



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

CIPROFLOXACINO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM
ÁCIDO POLI LÁCTICO CO-GLICÓLICO OU VEICULADOS EM GEL DE
COPOLÍMERO DE BLOCO ‘PLURONIC® F127’

LUANA CARDOSO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2006



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

CIPROFLOXACINO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM
ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO OU VEICULADOS EM GEL DE
COPOLÍMERO DE BLOCO ‘PLURONIC® F-127’

LUANA CARDOSO DE OLIVEIRA

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 a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

ARARAQUARA – SP

2006

Ficha Catalográfica

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

O48c Oliveira, Luana Cardoso de
Ciprofloxacino encapsulado em lipossomas revestidos com ácido poli
lático co-glicólico ou veiculado em gel de copolímero de bloco ‘Pluronic F-
127®’ / Luana Cardoso de Oliveira. – Araraquara, 2006.
130 f.

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

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

1.Lipossoma. 2.Ciprofloxacino. 3.PLGA. 4.Pluronic . I.Oliveira,
Anselmo Gomes de , orient. .II. Título.

CDD: 615.4

CAPES:40300005

A vida

É o amor existencial

Razão

É o amor que pondera

Estudo

É o amor que analisa

Ciência

É o amor que investiga

Filosofia

É o amor que pensa

Religião

É o amor que busca Deus

Verdade

É o amor que se eterniza

Ideal

É o amor que se eleva

Fé

É o amor que transcende

Esperança

É o amor que sonha

Caridade

É o amor que auxilia

Fraternidade

É o amor que expande

Sacrifício

É o amor que se esforça

Renúncia

É o amor que se depura

Simpatia

É o amor que sorri

Trabalho

É o amor que constrói

Francisco Cândido Xavier

Aos meus pais, Manoel e
Delvair, à minha irmã Cássia e
ao meu noivo Mateus, por todo
amor e incentivo dedicados a
minha formação.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho gostaria de agradecer às pessoas que contribuíram de diferentes formas para a sua realização.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, meu orientador, pela confiança, incentivo e apoio durante os anos em que tive o privilégio de trabalhar sob sua orientação.

A todos os Professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos da UNESP que muito contribuíram para minha formação, em especial aos Profs. Drs. Raul César Evangelista e Luis Vítor Silva do Sacramento e às Profas. Dras. Maria Palmira Daflon Gremião, Ana Dóris de Castro e Maria Virgínia Scarpa pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Raul César Evangelista pela orientação no estágio de docência que realizei na disciplina de farmacotécnica.

Ao Prof. Dr. Celso V. Santilli e à Profa. Dra. Leila A. Chiavacci do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP pela colaboração nas análises de espalhamento de luz.

À Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinin Machado pelo auxílio nas análises estatísticas e de cromatografia líquida.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes pelo auxílio nas análises estatísticas.

Às funcionárias da Seção de Pós Graduação, Cláudia, Laura e Sônia pelo auxílio e atenção em todos os momentos.

Agradecimentos

À Queila Simone Baraldo Leme, secretária do Departamento de Fármacos e Medicamentos pela alegria com que preencheu nossos dias.

À todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, especialmente Moacir, Irani, Lucas e Max pelo atendimento atencioso e seriedade com que desempenham seu trabalho.

À Margareth Modolo, Maria de Fátima Rodrigues Lopes, Osmar Redondo e Sandra M. S. da Vinha Lourenzo, técnicos do Departamento de Fármacos e Medicamentos que me ajudaram em vários momentos com seu profissionalismo e amizade.

Aos médicos e farmacêuticos do grupo de Pesquisa em Oftalmologia (Brazilian Ocular Pharmacology and Pharmaceutical Technology Research Group – BOOP): Acácio Alves de Souza Lima Filho, José Augusto Cardillo e especialmente Fernando Paganelli por toda a colaboração.

À Vagner Ferrari pelo imenso auxílio no ensaio biológico.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus amigos com quem tive a feliz oportunidade de conviver durante este período e de quem guardarei as melhores recordações: Andréa, Arnóbio, Beatriz, Cinara, Cristina, Danielle, Daniela, Fabrício, Gisele, Gustavo, Helen, Karen, Kelly, Ketylin, Mara, Maria Carolina, Nelson, Priscila, Priscileila, Rubiana, Thalita, Thiago, Traudi.

Às minhas queridas amigas Mariana, Elaine, Ursula, Anny e Aline que, apesar da distância, muito me apoiaram na realização deste sonho.

À minha estagiária Marcelle pela amizade e colaboração.

Agradecimentos

Às minhas 'crianças' do Centro Espírita Humildade e Amor pela feliz convivência e aprendizado constante.

Aos meus avós, que mesmo sem entenderem o meu trabalho, sempre me incentivaram e oraram por mim.

Ao meu noivo Mateus pelo amor, paciência e carinho dedicados em mais esta etapa de nossas vidas.

Aos meus pais Manoel e Delvair, pelo amor e respeito que nos une.

À minha querida irmã Cássia a quem sempre admirei como ser humano extraordinário e em quem procurei me espelhar.

À Deus, por tudo e por mais esta oportunidade,

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	4
OBJETIVOS	25
MATERIAL	26
1- VIDRARIAS E ACESSÓRIOS.....	26
2- EQUIPAMENTOS.....	27
3- MATÉRIAS PRIMAS, SOLVENTES E REAGENTES.....	28
4- ANIMAIS.....	28
MÉTODOS	29
1- PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	29
1.1- Obtenção das vesículas unilamelares.....	29
1.2- Preparação de lipossomas contendo CIPRO.....	29
1.3- Preparação de lipossomas contendo PLGA.....	30
1.4- Preparação de lipossomas contendo CIPRO e PLGA.....	30
1.5- Preparação de lipossomas contendo PLU.....	31
1.6- Preparação de lipossomas contendo CIPRO e PLU.....	31
2- METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DO CIPRO.....	31
2.1- Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.....	31
2.2- Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO em metanol.....	31
2.3- Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do cipro em lipossomas contendo PLGA.....	32
2.4- Curva analítica do CIPRO.....	32
3- ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DAS PREPARAÇÕES LIPOSSOMAS.....	33

4- CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	33
4.1- Determinação da eficiência de encapsulação.....	33
4.1.1- Separação do fármaco não encapsulado.....	33
4.1.2- Cálculo da eficiência de encapsulação.....	34
4.2- Determinação do diâmetro médio dos lipossomas.....	35
4.2.1- Preparação das amostras.....	36
4.2.2- Índice de refração.....	36
5- ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO.....	37
6- ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VIVO</i>	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

RESUMO

Administração subconjuntival tem sido utilizada para tratamento de patologias que acometem os segmentos anterior e posterior dos olhos. Entretanto, há dificuldade de se manter níveis terapêuticos adequados de fármacos devido aos mecanismos fisiológicos que os removem. Este tipo de administração possui algumas desvantagens, entre as quais o desconforto e o risco de lesões causadas pela frequência das injeções. A administração sistêmica requer doses elevadas para proporcionar efeito terapêutico, evidenciando a toxicidade e provocando graves efeitos colaterais. A encapsulação de fármacos em sistemas de liberação modificada, como os lipossomas, pode reduzir a toxicidade do fármaco, através do prolongamento da liberação, proporcionando maior tempo de contato entre o fármaco e os tecidos locais. Os lipossomas apresentam elevado grau de biocompatibilidade e conseguem carrear e direcionar diferentes tipos de fármacos devido as suas características estruturais. Neste trabalho estudou-se a encapsulação do cloridrato de ciprofloxacino (CIPRO) em lipossomas revestidos de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) ou o copolímero termosensível Pluronic[®] F127 (PLU). Lipossomas unilamelares contendo 40 ou 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) foram preparados por Evaporação em Fase Reversa (REV) seguida de sonicação. A eficiência de encapsulação foi obtida a partir das frações contendo lipossomas carregados de CIPRO separadas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-50, e mostrou-se melhor para as amostras contendo PLGA e maior concentração de CIPRO (5 mg/mL). A determinação do diâmetro médio dos lipossomas foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (Light Scattering) e demonstrou redução no tamanho das estruturas quando PLGA ou PLU estavam presentes nas preparações. A incorporação de CIPRO aos lipossomas provocou aumento do tamanho das estruturas quando comparadas com as preparações isentas de fármaco. Verificou-se que o aumento na concentração de fármaco provocou a

diminuição do diâmetro médio dos lipossomas. Experimentos de liberação *in vitro* mostraram que a liberação do CIPRO a partir dos lipossomas foi mais lenta em relação ao CIPRO não encapsulado. A liberação do CIPRO a partir de lipossomas revestidos com PLGA mostrou que a liberação foi mais lenta em relação aos lipossomas não revestidos. Os resultados demonstram que as preparações de CIPRO em lipossomas revestidos com PLGA ou PLU podem representar sistemas de liberação de fármacos antibióticos com grande potencial de utilização. O estudo de biodisponibilidade ocular demonstrou que lipossomas revestidos com PLGA e PLU mantiveram a MIC₉₀ de CIPRO para os principais patógenos oculares por mais tempo que o CIPRO em solução no humor aquoso, quando administrados por via subconjuntival. Estes resultados demonstram que a associação de PLGA e PLU com lipossomas pode ser utilizada como um eficiente sistema de liberação ocular de fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: lipossoma, ciprofloxacino, PLGA, pluronic

