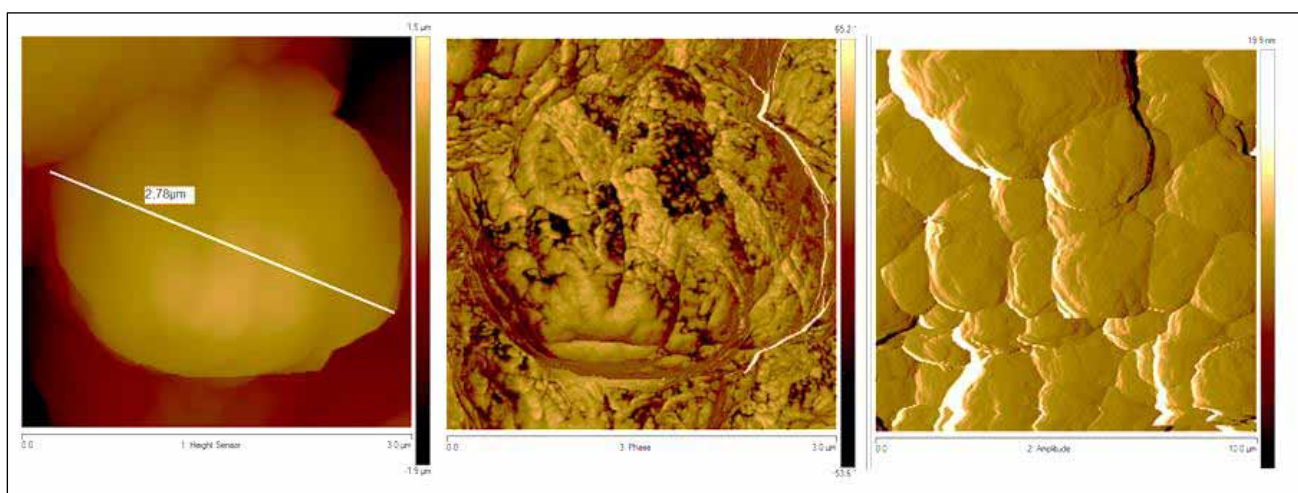
Figura 16: Imagem de tamanho, fase e amplitude, respectivamente, de MFA das micropartículas de PLGA contendo MTX 10% em escala de $3,0\mu\text{m}$ e para amplitude $16\mu\text{m}$.



As micropartículas de PLGA contendo MTX 50% demonstraram deformação na superfície (Figura 17), diâmetro de $2,78\mu\text{m}$, confirmando os resultados de

tamanho e deformação obtidos a MEV, porém na imagem de fase em que o campo mais escuro demonstra o fármaco incluso na partícula é menor comparada às micropartículas de PLGA+MTX 10% e também apresentam muito fármaco na superfície indicando a disformidade observada nas imagens de MFA e do MEV.

Figura 17: Imagem de tamanho, fase e amplitude, respectivamente, de MFA das micropartículas de PLGA contendo MTX 50% em escala de 3,0 μ m e para amplitude 19,9 μ m.



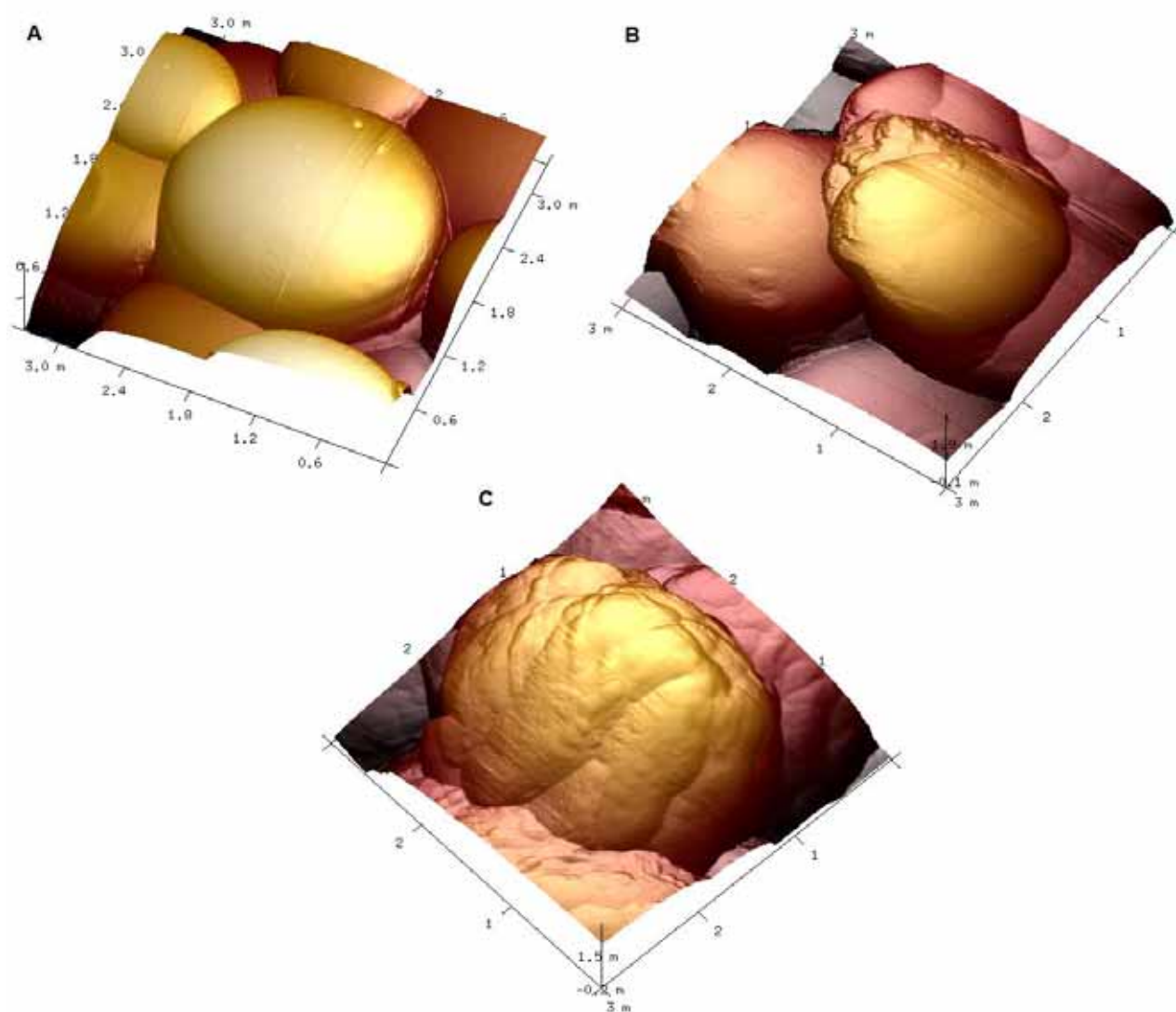
Nas imagens topográficas (Figura 18) foram verificadas as deformações causadas pelo aumento na quantidade do MTX nas micropartículas com PLGA. Na Figura 18A as micropartículas de PLGA possuem uma superfície lisa, sem deformações e esférica. Nas micropartículas de PLGA contendo MTX 10%. Foi possível observar o início de algumas deformações na superfície (Figura 18B) indicando a presença do fármaco, no entanto as estruturas continuam esféricas. Na imagem topográfica das micropartículas de PLGA contendo MTX 50% (figura 18C) nota-se deformações nas partículas, indicando a sobreposição do fármaco na superfície da partícula.

Com a análise de MFA e MEV pode-se sugerir que o MTX interage com a micropartículas de PLGA, pois ocorreu mudança em sua superfície e as micropartículas aumentaram de tamanho.

As características morfológicas das micropartículas são influenciadas pelos parâmetros do spray-dryer, como a temperatura de entrada, pressão do fluxo de ar e

tipo de aspersor (JENSEN; CUN; MALTESEN, *et. al.*, 2010). Por isso é importante que estes parâmetros sejam padronizados na obtenção das micropartículas.

Figura 18: Imagem topográfica de MFA **(A)** micropartículas de PLGA; **(B)** micropartículas de PLGA contendo MTX 10%; **(C)** micropartículas de PLGA contendo MTX 50% em escala de 3,0 μ m.



5.4.3. Determinação do tamanho das micropartículas por espalhamento de luz e potencial Zeta

Materiais particulados em líquido podem adquirir carga elétrica em sua superfície, que pode ocorrer pela dissociação de grupos ionizáveis na superfície da partícula ou adsorção de íons da solução na superfície da partícula. A carga da superfície afeta a distribuição de íons ao redor, aumentando a concentração de outros íons junto à superfície, formando uma dupla camada elétrica na interface da partícula e do líquido. Nesta dupla camada os íons fortemente ligados e a partícula se movem criando um potencial no plano de cisalhamento entre o meio e a unidade chamada potencial Zeta (KIRBY; JUNIOR-HASSELBRINK, 2004).

A tabela 8 apresenta o potencial Zeta e tamanho de partículas do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX (10% e 50%).

Tabela 8: Valores de potencial Zeta e tamanho de partícula do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA+MTX nas concentrações de 10% e 50%.

Amostra	Potencial Zeta (mV) $\pm$ DP*	Tamanho médio de partícula (nm)
MTX	-14,33 $\pm$ 1,01	
Micropartículas PLGA	-23,56 $\pm$ 2,19	1181
Micropartículas PLGA+MTX 10%	-19,83 $\pm$ 1,92	2185
Micropartículas PLGA+MTX 50%	3,47 $\pm$ 1,17	2653

*DP= desvio padrão obtido a partir de três determinações.

Visto que o MTX possui três valores de pKa, sendo eles 3,36; 4,71 referente aos grupos carboxílicos e 5,71, referente as aminas, no pH do meio (7,4) o fármaco encontra-se na forma aniônica e consequentemente com carga negativa.

As micropartículas de PLGA passaram pelo processo de spray-drying, porém os solventes são evaporados e o PLGA possui pKa de 4,4 (BUTTERFIELD, 2008) explicando sua carga negativa no potencial Zeta apresentado.

As micropartículas de PLGA+MTX a 10% segue o mesmo perfil do fármaco e do PLGA, porém a concentração de 50% foi instável e pode se sugerir que o aumento de fármaco nas micropartículas causam alteração significativa do potencial. Com isso o MTX estaria em sua forma catiônica, explicando assim seu potencial Zeta positivo. Neste caso pode-se se sugerir a presença de MTX livre ou a liberação rápida de MTX conforme observado nas microscopias.

Os resultados do tamanho das micropartículas por espalhamento de luz confirmam as microscopias analisadas, possuem cerca de micrômetros e conforme aumenta a concentração do fármaco a micropartícula aumenta de tamanho.

5.5. Difração de Raios X (DRX)

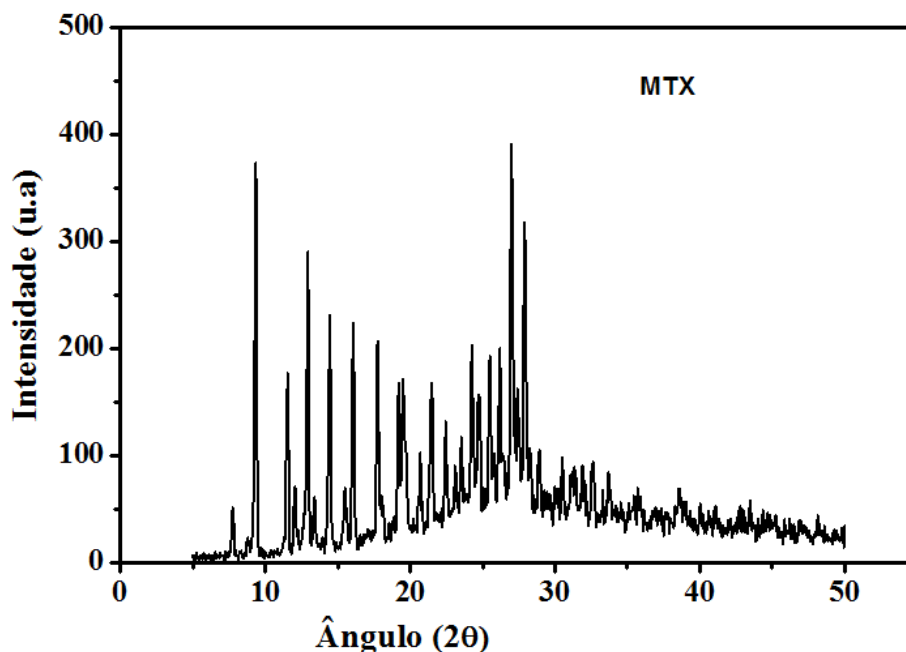
A técnica de difração de raios X caracteriza estruturas, identificando as fases cristalinas, amorfas ou semicristalinas (cristalinas e amorfas). Um feixe de raios X é incidido em um cristal (ângulo θ) e refletido nos átomos ocasionando a difração (RIVERO; RUUD, 2008).

Dong & Boyd (2011) descrevem o uso da difração de raios X no âmbito farmacêutico na especificação de fármacos polimórficos, proteínas e compreender sistemas com polímeros e lipossomas.

O difratograma do MTX (Figura 19) apresentou picos de cristalinidade até cerca de 40° , estando mais intenso na região entre $8^\circ - 30^\circ$ associado ao tipo de estrutura presente no sólido. Conforme a literatura, Sanchez e colaboradores (2007), o MTX é considerado um fármaco que apresenta pseudopolimorfismo, dispondo de diferentes níveis de organização em sua estrutura.

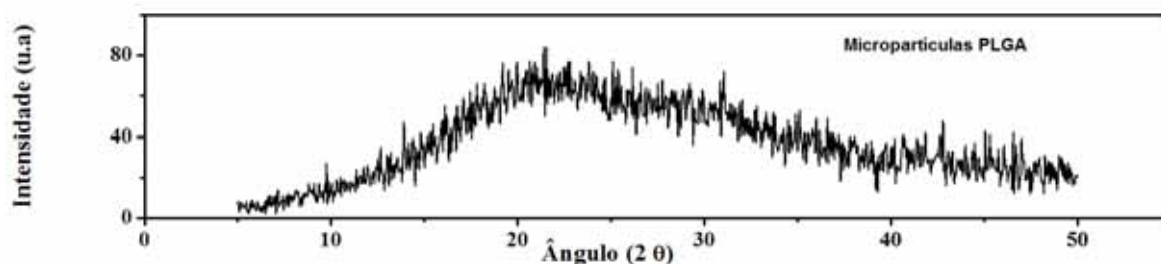
Oliveira e colaboradores (2013) apresentaram difratograma do MTX com características semelhantes ao analisado renomeando-o como trihidratado.

Figura 19: Difratograma de raios X obtido para o MTX em $2\theta = 4^\circ$ e 50° .