ABSTRACT

Subconjunctival administration of drugs has been used for treatment of pathologies that affect the anterior and posterior segment of the eyes. However, it is difficult to keep drugs at adequate therapeutic levels due to their removal by physiological mechanisms. This type of treatment presents some disadvantages, including discomfort and risk of lesions caused by the frequency of injections. Besides, systemic administration requires high doses to promote efficient therapeutic effect, which is evidenced by the toxicity and severe side effects. Drug encapsulation in modified delivery systems, such as liposomes, can reduce drug toxicity through extended release, permitting for longer time the contact between the drug and the local tissues. Liposomes have high degree of biocompatibility and due to their structural characteristics can carry and target drugs of different types and sizes. In the present work we studied the encapsulation of ciprofloxacin hydrochloride (CIPRO) in liposomes coated either by the poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) or thermosensitive copolymer Pluronic[®] F127 (PLU). Unilamellar liposomes containing 40 or 50 mM of hydrogenated soy phosphatidylcholine (FSH) were prepared by reverse phase evaporation (REV) method, followed by sonication. Encapsulation efficiency was obtained using fractions containing liposomes loaded with CIPRO, separated by exclusion chromatography on Sephadex G-50 gel. Best encapsulation efficiency was obtained with samples containing PLGA with CIPRO at a higher concentration (5 mg/mL). Liposome medium diameter was determined by dynamic light scattering, and showed a size reduction when either PLGA or PLU was present in the preparations. The incorporation of CIPRO into the liposomes caused a size increasement of the structures when compared to preparations lacking the drug. Nevertheless, increasing the drug concentration caused a decrease of the liposome medium diameter. Experiments of *in vitro* release showed that the liberation of CIPRO from the liposomes was slower when compared to not encapsulated

CIPRO. The release of CIPRO from liposomes coated by PLGA showed that the liberation was slower when compared to non-coated liposomes. The results show that liposome preparations containing CIPRO and covered either by PLGA or PLU represent antibiotic drug delivery systems with great possibilities. The bioavailability study shows that liposomes covered by both PLGA and PLU maintained the MIC₉₀ of CIPRO against the main ocular pathogens for longer time than CIPRO solution in aqueous humor, when subconjunctivally injected. These results demonstrate that the PLGA and PLU association with liposomes can be used as an efficient ocular drug delivery system.

KEYWORDS: liposome, ciprofloxacin, PLGA, pluronic.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AUC	Área sob a curva
CIPRO	Cloridrato de ciprofloxacino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DM	Diâmetro médio
EIV	Vesícula obtida por injeção de éter
EE	Eficiência de encapsulação
	Vesicle French Press
FPV	(vesículas obtidas por extrusão a pressão elevada em prensa de French)
FSH	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
HA	Humor aquoso
HV	Humor vítreo
Lipo CIPRO	Lipossomas contendo FSH:PLGA:PLU na proporção 40:0,085:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL
LUV	Vesícula unilamelar grande
MIC90	Concentração inibitória mínima para 90% de microrganismos
MLV	Vesícula multilamelar
PCS	Espectroscopia de fotocorrelação

PLGA	Ácido poli láctico co-glicólico
PLU	Pluronic [®] F127
REV	Evaporação de fase reversa
SUV	Vesícula unilamelar pequena
T_m	Temperatura de transição de fase
TMC	Temperatura micelar crítica
ULV	Vesícula unilamelar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do olho.....	5
Figura 2. Representação esquemática de um lipossoma e sua bicamada lipídica constituída por moléculas anfifílicas contendo uma cauda apolar e uma cabeça polar.....	8
Figura 3. Estrutura de um lipossoma unilamelar.....	10
Figura 4. Fórmula geral dos Pluronicos representada por PEO _x -POP _y -POE _x	19
Figura 5. Estrutura química do PLGA. “x” representa ácido láctico e “y”, ácido glicólico.....	20
Figura 6. Estrutura química do CIPRO.....	22
Figura 7. Representação da célula de difusão do sistema de liberação <i>in vitro</i>	37
Figura 8. Cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	41
Figura 9. Espectro de varredura do cloridrato de CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	44
Figura 10. Espectro de varredura de CIPRO em metanol para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	44
Figura 11. Espectro de varredura de CIPRO em lipossomas contendo 40 mM de FSH e 0,85 mg/mL de PLGA para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	45
Figura 12. Curva analítica de CIPRO em metanol	46
Figura 13. Curva analítica de CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.....	47
Figura 14. Estudo das alterações de lipossomas compostos por 40 mM de FSH isentos de PLGA e diferentes concentrações do polímero.....	51
Figura 15. Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de 40 mM de FSH, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente.....	53
Figura 16. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 100:6,8 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente.....	53

- Figura 17.** Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 100:17 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 54
- Figura 18.** Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 100:34 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 54
- Figura 19.** Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de FSH:PLGA 100:0,02 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 55
- Figura 20.** Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:PLGA:CIPRO 100:0,02:6,8 mM utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 55
- Figura 21.** Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:PLGA:CIPRO 100:0,02:17 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 56
- Figura 22.** Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:PLGA:CIPRO 100:0,02:34 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 56
- Figura 23.** Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de 50 mM de FSH, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 57
- Figura 24.** Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 100:27 mM , utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 57
- Figura 25.** Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de FSH:PLU 100:20 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 58

- Figura 26.** Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:PLU:CIPRO 100:20:34 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente..... 58
- Figura 27.** Análises realizadas por espalhamento de luz para determinação do diâmetro hidrodinâmico de lipossomas. As preparações foram diluídas na proporção de 1:30 (V/V) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2..... 64
- Figura 28:** Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC obtidos a partir do experimento de liberação *in vitro* para solução de CIPRO livre 5 mg/mL, lipossomas contendo FSH 40 mM e CIPRO 5 mg/mL, lipossomas contendo FSH 50 mM e CIPRO 5 mg/mL, lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL, lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL, solução de CIPRO 5 mg/mL e PLU 7,9 mM..... 68
- Figura 29.** Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL, lipossomas contendo FSH 40 mM e CIPRO 5 mg/mL e lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL..... 69
- Figura 30.** Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL, em lipossomas contendo FSH 50 mM e CIPRO 5 mg/mL e lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL..... 70
- Figura 31.** Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL, solução de PLU 7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL e em lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL..... 71
- Figura 32.** Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL, em lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL e lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL..... 72
- Figura 33.** Representação esquemática do processo de liberação *in vitro*..... 73
- Figura 34.** Curva analítica do CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4..... 74
- Figura 35.** Quantificação de CIPRO nas amostras de humor aquoso em função do tempo para as preparações de CIPRO livre 5mg/mL e lipo CIPRO..... 75

Figura 36: Ilustração da análise estatística pelo teste t-Student aplicada aos resultados de AUC obtidos a partir do HA para solução de CIPRO livre 5 mg/mL e lipo CIPRO nas primeiras 24 horas de ensaio..... 76

Figura 37. Quantificação de CIPRO nas amostras de HV em função do tempo para as preparações de CIPRO livre 5 mg/mL e lipo CIPRO..... 77

Figura 38: Ilustração da análise estatística pelo teste t-Student aplicada aos resultados de AUC obtidos a partir do HV para solução de CIPRO livre 5 mg/mL e lipo CIPRO..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores das absorvâncias do CIPRO em metanol.....	46
Tabela 2. Valores das absorvâncias do CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.....	47
Tabela 3. Preparações de lipossomas de FSH 40 mM com concentrações variadas de PLGA.....	48
Tabela 4. Eficiência de encapsulação das preparações de lipossomas 40 mM sem polímero e diferentes concentrações de fármaco; preparações contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e diferentes concentrações de fármaco; preparações contendo FSH:CIPRO 40:13,6 mM e FSH:CIPRO:PLU 40:13,6:7,9 mM.....	60
Tabela 5. Valores de índice de refração das diversas preparações de lipossomas obtidos a partir de determinações realizadas em refratômetro Abbé a 20 °C e utilizando-se água deionizada como padrão.....	61
Tabela 6. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz.....	63
Tabela 7: Área sob a curva (AUC) determinada pelo método do trapezóide a partir da curva de liberação de cada uma das replicatas das amostras.....	67
Tabela 8. Valores das áreas de CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4....	74
Tabela 9: Área sob a curva (AUC) determinada pelo método do trapezóide a partir da curva de liberação de cada uma das replicatas das amostras.....	78
Tabela 10. Atividade <i>in vitro</i> de ciprofloxacino contra patógenos oculares.....	79

INTRODUÇÃO

Inúmeras doenças que afetam o segmento anterior do olho estão relacionadas a infecções pós transplante de córnea ou cirurgia de cataratas.

As infecções pós-operatórias constituem a principal causa de endoftalmite. Opções para tratamento de infecções bacterianas incluem a utilização de antiinflamatórios, corticosteróides associados ou não a antibióticos, aplicados por via tópica, diretamente no corpo vítreo, por via endovenosa (HUGHES et al., 2005) ou subconjuntival (ZAMIR et al., 2002; BUZARD e LIAPIS, 2004).

O sucesso da farmacoterapia está relacionado com a presença do fármaco apropriado no local de ação em concentração adequada para o efeito terapêutico durante o período de tempo necessário ao tratamento (MACHA, et al., 2003). Porém na tradicional terapia ocular a biodisponibilidade dos fármacos aplicados topicamente é comprometida por muitas limitações anatômicas e fisiológicas incluindo rápida drenagem nasolacrimal, baixa penetração corneal e exposição sistêmica indesejada (MEISNER e MEZEI, 1995; BOCHOT et al., 1998; YASUKAWA et al., 2004).

Injeção subconjuntival é o modo mais direto para se alcançar níveis terapêuticos do fármaco no humor aquoso (SOULI et al., 2001), além de evitar os efeitos adversos associados com a administração sistêmica (CHASTAIN, 2003). Porém, aplicações repetidas causam desconforto no paciente e levam a não adesão ao tratamento (OGURA, 2001).

A administração de lipossomas pela via subconjuntival tem sido investigada por muitos grupos de pesquisadores. O principal objetivo desta pesquisa tem sido promover terapia mais eficaz através do direcionamento para o sítio de ação e prolongar a atividade proporcionando altos níveis de fármaco por um período de tempo maior no local de ação (MEISNER e MEZEI, 1995).

Quase todas as classes de fármacos oftálmicos aplicados subconjuntivamente têm sido estudadas na forma lipossomal. O tempo de clearance de preparações lipossomais administradas por via subconjuntival pode ser consideravelmente prolongado. Em estudos realizados em animais, fármacos lipossomais foram detectados na córnea, esclera, retina e coróide sete dias após injeção subconjuntival; este fato deve resultar em administração menos freqüente e aumento da adesão ao tratamento.

Fluoroquinolonas são bem toleradas e apresentam um melhor perfil farmacológico sobre outros antibióticos devido a sua absorção intraocular. Entre estes compostos, ciprofloxacino é um dos antibióticos mais eficazes em relação ao espectro antibacteriano (YALVAC et al., 2003).

Ciprofloxacino tem sido amplamente utilizado, por via tópica, no tratamento e profilaxia de infecções oculares (SNYDER-PERLMUTTER et al., 2000), tais como conjuntivite bacteriana, assim como na maioria das infecções graves como, por exemplo, queratite bacteriana (HWANG, 2004). Entretanto, é fato conhecido, que quando administrado por via tópica, o ciprofloxacino não atinge a MIC₉₀ para a maioria dos patógenos localizados no vítreo não sendo, portanto, eficiente para a terapia de endoftalmite (YALVAC et al., 2003).

Sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como lipossomas, nanopartículas, implantes intra-oculares, entre outros, proporcionaram um grande avanço para a terapia em oftalmologia, promovendo, desta forma, novas alternativas para o tratamento das patologias que acometem os olhos (LALLEMAND et al., 2003; YASUKAWA et al., 2004; AYALASOMAYAJULA e KOMPELLA, 2005).

Várias estratégias têm sido exploradas visando à obtenção de efeito prolongado de fármacos no globo ocular, sendo a associação dos lipossomas com polímeros uma das alternativas viáveis (OLIVEIRA et al., 2005).

Polímeros termosensíveis como o poloxamer, conhecidos comercialmente como Pluronic[®], são blocos de copolímeros contendo duas unidades de polioxietileno (hidrofílicas) intercaladas por uma unidade de polioxipropileno (hidrofóbica) (IVANOVA et al., 2000; SVINGEN et al., 2002; GU e ALEXANDRIDIS, 2004). São biocompatíveis e apresentam-se em solução na temperatura ambiente; porém na temperatura do organismo humano gelificam, tornando-se bioadesivos e dificultando a saída do fármaco, de modo a prolongar o tempo de contato do fármaco com os tecidos locais.

O ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) é um polímero biocompatível, que, no organismo, é hidrolisado liberando seus constituintes monoméricos, ácido láctico e glicólico, os quais são metabolizados gerando gás carbônico e água, sendo eliminados na urina (ALLÉMANN et al, 1998; DORTA et al, 2002; YASUKAWA et al., 2004).

PLGA tem sido extensivamente aplicado como biomaterial em sistemas de liberação de fármacos (RAMCHANDANI e ROBINSON, 1998; JAIN, 2000). Na área de oftalmologia, tem sido utilizado com sucesso na obtenção de sistemas particulados para veiculação de antibióticos, incluindo o ciprofloxacino, no tratamento de infecções (COLTHURST et al., 2000; OGURA, 2001; DILLEN et al., 2004).

Diante desses fatos, alternativas que contribuam para a melhoria do tratamento das doenças oculares parecem ser de óbvia relevância, pois certamente estarão relacionadas com o aumento da eficiência terapêutica, minimização dos efeitos colaterais e aumento do conforto dos pacientes pela diminuição da frequência das aplicações.

REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente a aplicação de fármacos na terapêutica e medicina preventiva está atrelada a sua ação indiscriminada e incapacidade de alcançar somente as áreas que precisam de tratamento. Apesar dos enormes avanços realizados na biologia molecular e farmacologia nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de novos fármacos, mais seletivos, é ainda muito caro, o processo incerto e longo.

Conseqüentemente, muita atenção têm sido focada numa abordagem alternativa, nomeadamente o uso de sistemas de liberação de fármacos, os quais se esperam otimizem a ação dos fármacos já existentes, conferindo seletividade e redução dos efeitos adversos (AGRAWAL e GUPTA, 2000). Esta necessidade surge primariamente devido às enormes barreiras que uma molécula de fármaco deve sobrepor para alcançar seu local de ação e desempenhar seu papel terapêutico (KABANOV et al., 2002).

A liberação ocular de fármacos tem sido foco de numerosos estudos (DEL NOZAL et al., 1996; LE BOURLAIS et al., 1995; BOCHOT et al., 1998; OGURA, 2001, HUGHES et al., 2005), uma vez que o maior problema na terapêutica oftálmica é atingir e manter uma concentração eficaz e não tóxica do fármaco no sítio alvo, por um período de tempo prolongado (CALVO et al., 1997; NAGARSENKER et al., 1999; MONEM et al., 2000; KAUR et al., 2004).

O olho humano é dividido anatomicamente em segmento anterior, que inclui a córnea, câmara anterior, íris, cristalino e corpo ciliar, e em segmento posterior, constituído pela esclera, coróide e retina, adjacentes à cavidade vítrea a qual é preenchida pelo corpo vítreo (COLTHURST et al., 2000; OGURA, 2001, YASUKAWA et al., 2004).

As doenças do segmento anterior do olho podem ser devidas à herança genética, degenerações, traumas e infecções, e incluem ceratoconjuntivite sicca, catarata, ceratocone,

glaucoma, conjuntivites, endoftalmites, queratites e uveítes. Se não tratadas devidamente, estas desordens podem levar à complicações, inclusive diminuição e até perda da visão.

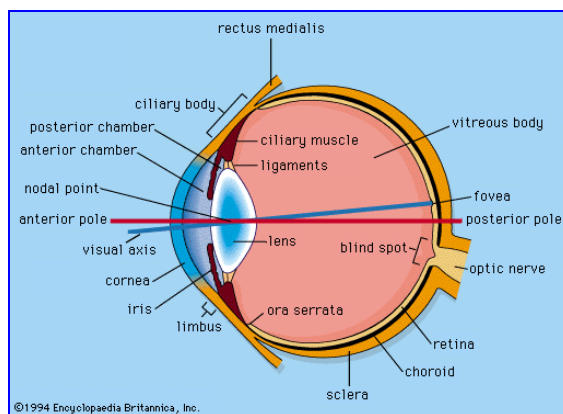


Figura 1. Estrutura do olho (<http://www.icat.ncsu.edu/projects/retina/files/eye.gif>, 30 de julho 2004).

A estrutura anatômica e o processo de proteção fisiológica do olho exercem uma forte defesa contra a absorção ocular de fármacos. Esta é a razão pela qual formas farmacêuticas oculares convencionais exibem biodisponibilidade extremamente baixa (BOCHOT, et al., 1998; COLTHURST et al., 2000).

A limitada absorção de fármacos nos tecidos oculares é devida principalmente ao mecanismo protetor da fisiologia ocular, tais como drenagem nasolacrimal, limitada permeabilidade das membranas córneas e turnover lacrimal (LI et al., 1987; LANG, 1995; BOCHOT et al., 1998; DING, 1998; WEI et al., 2002; YASUKAWA et al., 2004).

Devido a estas limitações fisiológicas e anatômicas, aproximadamente 1-10% da dose ministrada alcança os tecidos do segmento anterior do olho; subsequentemente, somente uma fração da quantidade absorvida particionará para os tecidos do segmento posterior (MEISNER e MEZEI, 1995), aproximadamente 1% ou menos da dose inicialmente administrada (DING, 1998; KAUR et al., 2004); sendo que ocorre uma

pequena duração do efeito já que o tempo de permanência do fármaco no local de ação é muito curto (HANNA, 1980; LEE e ROBINSON, 1986; LE BOURLAIS et al., 1995; MYLES et al., 2005).

Apenas uma reduzida quantidade do fármaco alcança os olhos após administração sistêmica, sendo que seria necessária a administração de altas doses para se obter níveis terapêuticos neste local (COLTHURST et al., 2000; OGURA, 2001) e, por essa razão, os efeitos colaterais dos fármacos ficam bastante ressaltados (LI et al., 1987; GEROSKI e EDELHAUSER, 2001; EL-KAMEL, 2002; YASUKAWA et al., 2004).

Lipossomas têm sido avaliados por sua capacidade em aumentar a absorção corneal. Em geral, administração tópica e subconjuntival tem sido preferida à administração sistêmica no tratamento do segmento anterior do olho devido sua habilidade em aumentar a especificidade de direcionamento, atravessar as barreiras oculares e reduzir a toxicidade sistêmica (DAMJI et al., 1998; EBRAHIM et al., 2005). Apesar da administração local no tratamento do segmento anterior apresentar vantagens, ela também é associada a obstáculos específicos para penetração tecidual incluindo rápida remoção do filme pré-corneal, estreita junção entre as células do epitélio corneal, promovendo uma barreira efetiva contra a penetração da maioria dos agentes e baixa penetração de compostos altamente hidrofóbicos e hidrofílicos através do epitélio córneo e estroma (KAUR e SMITH, 2002; KAWAKAMI et al., 2001).