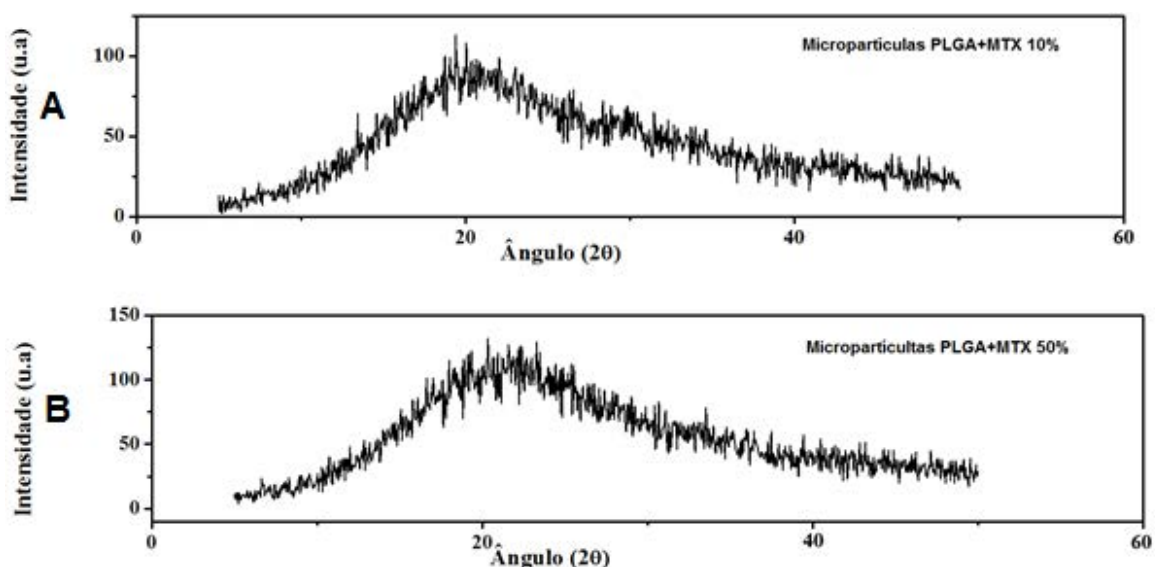
O difratograma das micropartículas PLGA (Figura 20) não apresenta pico característico de fase cristalina, e sim formato de padrão amorfo. Vega e colaboradores (2013) encontraram o mesmo padrão amorfo nos resultados de difração de raios X com PLGA 50:50. Em outro estudo realizado por Nath e colaboradores (2013) também foi observado o padrão amorfo para o PLGA.

Figura 20: Difratoograma de raios X obtido para micropartículas de PLGA em $2\theta = 4^\circ$ e 50° .



Os difratogramas das micropartículas de PLGA contendo MTX 10% e 50% (Figura 21) são bem parecidos com o difratograma das micropartículas de PLGA. Não foi observado nenhum pico característico de fase cristalina. Este fato sugere a distribuição do MTX no interior da matriz polimérica, predominando o estado amorfo (OLIVEIRA; MOLINA; MESQUITA, *et. al.*, 2013).

Figura 21: Difratoograma de raios X obtido para micropartículas de PLGA contendo MTX 10%(A) e 50% (B) em $2\theta = 4^\circ$ e 50° .



5.6. Análise Térmica

5.6.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

O DSC é uma técnica bastante sensível, portanto ele consegue caracterizar misturas com baixo teor de fármaco, misturas físicas, interações com polímeros, fusões e dispersões com relação a sua estabilidade térmica e oxidativa (BIKIARIS; PAPAGEORGIOU; STERGIOU, *et. al.*, 2005).

O PLGA por ser um polímero excessivamente estudado já possui inúmeros trabalhos utilizando a técnica de DSC, como RAWAT & BURGESS (2011), assim como o MTX um fármaco antigo também possui trabalhos utilizando o DSC como o de CHANDAK & VERMA (2008). Portanto, o DSC foi utilizado para obter resultados seguros sobre a mistura PLGA/MTX.

A curva de DSC das micropartículas de PLGA (Figura 22) apresenta um evento térmico com pico em 45,78°C e $\Delta H=3,798\text{J/g}$ correspondente à transição vítrea do polímero. Gaignaux e colaboradores (2012) estudaram micropartículas de PLGA com clonidina e em todas as curvas de DSC observou-se o pico de transição vítrea do PLGA em cerca de 50°C.

O PLGA apresentou-se como material amorfo na difração de raios-X e substâncias amorfas caracterizam-se por apresentarem no DSC um pico de transição vítrea, confirmando sua natureza não cristalina (BATES; ZOGRIFI; ENGERS, *et. al.*, 2006).

Segundo SILVA-JUNIOR e colaboradores (2008), próximo de 320°C ocorre degradação endotérmica do PLGA, que não ocorre na curva de DSC, pois a mesma vai até 250°C, mas pôde ser confirmado nas curvas de TG/DTG (Figura 23), com temperatura de pico em 350,11°C e perda de massa de 89%.

Figura 22: Curva de DSC das micropartículas de PLGA.

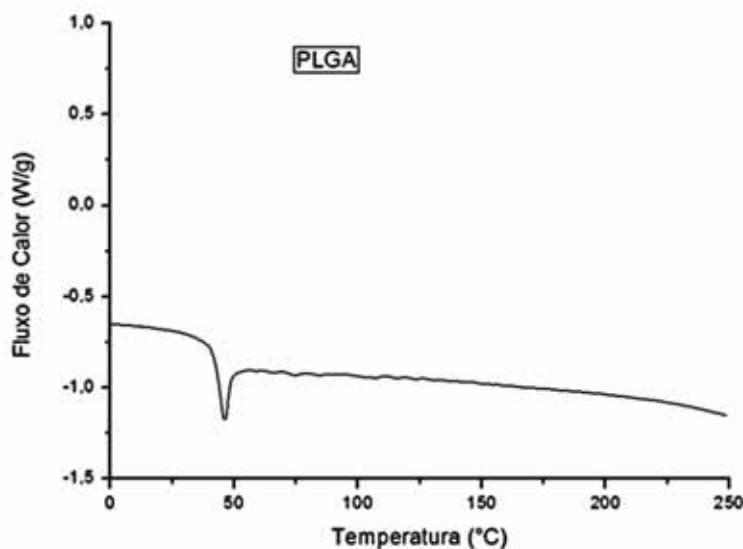
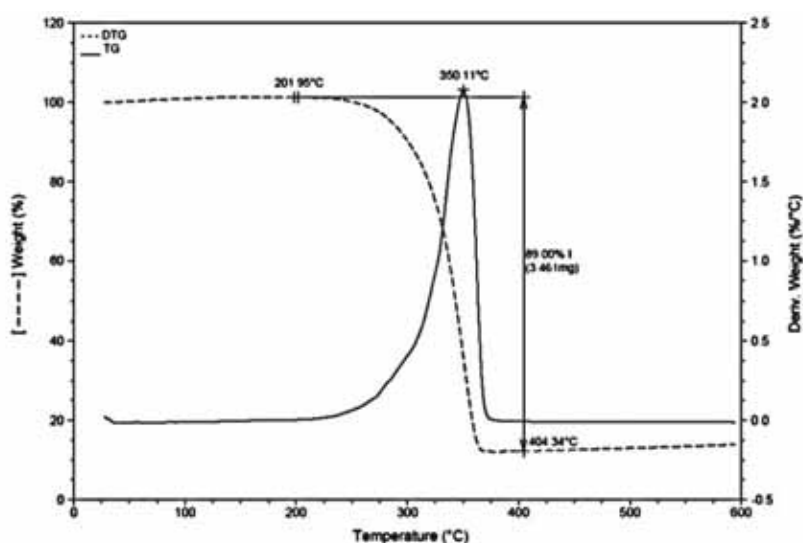


Figura 23: Curvas de TG/DTG das micropartículas de PLGA.



A Figura 24 ilustra a curva de DSC do MTX com apenas um evento endotérmico com pico em 155,89°C e $\Delta H=107,3\text{J/g}$, que segundo a literatura (DE OLIVEIRA; MOLINA; MESQUITA, et. al., 2013) é característico por perda de água de cristalização, que foi comprovada com a TG/DTG (Figura 25), com perda de massa de 8,204%. Logo após é possível observar um segundo evento na curva de TG/DTG com perda de massa de 28,61% e pico em 258,12°C correspondentes ao ponto de fusão da forma cristalina do fármaco e logo em seguida em 285,72°C começa sua decomposição com uma perda de massa de 8% e termina em 340°C.

Sua forma cristalina analisada na difração de raios X é comprovada no DSC, pois substâncias cristalinas apresentam ponto de fusão na análise de DSC (BATES; ZOGRAFI; ENGERS, *et. al.*, 2006).

Figura 24: Curva de DSC do MTX.