Injeção subconjuntival pode ser empregada para alcançar rapidamente concentrações mais altas de fármaco no segmento anterior do olho (CHASTAIN, 2003).

Aplicações repetidas causam desconforto no paciente (OGURA, 2001) e levam a não adesão ao tratamento, causando assim, variações nos níveis terapêuticos do fármaco (ANSEL et al., 1995; PRISTA et al., 1996).

Administrações freqüentes podem aumentar o risco de toxicidade do fármaco, assim como seus efeitos colaterais (PATTON e FRANCOEUR, 1978; SALMINEM et al., 1984), além de existir o risco de introdução de uma infecção (COLTHURST et al., 2000). Uma alternativa para direcionar injeções oftálmicas é o uso de sistemas de liberação sustentados que manteriam os níveis terapêuticos do fármaco por períodos de tempo maiores (COLTHURST et al., 2000).

Uma estratégia é aumentar o tempo de permanência précorneal do fármaco e/ou a capacidade de penetração das substâncias ativas através da utilização dos sistemas coloidais de liberação de fármacos, tais como nanopartículas e lipossomas (LE BOURLAIS et al., 1995; BOCHOT et al., 1998; OGURA, 2001).

1- LIPOSSOMAS

No começo da década de 1960, Alec Bangham descreveu como membranas moleculares, fosfolipídios que interagem com a água para formar uma única estrutura atualmente reconhecida como lipossomas (BANGHAM, 1974; LASIC et al., 1998).

Os sistemas coloidais de veiculação de fármacos, tais como lipossomas têm sido empregados na área farmacêutica (ATTWOOD e FLORENCE, 1985; COUVREUR et al., 1991; GREGORIADIS e FLORENCE, 1993; OLIVEIRA et al., 1997), uma vez que podem compartimentalizar os fármacos, modificando sua velocidade de liberação no meio biológico (OLIVEIRA et al., 1997).

Lipossoma pode ser definido como uma estrutura que consiste de uma ou mais camadas concêntricas ou bicamadas lipídicas separadas pela água e contendo um compartimento aquoso central (LASIC et al., 1998; BAKKER-WOUDENBERG, 2002; OLIVEIRA et al., 2005). Os fosfolipídios, geralmente fosfatidilcolina, são os componentes mais comumente usados na formulação de lipossomas (OLIVEIRA et al., 1997; BOCHOT

et al., 2000), pois constituem o principal componente estrutural das membranas biológicas (GREGORIADIS E POSTE, 1988; OLIVEIRA et al., 1997).

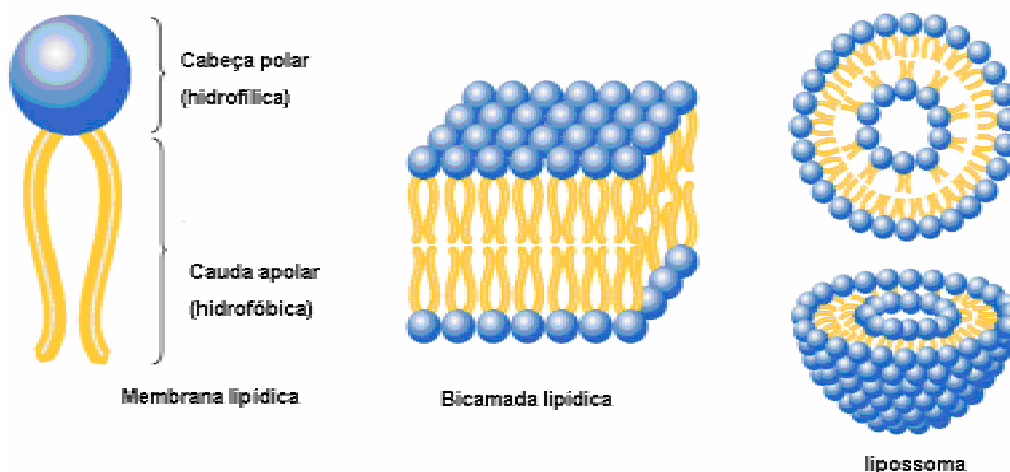


Figura 2. Representação esquemática de um lipossoma e sua bicamada lipídica constituída por moléculas anfifílicas contendo uma cauda apolar e uma cabeça polar (http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/mcmurrygob/medialib/media_portfolio/24.html, 18 de fevereiro de 2005).

Dentre os fosfolipídios mais utilizados na preparação de lipossomas estão as fosfatidilcolinas (GARBUZENKO et al., 2005), provavelmente devido a sua neutralidade de cargas, inércia química e similaridade com as membranas biológicas. A fosfatidilcolina, também conhecida como lecitina, pode ser obtida de fontes sintéticas ou naturais a partir da gema de ovos e grãos de soja (NEW, 1990).

A fosfatidilcolina hidrogenada é obtida a partir da fosfatidilcolina através de um processo de hidrogenação catalítica (LANG et al., 1990), a qual torna a molécula inteiramente saturada, com uma temperatura de transição de fase (T_m) de 52 °C. Aumentando-se o grau de saturação do lipídio ocorre uma diminuição na hidratação da

bicamada, sendo que os lipossomas mais estáveis existem quando a bicamada lipídica está firmemente empacotada e menos hidratada (GARBUZENKO et al., 2005).

A estabilidade da fosfatidilcolina hidrogenada frente à oxidação é maior que a da fosfatidilcolina devido à ausência parcial ou total de ácidos graxos polinsaturados (LANG et al., 1990), os quais possuem papel fundamental no processo de peroxidação lipídica caracterizado por reações em cadeia induzidas por diferentes fontes de radicais livres tais como reações enzimáticas, irradiação ionizante e luz ultravioleta (STOJANOVIC et al., 2001) que podem levar a desestabilização do sistema. Em estudos de biocompatibilidade, o uso deste fosfolípido apresentou melhores resultados quando comparado à fosfatidilcolina (FOONG et al., 1989).

Chou et al. (2003), estudaram o efeito da composição dos lipossomas na estabilidade do pró-fármaco anti-tumoral irinotecan e verificaram que lipossomas compostos por lipídeos com alta T_m , como a fosfatidilcolina de soja hidrogenada, apresentaram maior estabilidade que lipossomas formados por lipídeos com T_m mais baixa.

Imura et al. (2002), obtiveram melhor eficiência de encapsulação para fármaco hidrossolúvel quando utilizaram apenas fosfatidilcolina de soja hidrogenada como fosfolípido estrutural ao invés de outras misturas lipídicas.

Lipossomas constituídos de fosfatidilcolina de soja hidrogenada foram capazes de melhorar grandemente a fotoestabilidade da tretinoína, aumentando em 25 vezes o seu tempo de meia vida. A elevada fotoproteção oferecida pela fosfatidilcolina de soja hidrogenada é resultado da alta estabilidade destas vesículas que possuem uma alta T_m e conseqüentemente possuem monômeros com funções éster menos reativas do que a fosfatidilcolina de soja (MANCONI et al., 2003).

Al-Muhammed et al. (1996) ao estudar a aplicação intraocular de lipossomas carregados com dexametasona verificaram que os níveis do fármaco mantiveram-se em

altas concentrações nos tecidos oculares de coelhos por mais de quatro horas e levantaram a possibilidade de que os fosfolipídios saturados dos lipossomas pudessem protegê-los das lisozimas da lágrima e das estearases, resultando em maior biodisponibilidade.

Em função da sua estrutura, lipossomas são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, no seu interior aquoso, e substâncias lipofílicas na bicamada lipídica (ATTWOOD e FLORENCE, 1985; LOPES e OLIVEIRA, 2000; IMURA et al., 2002; LOPES et al., 2004; EBRAHIM et al., 2005), e agem como um transportador do tipo reservatório (YASUKAWA et al., 2004).

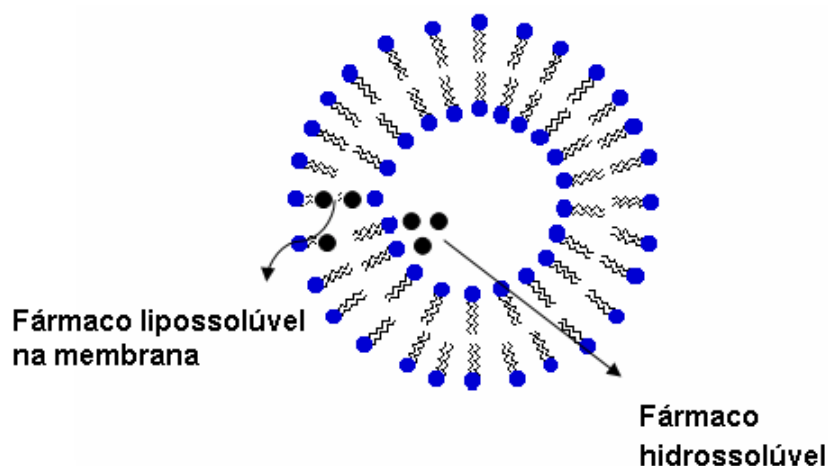


Figura 3. Estrutura de um lipossoma unilamelar (adaptado de <http://www.drugs.com/PDR/images/73/20020001.jpg>, 29 de julho de 2004).

Terapeuticamente, lipossomas apresentam uma ampla variedade de aplicações, incluindo o transporte de enzimas, antibióticos, antivirais, quimioterápicos, vacinas e na terapia gênica (GREGORIADIS, 1993; MAURER, et al. 1998; EBRAHIM et al., 2005).

As vantagens da liberação de fármacos a partir de lipossomas incluem diminuição do pico de concentração resultando em toxicidade diminuída, direcionamento para os tecidos alvo aumentando-se a disponibilidade do fármaco no sítio de ação e diminuindo-se

a toxicidade nos tecidos sadios (BAKKER-WOUDENBERG, 2002; PINTO-ALPHANDARY et al., 2000), menor frequência de aplicação e direcionamento passivo para o sistema fagocítico mononuclear (EBRAIM et al., 2005).

1.1- Preparação de lipossomas

Os procedimentos para obtenção de lipossomas podem ser generalizados e divididos em três estágios: no primeiro o material lipídico é dissolvido em solvente orgânico adequado; posteriormente o filme (ou pó) lipídico é formado por remoção do solvente orgânico através de evaporação, sublimação ou secagem. Na segunda etapa a fase lipídica é hidratada por dispersão em meio aquoso sob agitação. Neste estágio formam-se vesículas com tamanho e forma heterogêneos. A terceira etapa é facultativa e visa a obtenção de vesículas mais homogêneas através de procedimentos complementares como fragmentação mecânica por ultrassom, passagem através de filtros ou microfluidização (VILLANOVA e CONSIGLIERE, 2000).

Os métodos de preparação de lipossomas podem ser classificados em três categorias:

- Dispersão de duas fases. Aqui estão incluídos os métodos baseados em solventes, como injeção de etanol, injeção de éter (EIV) ou evaporação em fase reversa (REV). Estes métodos iniciam-se com a preparação da solução lipídica em solventes orgânicos, que são posteriormente removidos por evaporação sendo, finalmente, convertidos em dispersões lipossomais (NEW, 1990).

- Solubilização em detergente. Nesta categoria estão presentes os métodos baseados em intermediários de misturas micelares, como as técnicas de remoção de detergente. Estes se iniciam com misturas de micelas constituídas de lipídios e detergentes que, depois de removidos, formam os lipossomas (NEW, 1990).

- Métodos mecânicos. A produção de vesículas é realizada por ultrassonicação, microfluidização, homogeneização e extrusão por filtração (NEW, 1990).

1.2- Classificação dos lipossomas

A nomenclatura para os lipossomas descrita na literatura pode ser confusa, uma vez que estes podem ser classificados em função do número de bicamadas, método de preparação ou pelo tamanho (LASIC et al., 1998).

O tipo de vesícula a ser obtida pode variar quanto ao tamanho e número de bicamadas lipídicas e depende, fundamentalmente, do método de preparo (VILLANOVA e CONSIGLIERE, 2000).

A descrição mais comumente utilizada é aquela baseada no tamanho e lamelaridade da vesícula (VEMURI e RHODES, 1995).

Há lipossomas de diferentes tamanhos e morfologia: pequenos (20-80 nm de diâmetro) ou grandes (80-1000 nm), vesículas unilamelares (ULV) pequenas ou grandes (SUV's e LUV's respectivamente) e vesículas multilamelares (100-4000 nm – MLV's) (BOCHOT et al., 2000; YASUKAWA et al., 2004; EBRAHIM et al., 2005).

Quando lipossomas são obtidos segundo o método de Bangham a população de vesículas é bastante heterogênea e verifica-se a presença de MLV's e ULV's. De maneira geral, a mistura fosfolipídica ou os fosfolipídios são dissolvidos em solvente orgânico apropriado, que, ao ser removido, provoca a deposição do filme lipídico nas paredes do balão de fundo redondo. Em seguida, excesso de solução aquosa é adicionado e os lipossomas se formam mediante agitação. Diferenças no processo de agitação, tempo de hidratação, espessura do filme lipídico levam à heterogeneidade destas vesículas (VILLANOVA e CONSIGLIERE, 2000).

Para reduzir o tamanho de MLV's pode-se submeter a preparação lipossômica a altos níveis de energia como a exposição à irradiação ultrassônica por meio de sondas ou banhos de ultrassom (NEW, 1990). A conversão de MLV's em SUV's também pode ser conseguida após a passagem da suspensão de lipossomas por um orifício sob pressão elevada. Este método é conhecido por French Press (FPV) e para se obter uma maior homogeneidade de tamanho o ciclo de passagem deve ser repetido várias vezes (VEMURI e RHODES, 1995).

Outras técnicas empregadas são a injeção de solventes como éter ou etanol (LASIC et al., 1998; BATZRI e KORN, 1973) e a vaporização com éter (LASIC et al., 1998; DEAMER e BANGHAM, 1976).

Os lipossomas podem ainda ser classificados em lipossomas clássicos ou convencionais e lipossomas estericamente estabilizados (LASIC et al., 1998), também conhecidos como Stealth[®] liposomes.

Lipossomas convencionais, quando administrados *in vivo*, são rapidamente capturados pelas células fagocíticas do sistema reticuloendotelial e retirados da circulação (BAKKER-WOUDENBERG, 2002; AGRAWAL e GUPTA, 2000; WOODLE, 1998). Esta tendência inerente aos lipossomas pode ser explorada para transportar antibióticos no tratamento de infecções intracelulares que residem no sistema reticuloendotelial, que frequentemente é o local onde os patógenos intracelulares se localizam (SMITH, 2005; BAKKER-WOUDENBERG, 2002; AGRAWAL e GUPTA, 2000; PINTO-ALPHANDARY et al., 2000; MAURER et al., 1998).

Ao contrário, a superfície dos lipossomas estericamente estabilizados é intencionalmente modificada através de ligação com polímeros para evitar o processo de opsonização e aumentar seu tempo de circulação sistêmica (PINTO-ALPHANDARY, et

al., 2000) e/ou para o direcionamento para células ou tecidos específicos, como, por exemplo no tratamento de cânceres e na terapia gênica (IMURA et al., 2003).

1.3- Caracterização dos lipossomas

Alterando-se a composição e/ou método de preparo, as propriedades intrínsecas dos lipossomas (morfologia, estrutura e funcionalidade) são modificadas. (AGRAWAL e GUPTA, 2000; EBRAHIM, 2005; GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005). A rigorosa caracterização estrutural das preparações lipossômicas para aplicação como sistemas transportadores de fármacos é necessária uma vez que modificações na estrutura podem levar a diferentes comportamentos *in vitro* e *in vivo* (LIMA, 1998).

Os parâmetros envolvidos na caracterização de lipossomas podem ser classificados em três categorias (GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005):

- Morfologia (tamanho, lamelaridade, estabilidade, distribuição de tamanho, carga elétrica do lipossoma);
- Organização da estrutura (permeabilidade e fluidez);
- Funcionalidade (eficiência de encapsulação, estabilidade, reatividade e capacidade de fusão).

O número de lamelas afeta não somente a eficiência de encapsulação, mas também a liberação do fármaco, já que este tem de atravessar mais barreiras no caso de MLV's e, portanto, a velocidade de liberação seria menor quando comparada a ULV's. A determinação do número de lamelas pode ser feita por diversas técnicas como a ressonância magnética nuclear (RMN), raios X, microscopia eletrônica, microscopia eletrônica de criofatura (JOUSMA et al. 1987; PUGLISI et al., 1995), espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) (BOUWSTRA et al., 1993; MULLER et al., 2004), entre outras.

O tamanho das vesículas bem como a sua distribuição de tamanho é de grande relevância, pois afeta de forma direta a biodistribuição e o tempo de circulação dos lipossomas, assim como seu processo de captura pelas células do sistema reticuloendotelial (VILLANOVA e CONSIGLIERE, 2000). Além disso, para injeção intravenosa tamanho é um parâmetro crucial, sendo que as partículas não devem exceder 5 μm . Para dispersões lipossomais com um diâmetro médio $d < 1 \mu\text{m}$ uma variedade de técnicas são aplicadas para determinação do tamanho, entre estas a espectroscopia de fotocorrelação é um dos métodos mais utilizados (MULLER et al., 2004; GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005).

Segundo Lima (1998) a eficiência de encapsulação, também chamada de porcentagem ou taxa de encapsulação pode ser expressa de várias maneiras:

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

A separação de compostos não encapsulados da dispersão lipossômica é, geralmente, fator crítico na quantificação do fármaco encapsulado. As técnicas de separação mais comuns são a diálise, cromatografia de exclusão por tamanho e centrifugação (VILLANOVA e CONSIGLIERE, 2000).

1.4- Esterilização das preparações de lipossomas

A produção de lipossomas sob condições assépticas é possível, mas complexa e demorada, por isso geralmente se recorre à esterilização das preparações; porém no

processo de esterilização o tamanho das vesículas e a composição devem permanecer inalterados.

Na autoclavagem a exigência de temperaturas elevadas pode levar à desestabilização das vesículas (MEISNER e MEZEI, 1995). Já o emprego da radiação γ provoca hidrólise e aceleração da peroxidação lipídica (VILLANOVA e CONSIGLIERE, 2000).

Os métodos mais adequados para esterilização e que mantêm a estabilidade dos lipossomas são a filtração e a exposição das preparações liofilizadas a agentes químicos como o óxido de etileno. Contudo, estes métodos também apresentam algumas limitações, sendo que a filtração não é aplicável para lipossomas cujo diâmetro seja superior a 0,2 μm (MEISNER e MEZEI, 1995) e resíduos de óxido de etileno podem permanecer na preparação devido à remoção incompleta (SHARMA e SHARMA, 1997). O procedimento de filtração, apesar de impor limites ao tamanho, parece ser o mais viável por não ser destrutivo e não haver perdas de material encapsulado (VEMURIS e RHODES, 1995).