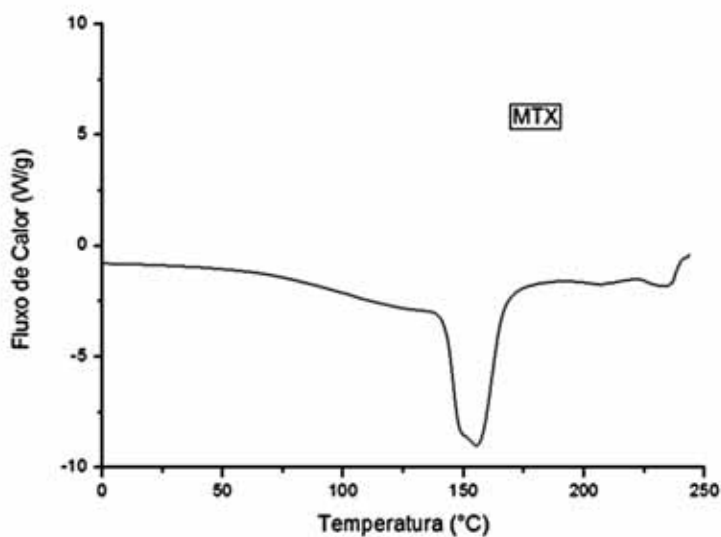
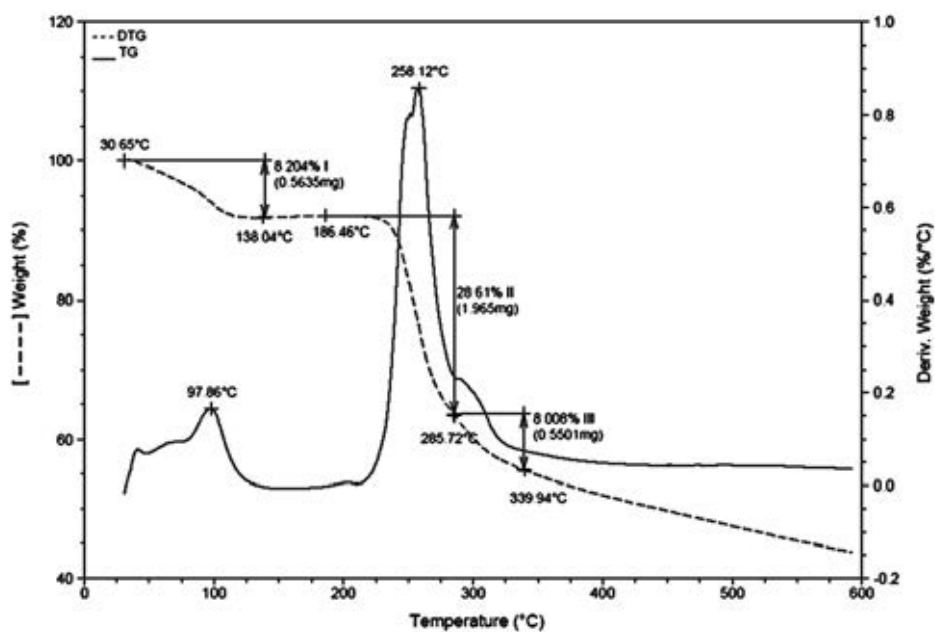


Figura 25: Curvas de TG/DTG do MTX.



As micropartículas de PLGA contendo MTX 10% apresentaram a transição vítrea do PLGA na curva de DSC (Figura 26) com temperatura de pico 46,71°C e $\Delta H = 1,762\text{J/g}$, caracterizando sua forma amorfa encontrada na difração de raios X. O segundo evento pôde ser observado nas curvas de TG/DTG (Figura 27), decomposição térmica do material com temperatura de pico de 359,80°C e perda de massa de 86,46%.

Figura 26: Curva de DSC das micropartículas de PLGA+MTX 10%.

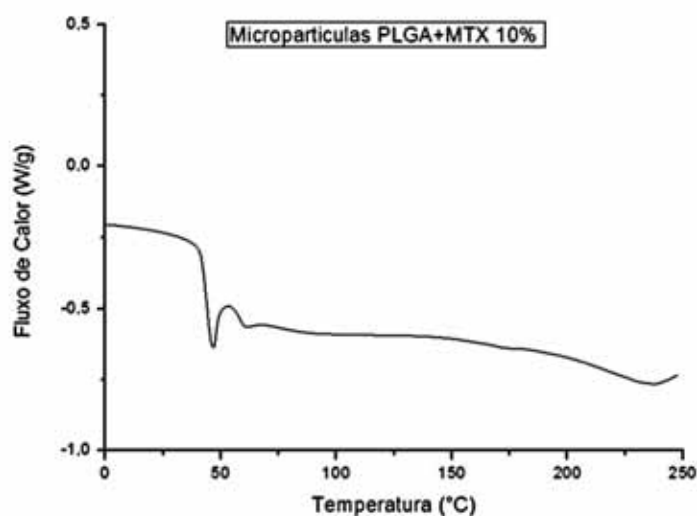
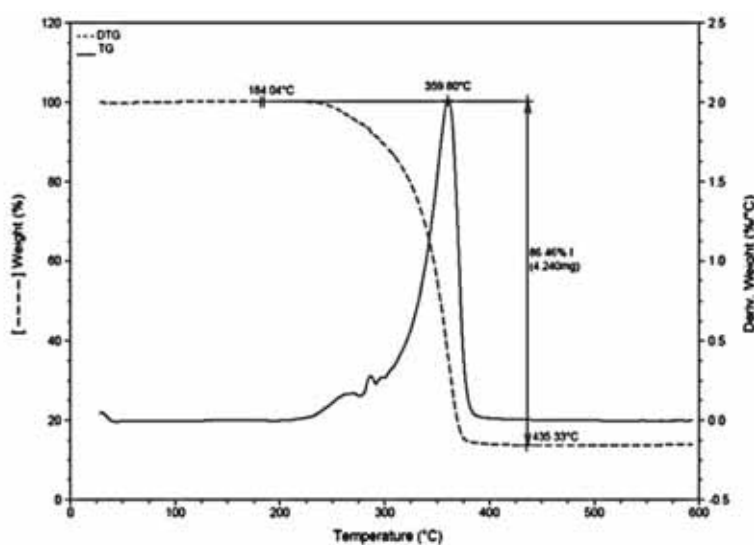


Figura 27: Curvas de TG/DTG das micropartículas de PLGA+MTX 10%.



A figura 28 representa a curva de DSC das micropartículas de PGLA contendo MTX 50%, na qual foram observados dois eventos endotérmicos, o

primeiro com pico em 74,91°C e $\Delta H=7,299\text{J/g}$ característico da perda de água, provavelmente proveniente do MTX, visto que ele possui polimorfismo, confirmando a difração de raios X. O outro pico em 239,05°C e $\Delta H=4,473\text{J/g}$ que pôde ser confirmado nas curvas de TG/DTG (Figura 29) que representa o ponto de fusão da forma cristalina do MTX, com pico em 254,25°C e perda de massa de 20%. Pelo fato das micropartículas de PLGA contendo MTX 50% apresentarem essas características térmicas do MTX sugere-se que possui fármaco livre, na superfície ou em excesso, pois as características do MTX estão muito presentes comparadas às curvas de DSC e TG/DTG das micropartículas de PLGA+MTX 10%. A possibilidade de fármaco livre corroboram com os resultados obtidos nas microscopias e potencial Zeta.

Figura 28: Curva de DSC das micropartículas de PLGA+MTX 50%.