1.5- Lipossomas e liberação ocular de fármacos

Muitas pesquisas têm demonstrado que lipossomas usados como sistema de liberação ocular, podem proporcionar aumento da eficácia, reduzida toxicidade e atividade prolongada (BOCHOT, et al., 1998).

Lipossomas podem oferecer vantagens na terapia de patologias oculares porque podem ser injetados (YASUKAWA et al., 2004) e têm sido usados para tratar distúrbios dos segmentos anterior e posterior do olho, incluindo uveíte, endoftalmite e vitreoretinopatia proliferativa (EBRAHIM et al., 2005).

Aplicações lipossomais no segmento posterior dos olhos incluem implantes, injeção intravítrea e subconjuntival (EBRAHIM et al., 2005).

Sabe-se que injeções subconjuntivais de esteróides alcançam altos níveis de concentrações intravitreais, mas muitos antibióticos administrados por esta via não alcançam níveis terapêuticos (MARRAKCHI-BENJAAFAR et al., 1995).

Hirnle et al. (1991) verificaram através de estudos *in vivo* que depois de injeção subconjuntival fármacos lipossomais são detectáveis na córnea, esclera, retina e coróide em até sete dias após a aplicação.

Um aumento estatisticamente significativo na concentração corneal de gentamicina, após injeção subconjuntival em coelhos, foi reportada por Barza et al. (1984) quando comparou o fármaco lipossomal com o fármaco livre. Além disso, a forma lipossomal produziu níveis de fármaco mais altos na esclera e córnea 24 horas após a administração, levando os autores a concluírem que a encapsulação em lipossomas prolonga o efeito de antibióticos administrados por injeção subconjuntival.

Através de estudos *in vitro* e *in vivo* Lin et al. (1996) demonstraram que norfloxacino encapsulado em lipossomas acumulou na córnea em concentrações maiores que o fármaco livre, mas a difusão através da córnea foi mais lenta.

Lipossomas não apenas podem proporcionar ação prolongada na superfície da córnea, como também promovem liberação ocular controlada pelo impedimento do metabolismo dos fármacos pelas enzimas presentes, além de facilitar o transporte do fármaco através das membranas celulares, funcionando assim como bons transportadores de fármacos (KAUR, et al., 2004; LI et al., 1987).

A encapsulação de fármacos em lipossomas tem demonstrado reduzir a toxicidade, proporcionar solubilidade no plasma, aumentar a permeabilidade através das barreiras teciduais, prolongar a liberação e, em alguns casos, promover o direcionamento a órgãos específicos (ZEIMER e GOLDBERG, 2001; BOCHOT et al., 2000).

Preparações de lipossomas têm sido desenvolvidas para uso oftálmico, não somente para prolongar o tempo de contato do veículo na superfície ocular, mas ao mesmo tempo diminuir a eliminação do fármaco (EL-KAMEL, 2002).

2- PLURONIC® F127

Os lipossomas funcionais têm se mostrado eficaz como sistema de liberação de fármacos. Quando associados a polímeros termosensíveis (BOCHOT et al., 1998; KONO et al., 1999; CHANDAROY et al., 2001), são submetidos ao aumento da viscosidade do meio dispersante proporcionando melhor adesão e, portanto, aumentando o tempo de permanência do fármaco na superfície dos tecidos (LEE e ROBINSON, 1986; KONO et al., 1999; CHANDAROY et al., 2001).

Muitos sistemas de liberação controlada têm sido preparados usando polímeros biodegradáveis como transportadores para liberação de agentes farmacêuticos de vários tipos, incluindo antimicrobianos, fármacos anticâncer, esteróides e muitos outros agentes terapêuticos (DORTA et al, 2002).

Segundo Kabanov et al. (2002) polímeros são moléculas que podem transpor múltiplos problemas tais como solubilidade, estabilidade, permeabilidade e podem controlar e sustentar a liberação de fármacos no seu local de ação. Esses polímeros podem ser termosensíveis e na temperatura ambiente suas soluções aquosas são menos viscosas do que na temperatura fisiológica, na qual formam um gel viscoso, sendo, assim, uma excelente opção para liberação prolongada em oftalmologia (LE BOURLAIS et al., 1995; CHANDAROY et al, 2002; WEI et al., 2002; RUEL-GARIÉPY e LEROUX, 2004).

Os Poloxamers (Pluronic®), são triblocos de copolímeros constituídos por duas moléculas de polioxietileno (POE) e uma molécula de polioxipropileno (POP). O grupamento POP hidrofóbico liga os dois grupamentos POE hidrofílicos (CHANDAROY

et al., 2002; EL-KAMEL, 2002; DESNOYER e MCHUGH, 2003; OH et al., 2004), sendo que Pluronic[®] F127 possui fórmula molecular (EO)₁₀₆(PO)₇₀(EO)₁₀₆. São não iônicos (JEONG et al., 2002) e apresentam alta solubilidade e biocompatibilidade (VEYRIES et al., 1999; MORISHITA et al., 2001).

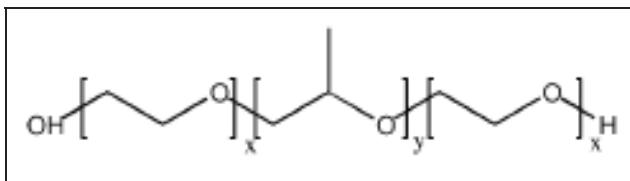


Figura 4. Fórmula geral dos Pluronicos representada por PEO_x-POP_y-PEO_x.

As soluções aquosas de Pluronic[®] são atóxicas e estáveis, por isso são adequadas para a utilização em produtos injetáveis (JOHNSTON e MILLER, 1985; GARCIA SAGRADO et al., 1994; VEYRIES et al., 1999). Soluções de Pluronic[®] F127 apresentam características reológicas de termosensibilidade (SCHMOLKA, 1972), de forma que na temperatura abaixo da sua temperatura micelar crítica (TMC) (11 °C), a solução aquosa a 30% é um líquido e suas moléculas comportam-se como copolímeros individuais (não associados), denominados monômeros. Porém, acima da TMC o polímero torna-se mais hidrofóbico devido à formação de micelas que se arranjam em uma configuração cúbica de face-centrada modificando assim a conformação das moléculas e criando um estado gel. Estes fatores influenciam diretamente na liberação de fármacos (CHANDAROY et al., 2002; JEONG et al., 2002; SVINGEN et al., 2002; OH et al., 2004).

A temperatura de transição sol-gel depende fortemente da concentração de Pluronic[®] F127 (EDSMAN et al., 1998; WEI et al., 2002; JEONG et al., 2002) e pode ser alterada por sais (WEI et al., 2002; PANDIT e KISAKA, 1996).

Formulações contendo poloxamer geralmente aumentam o tempo de permanência do fármaco nos sítios de aplicação, resultando em biodisponibilidade e eficácia melhorada (RUEL-GARIÉPY e LEROUX, 2004).

Estudos realizados em nosso laboratório mostram que lipossomas formados de fosfatidilcolina de soja e o copolímero Pluronic[®] F127 são capazes de prolongar a liberação da vancomicina e que o efeito observado é proporcional à concentração de polímero utilizada (GASPAR, 2003). Resultados mais recentes têm mostrado que a liberação intravitreal da vancomicina utilizando lipossomas de fosfatidilcolina de soja e Pluronic[®] F127 pode ser sustentada por cerca de uma semana, mantendo concentrações ativas da vancomicina (WANCZINSKI, 2005).

3- PLGA

O ácido poli lático co-glicólico (PLGA) é um poliéster alifático, copolímero sintético derivado do ácido lático e ácido glicólico (KIBBE, 2000) e possui características hidrofóbicas (YASUKAWA et al., 2004).

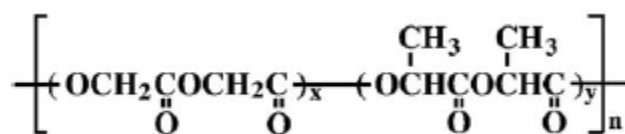


Figura 5. Estrutura química do PLGA. “x” representa ácido lático e “y”, ácido glicólico (YASUKAWA et al., 2004).

A administração de fármacos através de sistemas que utilizam o polímero PLGA tem gerado imenso interesse devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade e por isso são aprovados pelo FDA para uso em sistemas de liberação de fármacos (JAIN, 2000).

Nas condições fisiológicas são degradados por hidrólise liberando ácido láctico e ácido glicólico, que por sua vez são metabolizados em gás carbônico e água e eliminados através do ciclo de krebs e na urina (ALLÉMANN et al, 1998; DORTA et al, 2002; YASUKAWA et al., 2004).

Polímeros biodegradáveis têm sido utilizados para revestir a superfície de lipossomas, aumentando assim sua estabilidade *in vivo*, prolongando o tempo de circulação sanguínea devido a menor captura pelas células fagocíticas do sistema reticuloendotelial, além de aumentar a eficiência de encapsulação (BAKKER-WOUDENBERG, 2002; FENG et al., 2004).

Lipossomas estericamente estabilizados através do revestimento com polímeros biodegradáveis, como polietilenoglicol, têm sido usados com sucesso para liberação de agentes anticâncer (GABIZON et al., 1995; GABIZON et al., 1997; FENG et al., 2003), anti-inflamatórios (KONDURI et al., 2003), antibióticos (KONOPKA et al., 1999; PINTO-ALPHANDARY et al., 2000), entre outros.