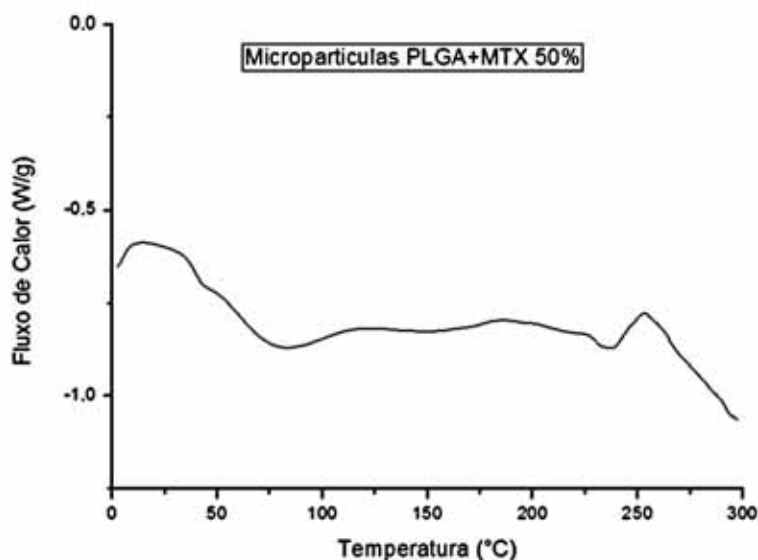
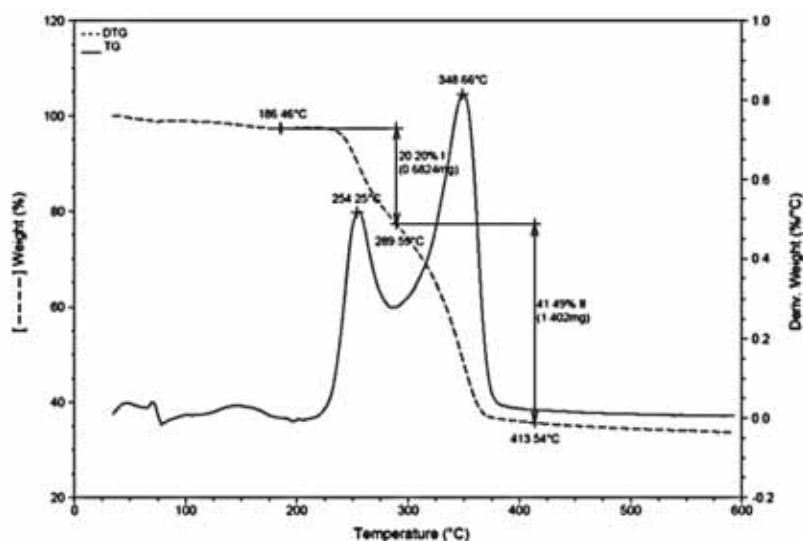


Figura 29: Curvas de TG/DTG das micropartículas de PLGA+MTX 50%.

A curva de TG das micropartículas de PLGA contendo MTX 50% apresentaram um último pico em 348,66°C e perda de massa de 41,49% referente à decomposição térmica do material.

Tabela 9: Resultado TG/DTG do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA contendo MTX 10% e 50% referenciando os eventos e suas respectivas temperaturas (°C) e perdas de massa (%).

Amostras		Tonset ^a (°C)	Perda de Massa (%)	T inicial ^b (°C)	T final ^c (°C)
micropartículas PLGA		361,67	89	201,95	404,34
MTX	1º	109,58	8,204	30,65	138,04
	2º	240,1	28,61	186,46	285,72
	3º	308,48	8,008	285,72	339,94
micropartículas PLGA+MTX 10%		328,58	86,46	184,04	435,33
micropartículas PLGA+MTX 50%	1º	240,33	20,2	186,46	289,59
	2º	363,88	41,49	289,59	413,54

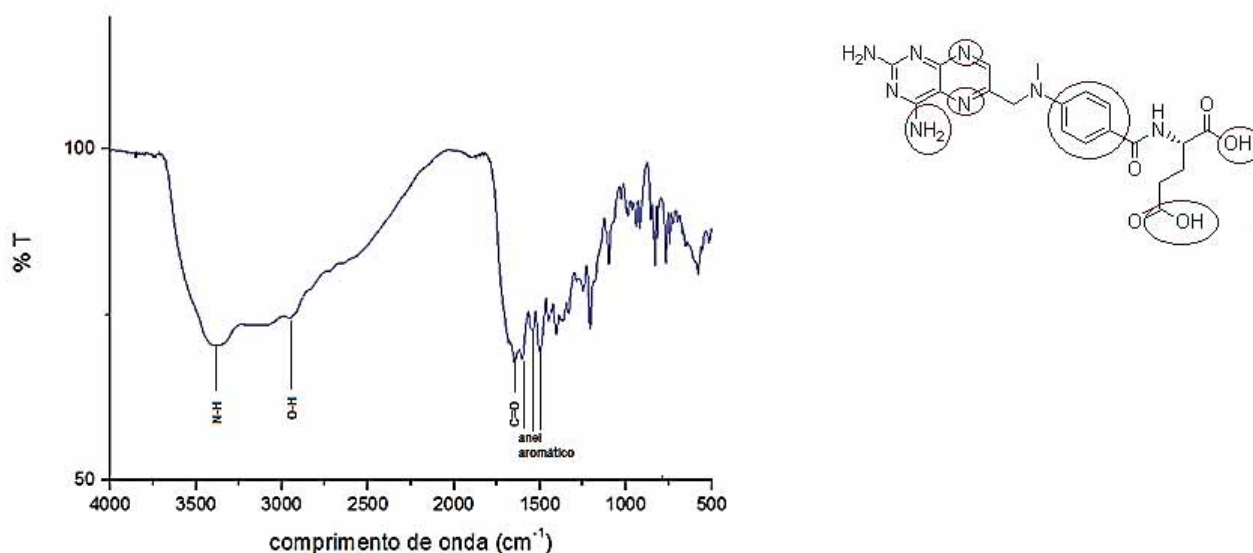
^aTonset = Temperatura onset extrapolada; ^bTinicial = Temperatura inicial; ^cTfinal = Temperatura final

O MTX decompõe-se aproximadamente a 340°C, as micropartículas com PLGA em 404°C e nas micropartículas de PLGA contendo MTX ocorreu o aumento dessa temperatura de degradação nos dois casos indicando uma possível interação entre o polímero e o fármaco. O MTX tem uma pequena perda de massa ao redor dos 109°C que indica perda de água, decorrente do pseudopolimorfismo do MTX, que apresentou forma cristalina primeiramente e após a interação com o polímero se apresentou de forma amorfa nas análises de difração de raios X.

5.7. Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier é um método onde radiações de infravermelho interagem com a matéria. Essa energia é absorvida seletivamente de acordo com sua composição e formam uma impressão digital do composto. Uma de suas vantagens é a utilização de pouco material e método de identificação por excelência (SIVAKUMAR, KHATIWADA, SIVASUBRAMANIAN *et. al.*, 2014).

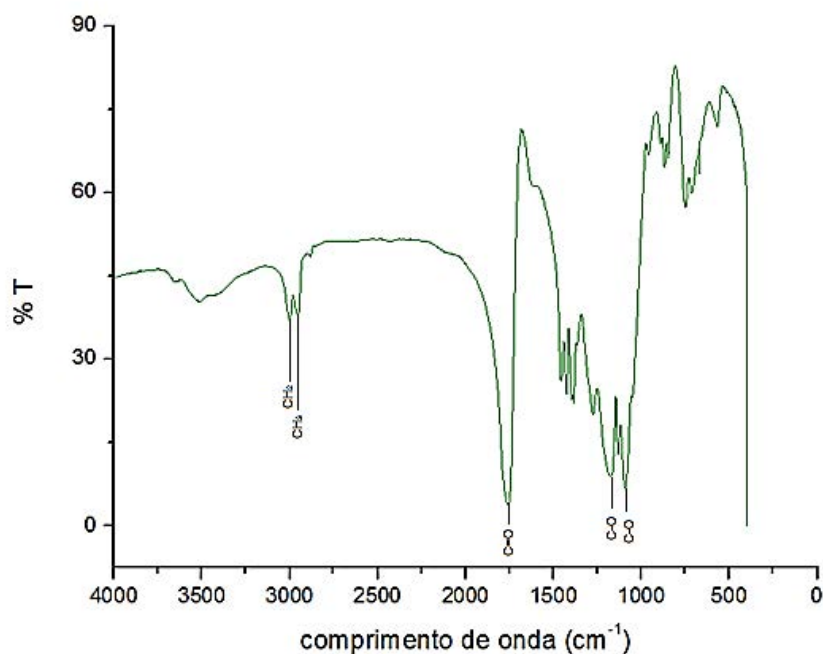
Figura 30: Espectro de infravermelho do MTX e estrutura molecular do MTX.



O espectro de IV do MTX (Figura 30) apresenta as seguintes bandas: uma banda larga de 2700 - 3200 cm^{-1} referentes ao grupamento O-H do ácido carboxílico juntamente com uma banda cerca de 1620 cm^{-1} correspondente ao C=O também caracteriza o ácido presente na molécula. O anel aromático (C=C) caracteriza-se por

três bandas aparentes, cerca de 1600 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} . As aminas possuem picos em cerca de $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, porém neste caso o IV não é a melhor técnica para identificá-la, pois a banda larga característica do ácido pode não deixar o pico da amina distinto (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 1998).

Figura 31: Espectro de infravermelho do PLGA.



A Figura 31 mostra o IV do PLGA onde se observa um pico em 3080 cm^{-1} provenientes do estiramento de carbonos sp^2 , e outro pico em cerca de 2900 cm^{-1} característico dos estiramentos de carbonos sp^3 . Uma banda bem forte em 1750 cm^{-1} , característica do estiramento $\text{C}=\text{O}$ de funções éster e os estiramentos de 1100 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} são provenientes dos estiramentos $\text{C}-\text{O}$.

Figura 32: Espectro de infravermelho de micropartículas contendo 50% MTX.

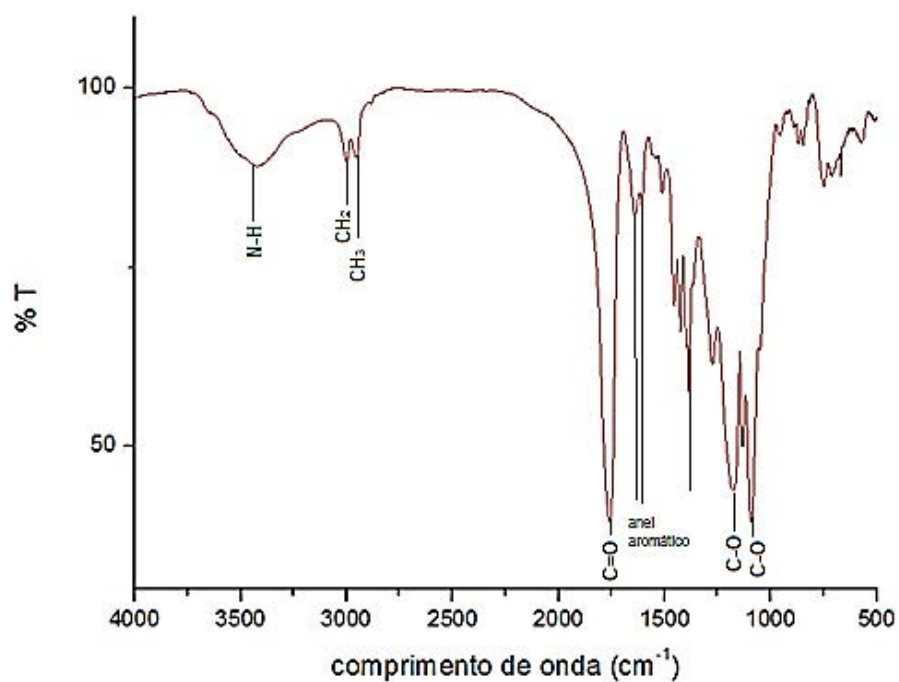
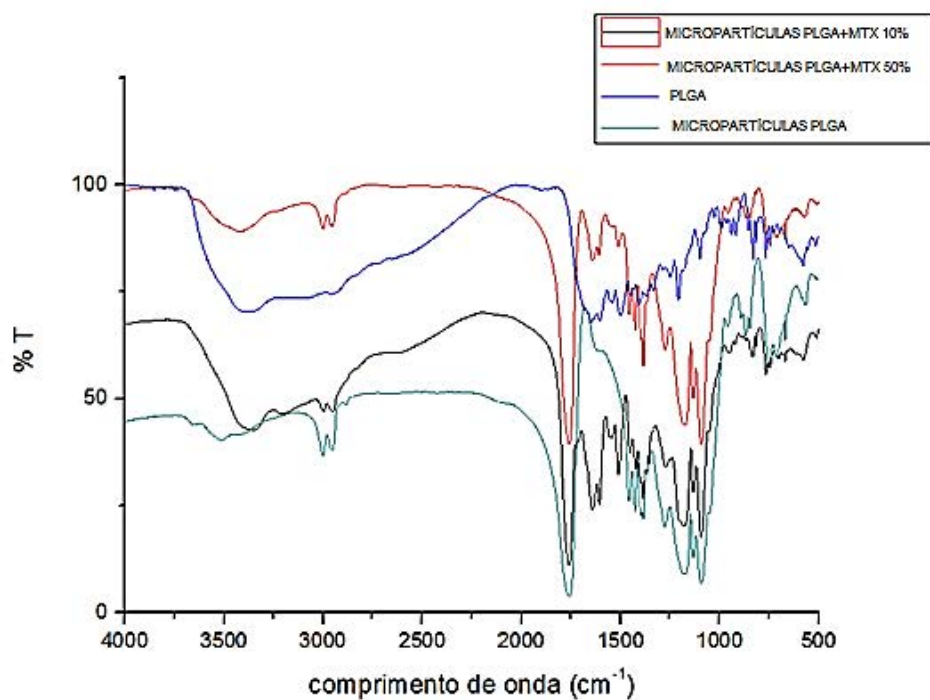


Figura 33: Espectro de infravermelho do MTX e das micropartículas de PLGA e PLGA+MTX 10% e 50%.



No espectro das micropartículas de PLGA contendo MTX (Figura 32) observa-se que as bandas dos grupos funcionais tanto do fármaco quanto do polímero foram mantidas.

Na Figura 33 essa comparação ficou ainda mais clara, onde são mostrados os gráficos sobrepostos. As micropartículas de PLGA contendo MTX mostram os picos característicos de seus constituintes, porém variam de intensidade conforme sua proporção fármaco:polímero. Os gráficos mostram que não houve a formação de nenhum aparecimento de banda, ou seja, nenhum novo grupo funcional, provavelmente por não acontecer nenhuma reação química, somente física. A diminuição da banda bem larga por volta de 3300 cm^{-1} quando se aumenta a quantidade de fármaco confirma a interação entre o fármaco e a matriz polimérica, aminas e os ácidos carboxílicos presentes no MTX com os ésteres do PLGA e as ligações de hidrogênio.

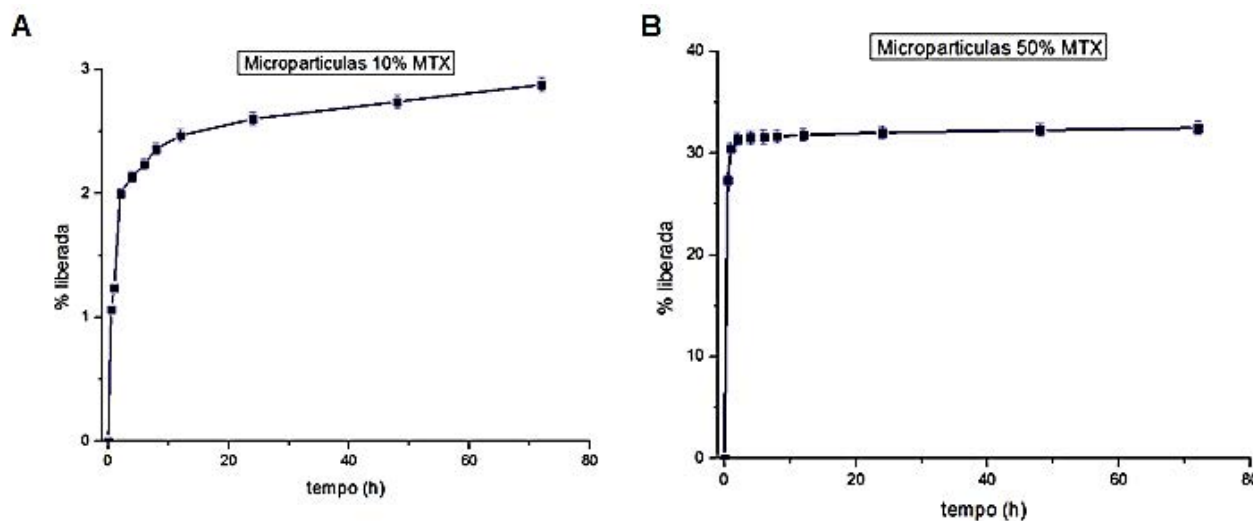
5.8. Liberação “*in vitro*” das micropartículas de PLGA+MTX

Após a identificação das propriedades físico-químicas dos compostos e das micropartículas de PLGA contendo MTX 10% e 50%, compreendendo a estrutura de cada um e sua organização foi possível realizar o estudo de liberação “*in vitro*”.