Takeuchi et al. (1999) verificaram que polímeros que possuem uma cauda hidrofóbica são apropriados para modificar a superfície de lipossomas consequentemente melhorando a estabilidade das vesículas na circulação sanguínea.

Com base nestes fatos podemos inferir que o revestimento de lipossomas com polímeros biodegradáveis como PLGA pode ser interessante para obtenção de um sistema estericamente estabilizado. Além disso, existe um potencial para aplicação no tratamento de doenças oculares, uma vez que a literatura tem relatado bons resultados da aplicação de PLGA em sistemas de liberação para uso oftálmico tais como implantes, micropartículas e nanocápsulas (COLTHURST et al., 2000; OGURA, 2001; LALLEMAND et al., 2003; AYALASOMAYAJULA e KOMPELLA, 2005).

4- CIPROFLOXACINO

O ciprofloxacino (figura 6) é um antibiótico do grupo das quinolonas, mais especificamente das 6-fluoroquinolonas, com peso molecular de 331,34 (BRITISH PHARMACOPEIA, 2001; O'NEIL, 2001; SWEEYTMAN, 2002; USP, 2003). A molécula de ciprofloxacino apresenta dois valores de pK_a , 6,0 e 8,8, para o grupamento carboxila e amina respectivamente (MONTERO et al., 1996; MAURER et al., 1998).

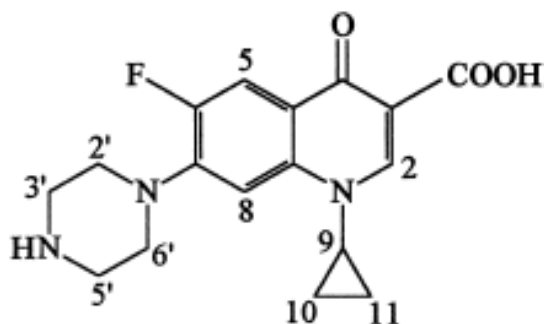


Figura 6. Estrutura química do ciprofloxacino (MAURER et al, 1998).

Quinolonas são um grupo de agentes antibacterianos derivados pela modificação sistemática do ácido nalidíxico. Entre eles 6-fluoroquinolones (6-FQs), tendo um substituinte fluorine na posição C-6, foram o foco da pesquisa em muitos campos por causa de sua eficiência terapêutica. As propriedades físico-químicas das 6-FQs foram estudadas extensivamente. O seu mecanismo de ação envolve a inibição de enzimas DNA-girases e topoisomerase IV intracelulares (SMITH et al., 2001). Entretanto, como uma primeira hipótese, seu largo espectro de ação parece ser devido a sua habilidade de atravessar envelopes bacterianos e membranas citoplasmáticas (PUGLISI et al., 1995).

Ciprofloxacino, ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolona carboxílico é provavelmente um dos compostos mais estudados e poderia ser considerado como o paradigma do grupo (SMITH et al., 2001). É um antibiótico potente e

de amplo espectro, e tem boa atividade antibacteriana contra bactérias gram negativas (PINTO-ALPHANDARY et al., 2000) e gram positivas (MAURER et al., 1998; HERNÁNDEZ-BORREL, 2003; WONG et al., 2003; YANG et al., 2003).

Ciprofloxacino tem demonstrado atividade *in vitro* contra espécies de *Staphylococcus* e *Bacillus* e para a maioria dos microrganismos incluindo espécies de *Pseudomonas*. Além disso, tem sido sugerido como um possível agente no tratamento e prevenção de endoftalmites (ÖZTÜRK et al., 2000).

No tratamento de endoftalmites há razoável penetração de fluoroquinolonas sistêmicas no vítreo, mas concentrações suficientemente altas para alcançar a concentração inibitória mínima para 90% (MIC₉₀) de todos os microrganismos isolados importantes podem não ser garantidas (SMITH et al., 2001), pois mesmo depois de injeção intravítrea a meia vida de eliminação do ciprofloxacino é de apenas 2,2 horas (WIECHENS et al., 1998).

Melhora da eficácia terapêutica de agentes antimicrobianos encapsulados em lipossomas tem sido reportada na literatura, sendo que o encapsulamento de fluoroquinolonas em lipossomas pode ser de interesse terapêutico (PUGLISI et al., 1995).

Para prolongar a biodisponibilidade intraocular de ciprofloxacino, Wiechens et al. (1998) incorporaram o antibiótico em lipossomas e observaram que os níveis intravítreos permaneceram acima da MIC₉₀ para os patógenos mais comuns que causam endoftalmite, mesmo após 3 dias.

Wong et al. (2003) demonstraram que lipossomas encapsulados com ciprofloxacino são agentes antimicrobianos promissores para o tratamento de infecções causadas por patógenos intracelulares.

Uma vez que um relativo ressurgimento de organismos antibiótico-resistentes tem ocorrido na última década, os pesquisadores depararam-se com novos desafios em

encontrar um tratamento de sucesso para doenças infecciosas (ROTH e FLYNN-JR, 1997). Acredita-se que o tratamento com lipossomas em doenças infecciosas, especialmente com uso de antivirais, pode diminuir a incidência de resistência (HARRIS et al., 2001; EBRAHIM et al. 2005).

Para entender se novos sistemas de liberação de fármacos podem vencer a resistência aos antibióticos, é importante observar a resistência no contexto clínico. Pode ser que uma diminuição na suscetibilidade não signifique necessariamente falência clínica se antibiótico suficiente puder ser direcionado para a infecção. Infelizmente, um cenário diferente prevalece na clínica onde o tratamento falha ao contrário da sensibilidade ao antibiótico nos testes laboratoriais. Em outras palavras, falência clínica é frequentemente devido, não a infecções com mecanismos de defesa resultando num alto nível de resistência bacteriana, mas muito às bactérias que são fenotipicamente resistentes *in vivo* (SMITH, 2005). Pela encapsulação do antibiótico em transportadores coloidais, como lipossomas, espera-se liberação melhorada para as células infectadas (PINTO-ALPHANDARY et al., 2000).

Desta maneira, torna-se relevante o estudo de um sistema, como os lipossomas, que possa prolongar a liberação do cloridrato de ciprofloxacino, reduzindo os efeitos colaterais e a frequência das administrações, aumentando, conseqüentemente, a adesão do paciente ao tratamento.

OBJETIVO GERAL

Este projeto teve por objetivo o desenvolvimento de lipossomas constituídos de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, contendo o antimicrobiano ciprofloxacino, o copolímero termosensível Pluronic[®] F127 ou o polímero PLGA visando manter o fármaco mais tempo no seu local de ação através da liberação prolongada, diminuindo assim o número de aplicações, reduzindo a toxicidade do fármaco e melhorando a adesão e o conforto do paciente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Obter lipossomas a partir de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino revestidos com os polímeros PLGA ou Pluronic[®] F127.

2- Caracterizar as preparações obtidas.

3- Avaliar, *in vitro*, o perfil de liberação do cloridrato de ciprofloxacino nas preparações lipossomais.

4- Avaliar, *in vivo*, o perfil de liberação do cloridrato de ciprofloxacino na preparação lipossomal.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram utilizados os seguintes materiais para o preparo dos lipossomas:

1- VIDRARIAS e ACESSÓRIOS

- balões volumétricos de 1000,0; 10,0 e 5,0 mL;
- balões de fundo redondo;
- barras magnéticas para agitação;
- copos de Becker de 50; 100; 250; 500 e 1000 mL;
- copo de vidro dupla parede transparente com entrada e saída de água;
- coluna de vidro (30 x 3 cm);
- cubetas de Quartzo para espectrofotometria, capacidade 5 mL, caminho óptico de 1 cm – Spectrocell[®];
- dessecador;
- dosador BD Oralpak[®] 5 mL
- membranas de acetato de celulose 0,22 µm – Millipore[®];
- membrana de acetato de celulose PM 12 000 – 14 000 Sigma;
- parafilm- Sigma
- pipetas graduadas 1 e 10 mL;
- pipetas de Pasteur;
- pipetas volumétricas 1,0; 2,0 e 25,0 mL;
- seringa descartável 1mL SR Saldanha Rodrigues[®], Brasil;
- termômetros Incoterm[®];
- tubos de centrifuga (10 mL) Sorvall[®];
- tubos de ensaio;
- tubos de sonicação.

2- EQUIPAMENTOS

- Analisador de partículas por *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, modelo EMI 9863 – fonte de laser He-Ne 10 mW, 514 e 532 nm – HUGHES; Auto correlator 64 canais, instalado no Depto de Físico-Química, Instituto de Química - UNESP- Araraquara;
- balança analítica Mettler[®] H51;
- banho criotermostático MLW[®], modelo MK 70;
- bomba dosadora peristáltica Milan[®], modelo BP 200;
- bomba de vácuo Tecnal[®], modelo TE-058;
- centrífuga Du Pont[®], modelo Sorvall TC-6;
- cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters Alliance[®], modelo 2695;
- espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard[®];
- estufa de secagem Fanen[®], modelo 315 SE;
- evaporador rotativo Marconi[®], modelo MA 120;
- liofilizador Edwards[®], modelo Modulyo Pirani 10;
- pH metro Micronal[®], modelo B 474;
- pipetador automático Gilson[®] capacidade 10-1000 mL;
- purificador de água Millipore[®], modelo Milli-Q Plus;
- refratômetro de Abbé Carl Zeiss Jena[®], modelo 2;
- sonicador Sonics[®], modelo VC 505;
- ultrassom Transtek Systems[®], modelo Soniclean;
- vórtex Phoenix[®], modelo AP 56.