Para realizar o doseamento da liberação foi utilizada a curva padrão de MTX validada em tampão fosfato monobásico 0,1M pH 7,4.

O fármaco é liberado da partícula através de poros formados na matriz polimérica ou degradação do polímero (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

Figura 34: Perfil de liberação das micropartículas de PLGA contendo MTX 10% e 50% (n=9) em tampão fosfato pH7,4.



A Figura 34B mostra o perfil de liberação das micropartículas PLGA contendo MTX 50%, em que na primeira hora liberou cerca de 30% do fármaco e manteve-se constante durante as 72 horas, sendo que liberou cerca de 32,50% até o fim do experimento, sugerindo ser uma liberação controlada, porém caracteriza-se por um efeito “burst” inicial seguido de liberação lenta, que pode ser comprovado pelas microscopias onde o fármaco encontrou-se depositado na superfície das partículas.

Efeito “burst” designa a liberação do fármaco localizado na superfície das micropartículas ou próximo dela, à medida que a liberação lenta subsequente ocorre pela difusão do fármaco no interior da matriz polimérica sendo liberado ao mesmo tempo em que ocorre a degradação do polímero (SINGH; UDUPA, 1997).

O fármaco na superfície é liberado primeiramente causando o efeito “burst”. A segunda fase de liberação ocorre mais lentamente pelas partículas mais internas, em estados mais organizados na matriz polimérica (HICKEY; KREUTZER; BURGESS, *et. al.*, 2002).

Os perfis de liberação estão de acordo com os estudos de morfologia, que apresentaram partículas disformes para as micropartículas de PLGA contendo MTX 50%, indicando fármaco na superfície, assim como potencial Zeta em que ocorreu acidificação do meio, indicando fármaco livre e também nas análises térmicas, onde prevaleceram características do MTX nas curvas de DSC e TG/DTG. Portanto,

quanto mais fármaco for adicionado à partícula ocorre saturação da mesma, ocorrendo depósito do MTX na superfície, causando efeito “burst”.

As micropartículas PLGA contendo MTX 10% (Figura 34A) liberaram 7% da quantidade de fármaco incorporada decorridas as 72 horas do experimento e continuaram liberando, sugerindo que o MTX está disperso na matriz polimérica e representando um perfil de liberação prolongada.

6. Conclusões

As micropartículas obtidas por “spray-drying” foram bem sucedidas, pois apresentaram eficiência de encapsulação acima de 80% e alto teor de fármaco incorporado.

O perfil de liberação mostrou-se prolongado para as duas formulações, porém as micropartículas contendo 10% de MTX obtiveram sucesso quanto ao previsto, o que pode ser ligado com as microscopias (MEV e MFA), onde apresentaram formas lisas, pouco fármaco na superfície e esféricas. Já as micropartículas com 50% de MTX apresentaram-se disformes, superfície rugosa, indicando o efeito “burst” visualizado no perfil de liberação.

A espectroscopia de IV permitiu a caracterização dos componentes, das micropartículas e provou que não há reação química entre eles, assim como nenhuma alteração na estrutura dos mesmos.

Os resultados obtidos na difração de raios X e na análise térmica mostraram o MTX cristalino e pseudopolimórfico, já nas micropartículas ele se encontra disperso na matriz polimérica em estado amorfo.

A metodologia mostrou-se adequada para quantificação do MTX e a validação da metodologia garantiu as exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

7. Referências Bibliográficas

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

BATES, S.; ZOGRAFI, G.; ENGERS, D.; MORRIS, K.; CROWLEY, K.; NEWMAN, A. Analysis of amorphous and nanocrystalline solids from their x-ray diffraction patterns. **Pharmaceutical Research**, v.23, n.10, 2006.

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

BILANCETTI, L.; PONCELET, D.; LOISEL, C.; MAZZITELLI, S.; NASTRUZZI, C. A statistical approach to optimize the spray drying of starch particles: application to dry powder coating. **APPS PharmSciTech**, v.11,n.3,2010.

BINDA, M.C.; CEJAS, C.; ZUK, C.; GRECO, M.; FUNES, J.; SAUBIDET, G. Melanoma de coroides. **Rev. Argentina Radiol**. v. 69 n. 9, 2005.

BOCHOT, A.; FATTAL, E. Lipossomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. **Journal Controlled Release**. 101, 628 – 634, 2012.

BRASIL. Resolução RE nº 899, “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. 2003.

BUITRAGO, E.; HÖCHT, C.; CHANTADA, G.; FANDIÑO, A.; NAVO, E.; ABRAMSON, D.H.; SCHAIQUEVICH, P.; BRAMUGLIA, G.F. Pharmacokinetic analysis of topotecan after intra-vitreous injection. Implications for retinoblastoma treatment. **Experimental Eye Research**, v.91, p.9-14, 2010.

BUSCHI, M.L.; CARDOSO, M.L.C.; LUCHESI, M.B.; GREMIÃO, M.P.D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray drying technique: preparation and characterization. **Int. J. Pharm.** v. 264, p. 45-55, 2003.

BUTTERFIELD, D.A. An overview of biofunctional membranes for tunable separations, metal-ion capture, and enzyme catalysis based on research from the laboratories of Allan Butterfield and Dibakar Bhattacharyya. **Separation Science and Technology**, v. 43, p 3942-3954, 2008.

CHADHA, R.; ARORA, P.; KAUR, R.; SAINI, A.; SINGLA, M. L.; JAIN, D. S. Characterization of solvatomorphism of methotrexate using thermoanalytical and other techniques. **Acta Pharmaceutics**, vol. 59, n. 3, p. 245 – 247. 2009.

CHAN, L.W.; TAN, L.H.; HENG, P.W.S. Process analytical technology: application to particle sizing in spray drying. **AAPS PharmSciTech**. Vol. 9, nº 1, 2008.

CHANDAK, A.R.; VERMA, R.P.; Design and development of hydroxypropyl methycellulose (HPMC) based polymeric films of methotrexate: physicochemical and pharmacokinetic evaluations. **The Pharmaceuticals Society of Japan** v.7, p. 1057-1066, 2008.

CLARKE, L.E.; JUNKINS-HOPKINS, J.; SEYKORA, J.T.; ADLER, D.J.; ELENITSAS, R. Methotrexate-associated lymphoproliferative disorder in a patient with rheumatoid arthritis presenting in the skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 56, n4, p. 686-690, 2007.

COSTA, L.S. Ocular tumors. **Oncologia ocular. Medicina, Ribeirão Preto**. vol. 30, p. 74-75, 1997.

DE OLIVEIRA, A.R.; MOLINA, E.F.; MESQUITA, P.C.; FONSECA, J.L.C.; ROSSANEZI, G.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; DE OLIVEIRA, A.G.; SIVA-JUNIOR, A.A. Structural and termal properties of spray-dried methotrexate-loaded biodegradable microparticles. **J Therm Anal Calorim** n. 112, p.555-565, 2013.

DING, S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. **PSTT**, v. 1, n. 8, 1998.

DONG, Y.; BOYD,B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v.417, p.101-111, 2011.

FREIBERG, S.; ZHU, X.X.; Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics** v. 282, p. 1-18, 2004.

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

GAIGNAUX, A.; RÉEFF, J.; SIEPMANN, F.; SIEPMANN, J.; DE VRIESE, C.; GOOLE, J.; AMIGHI, K. Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics** v. 437, p. 20-28, 2012.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, A.Á.; A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, vol.26, nº 2, 2007.

HARDWIG, P.W.; PULIDO, J.S.; ERIE, J.C.; BARATZ, K.H.; BUETTNER, H. Intraocular methotrexate in ocular diseases other than primary central nervous system lymphoma. **American Journal of Ophthalmology**. v. 142: 883-885, 2006.

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

HORNOF, M.; TOROPAINEN, E.; URTTI, A. Cell culture models of the ocular barriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.60, p. 207-225, 2005.

HUGHES, G.A. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, n.1, p. 22-30, 2005.

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

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 2005.

JENSEN, D.M.K.; CUN,D.; MALTESEN, M.J.; FROKJAER, S.; NIELSEN, H.M.; FOGED, C. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. **Journal of Controlled Release**, v.142, p. 138-145, 2010.

KIRBY, B.J.; JUNIOR-HASSELBRINK, E.F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v.25, p.187-202, 2004.

KIVELÃ, T.; ESKELIN, S.; PALOHEIMO, M. Intravitreal methotrexate for retinoblastoma. **Ophthalmology**, v.118, n. 8, 2011.

KLOSE, D.; DELPLACE, C.; SIEPMANN, J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. **International Journal of Pharmaceutics** v. 404, p. 74-82, 2011.

KNUDSON JR., A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 68, n. 4, p. 820-823, 1971.

LAL, R.; ARNSDORF, M.F. Multidimensional atomic force microscopy for drug Discovery: A versatile tool for defining targets, designing therapeutics and monitoring their efficacy. **Life Sciences**, v.86, p.545-562, 2010.

LANNES, S.C.S.; MEDEIROS, M.L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por *spray-dryer*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 39, n.1, 2003.

LI, D.; GUO, G.; FAN, R.; LIANG, J.; DENG, X.; LUO, F.; QIAN, Z. PLA/F68/Dexamethasone implants prepared by hot-melt extrusion for controlled release of anti-inflammatory drug to implantable medical devices: I. Preparations, characterization and hydrolytic degradation study. **International Journal of Pharmaceutics**. V:441, 365-372, 2013.

LUO, Q.; ZHAO, J.; ZHANG, X.; PAN, W. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with chitosan oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics** v.403, p.185-191, 2011.

MIDDLETON, J.; TIPTON, A.J. Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices. **Biomaterials**, v. 20, p. 2335-2346, 2000.

MU, L.; FENG, F.F. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol®) loaded poly (latic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid / cholesterol emulsifiers. **Journal of Controlled Released** vol. 76, p. 239-254, 2001

NAGARWAL, R.C.; KANT,S.; SINGH, P.N; MAITI, P.; PANDIT, J.K. Polymeric nanoparticles system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.136, p. 2-13, 2009.

NAGULU, M.; KIRAN, V.U.; REDDY, Y.N.; KRISHNA, D.R. Development and validation of rapid and sensitive HPLC method for the determination of methotrexate in human serum. **Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences**. V.2, p 8-13, 2009.

NAKAUCHI, Y.; TAKASE, H.; SUGITA, S.; MOCHIZUKI,; SHIBATA,S.; ISHWATA,.; SHIBUYA, Y.; YASUHARA,. MIURA, O.; ARAI, A. Concurrent administration of intravenous systemic and intravitreal methotrexate for intraocular lymphoma with central nervous system involvement. **Int. Journal Hematol**. v.92, p. 179-185, 2010.

NATH, S.D.; SON, S.; SADIASA, A.; MIN, Y.K.; LEE, B.T. Preparation and characterization of PLGA microspheres by electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. **International Journal of Pharmaceutics**, v.443, p. 87-94, 2013.

OLIVEIRA, G.A.; SCARPA, V.M.; BUENO, F.H.J.; EVANGELISTA, C.R. Micro e nanocápsulas. Um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 14, p. 37-49, 1992.

OLSEN, E.A.; DURHAM, M.D. The pharmacology of methotrexate. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, n. 2, 1991.

PEREIRA, A.F; COSTA, V.M.; SANTOS, M.C.M; PINTO, F.C.H.; SILVA, G.R. Evaluation of the effects of methotrexate released from polymeric implants in solid Ehrlich tumor. **Biomedicine & Pharmacotherapy** n. 68, p. 365-368, 2014.

RAWAT, A.; BURGESS, D.; Effect of physical ageing on the performance of dexamethasone loaded PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics** v.415, p. 164-168, 2011.

RIVERO, I.V.; RUUD, C.O.; Determination of the accuracy of phase analysis measurements on spherical surfaces through X-ray diffraction. **NDT&E International**, v.41, p.434-440, 2008.

RUBINO, F.M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B**, n. 764, p. 217-254, 2001.

SANCHEZ, G. E.; JUNG, C. H.; YÉPEZ, M. L.; HERMANDEZ-ABAD, V. Relevancia del polimorfismo em El área farmacêutica. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, vol. 38, n. 2, p. 57 – 76. 2007.

SANDERS, N.N.; PEETERS, L.; LENTACKER, I.; DEEMESTER, J.; DE SMEDT, S.C. Wanted and unwanted properties of surface PEGylated nucleic acid nanoparticles in ocular gene transfer. **Journal of Controlled Release** v. 122, p. 226-235, 2007.

SANTOS Jr., A. R ; WADA, M. L. F. Synthesis, Characterization and in Vitro Degradation of Poly (DLLactode)/Poly(DL-coGlycolide). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. vol. 17, nº 4, pp. 308 – 317, 2007.

SCHULMAN, J.A.; PEYMAN, G.A. Intracameral, intravitreal, and retinal drug delivery. **Ophthalmic drug delivery systems**. New York: Marcel Dekker, p. 383- 425, 1993.

SINGH, U. V.; UDUPA, N. In vitro characterization of methotrexate loaded poly (lactic – co- glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma -180 mice bearing tumor. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, vol,72, p.165–173. 1997.

SILVA-JÚNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; PESTANA, K.C.; MERCURI, L.P.; de MATOS, J.R.; OLIVEIRA, A.G. Thermal analysis on biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. **Termochimica Acta**, 467: 91-98, 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998.

SIVAKUMAR, S.; KHATIWADA, C.P.; SIVASUBRAMANIAN, J.; RAJA, B. FTIR study of protective action of deferoxamine and deferiprone on the kidney tissues of aluminum loaded mice. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 118: 488-497, 2014.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, vol. 7, n. 2, p. 12 – 20. 2006.

TAYLOR, S.R.J.; HABOT-WILNER, Z.; PACHECO, P.; LIGHTMAN, S.L. Intraocular Methotrexate in the Treatment of Uveitis and Uveitic Cystoid Macular Edema. **Ophtalmology**. V. 116: 797-801, 2009.

THRIMAWITHANA, T.R.; YOUNG, S.; BUNT, C.R.; GREE, C.; ALANY, R.G. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today** v.16, n.5/6, 2011.

UHRICH, K.E. Polymeric Systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*, v.99, n11, p.3181-3198, 1999.

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

VASILE, B.S.; OPREA, O.; VOICU, G.; FICAI, A.; ANDRONESCU, E.; TEODORESCU, A.; HOLBAN, A. Synthesis and characterization of a novel controlled release zinc oxide/gentamicin-chitosan composite with potential applications in wound care. **International Journal of Pharmaceutics**, 2013.

VEGA, E.; EGEA, M.A.; GARDUÑO-RAMÍREZ, M.L.; GARCÍA, M.L.; SANCHÉZ, E.; ESPINA, M.; CALPENA, A.C. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: Role of hydroxy- β -cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.110, p.339-346, 2013.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S.P.; Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics** v.354, p.298-327, 2008.

ZIMMER, A.; KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.16, p. 61-73, 1995.