3- MATÉRIAS PRIMAS, SOLVENTES E REAGENTES

- acetonitrila grau HPLC – J.T.Baker, Estados Unidos;
- ácido clorídrico p.a. – Synth, Brasil;
- álcool etílico – Santa Cruz, Brasil;
- álcool metílico p.a. – Merck, Alemanha;
- álcool metílico grau HPLC – J.T.Baker, Estados Unidos;
- cloridrato de cetamina - Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil;
- cloridrato de ciprofloxacino – Deg (importadora e distribuidora); origem: Índia; teor 99,8%; pureza 99,67%, lote: CF0702107-I;
- cloridrato de xilazina – Xilazin[®], Syntec do Brasil, Brasil;
- clorofórmio p.a. – Synth, Brasil;
- D,L-ácido poli láctico co-glicólico 50:50 (D,L-PLGA) - Birmingham Polymers Inc., Estados Unidos;
- fosfatidilcolina de soja hidrogenada - Epikuron[®] 200 SH, Lucas Meyer, Alemanha;
- polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno - Pluronic[®] F127 - Sigma Chemical Co, Estados Unidos;
- Sephadex G-50 - Pharmacia Biotech;
- tris (hidroximetil) aminometano p.a. – Merck, Alemanha.

4- ANIMAIS

- coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), linhagem Norfolk grupo genético Botucatu.

MÉTODOS

1- PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados de acordo com uma modificação na técnica de evaporação de fase reversa (REV) descrita por Szoka e Papahadjopoulos (1978).

Em balão de fundo redondo solubilizou-se a FSH em excesso de clorofórmio (6,0 mL). Foram pesados 120,0 e 150,0 mg de FSH para obtenção de lipossomas 40 mM e 50 mM, respectivamente. À mistura lipídio-solvente adicionou-se a fase aquosa composta por 4,0 mL de tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2. A emulsificação e remoção sob vácuo do solvente orgânico foram feitas simultaneamente em rotaevaporador com banho a uma temperatura controlada de 50 °C, por 20 minutos.

Para assegurar a completa evaporação do solvente, a preparação foi mantida em dessecador sob vácuo por, pelo menos, 2 horas.

Desta maneira, foram obtidos lipossomas compostos por vesículas multilamelares (MLV's).

1.1- Obtenção das vesículas unilamelares

Para obtenção de vesículas unilamelares, a preparação acima foi sonicada por 20 minutos, com pulsos de 1 minuto de sonicação e 1 minuto de repouso.

Após a sonicação, a dispersão de lipossomas foi centrifugada a 2550 x g por 15 minutos, a fim de eliminar o titânio liberado pela haste do sonificador.

1.2- Preparação de lipossomas contendo CIPRO

Para obtenção de lipossomas contendo CIPRO seguiu-se o mesmo procedimento descrito nos itens 1 e 1.1, porém o fármaco, nas concentrações de 2,7; 6,8 e 13,6 mM foi

previamente dissolvido na solução tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 a ser adicionada na preparação.

1.3- Preparação de lipossomas contendo PLGA

Observou-se que a massa molar do PLGA é bem maior que a massa molar da FSH (100.000:750). Por isso, buscou-se fazer uma relação molar entre FSH:PLGA. Sendo que:

$$MM_{\text{FSH}} \cong 750 \text{ g/mol}$$

$$MM_{\text{PLGA}} \cong 100\,000 \text{ g/mol}$$

Lipossomas foram preparados usando relações molares de FSH:PLGA que permitissem a incorporação do polímero.

A partir dessas premissas, os experimentos foram realizados conforme item 1 e 1.1, preparando-se previamente uma solução clorofórmica de PLGA. O volume de solução de PLGA a ser adicionado foi subtraído do volume total de clorofórmio (6,0 mL). Foram preparadas amostras contendo 0,345; 0,690; 0,850 e 1,380 mg/mL de PLGA, que correspondem às proporções molares aproximadas de 40:0,0345; 40:0,069; 40:0,085; 40:0,138, FSH:PLGA, respectivamente.

1.4- Preparação de lipossomas contendo CIPRO e PLGA

Lipossomas contendo CIPRO e PLGA foram preparados conforme descrito nos itens 1.2 e 1.3, utilizando-se a solução clorofórmica de PLGA na concentração de 0,085 mM.

1.5- Preparação de lipossomas contendo PLU

A preparação de lipossomas contendo PLU foi realizada conforme os itens 1 e 1.1. A concentração equivalente a 10% p/p (7,9 mM) de PLU foi escolhida com base no trabalho de WANCZINSKI, 2005. PLU foi, então, adicionado previamente à solução tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 e mantido sob refrigeração até completa solubilização do copolímero.

1.6- Preparação de lipossomas contendo CIPRO E PLU

As amostras contendo CIPRO e PLU foram preparadas de acordo com os itens 1.2 e 1.5.

2- METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DO CIPRO

2.1- Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2

O comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO foi determinado a partir de uma solução 10 µg/mL do fármaco em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 e analisada por espectrofotometria de UV-Vis na região de 200 a 600 nm.

2.2- Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO em metanol

O comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO foi determinado a partir de uma solução 5 µg/mL do fármaco em metanol e analisada por espectrofotometria de UV-Vis na região de 200 a 600 nm.

2.3- Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO em lipossomas contendo PLGA

A determinação do comprimento de onda de máxima absorção do CIPRO em dispersão de lipossomas foi realizada utilizando-se uma solução estoque da dispersão lipossomal contendo FSH:CIPRO:PLGA na proporção de 40:13,6:0,085 mM. Esta dispersão foi diluída em tampão tris-HCL 10 mM pH 7,2 de modo a obter-se uma solução com concentração de 40 µg/mL de fármaco. A análise foi realizada por espectrofotometria de UV-Vis na região de 200 a 600 nm.

2.4- Curva analítica do CIPRO

A curva analítica de CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 foi obtida através das diluições preparadas a partir de uma solução com concentração de 20,0 µg/mL. As diluições foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 6,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 15,0 µg/mL e 20,0 µg/mL.

A curva analítica do CIPRO em metanol foi obtida através das diluições preparadas a partir de uma solução com concentração de 500,0 µg/mL. As diluições foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 12,5 µg/mL e 15,0 µg/mL.

Foram realizadas leituras em espectrofotômetro em 271 e 282 nm para diluições feitas em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 e metanol, respectivamente. Posteriormente, a curva analítica foi elaborada com as médias dos valores de absorbância obtidos em função da concentração de CIPRO. A equação linear representativa é dada por:

$$\text{Abs} = a [\text{CIPRO}] + b$$

Sendo:

Abs: absorvância do fármaco obtida nos comprimentos de onda de 271 e 282 nm;

a: coeficiente angular da reta;

[CIPRO]: concentração de cloridrato de ciprofloxacino

b: intercepto da curva em relação ao eixo de absorvância do fármaco.

3- ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DAS PREPARAÇÕES LIPOSSOMAIS

Foi realizado um estudo para se verificar possíveis alterações nas dispersões lipossomais. Variação de tamanho pode ser estimada, indiretamente, através de variações nos valores de absorvância, as quais podem representar um indicativo de alterações na estrutura dos lipossomas. Foram preparados três tipos de amostras: lipossomas contendo FSH 40 mM, lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,069 mM. As preparações foram monitoradas espectrofotometricamente em comprimento de onda de 410 nm.

4- CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

É importante saber se as propriedades físico-químicas e a estrutura dos lipossomas são modificadas pela incorporação do fármaco. A magnitude e natureza destas mudanças devem, então, ser analisadas (SCHUTZE e MULLER-GOYMANN, 1998).

4.1- Determinação da eficiência de encapsulação

4.1.1- Separação do fármaco não encapsulado

Para determinação da eficiência de encapsulação foi necessário primeiramente realizar a separação do fármaco não encapsulado pelos lipossomas. A metodologia adotada

foi a cromatografia de exclusão utilizando gel de Sephadex G-50 (dextrana reticulada) como fase estacionária.

Foram pesados 10 g de Sephadex G-50 e feita hidratação por 24 horas com água deionizada previamente deaerada para evitar a incorporação de ar na matriz.

Após o período de hidratação, a Sephadex G-50 foi transferida para uma coluna de vidro (30 x 3 cm) e eluídos 500 mL de tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2, também deaerado, para empacotar a coluna.

Em seguida, aplicou-se 2,0 mL das preparações lipossomais de CIPRO em concentrações variadas, isentas de polímero e preparações contendo PLGA 0,085 mM ou PLU 7,9 mM, utilizando tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 deaerado como fase móvel. Entre uma amostra e outra foram injetados 2,0 mL da dispersão de lipossomas vazios contendo ou não polímero para saturar os sítios de ligação da resina.

Foram coletadas 70 frações eluídas da coluna de, aproximadamente, 2 mL cada uma, sendo o fluxo de 2 mL/min. Estas frações foram monitoradas por espectrofotometria em 410 e 271 nm. Em 410 nm observou-se o perfil de eluição dos lipossomas e em 271 nm a eluição do fármaco.

4.1.2- Cálculo da eficiência de encapsulação

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

4.2- Determinação do diâmetro médio dos lipossomas

O tamanho dos lipossomas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering), utilizando equipamento Brookhaven. Este é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio, tais como aquelas devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. É possível, então, observar flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador (BROOKHAVEN, 2005).

A técnica de espalhamento dinâmico da luz, também conhecida como espectroscopia de fotocorrelação (PCS) e Quase-Elastic Light Scattering, fornece o raio hidrodinâmico das partículas coloidais, que, através da equação de Einstein-Stokes, fornece o coeficiente de difusão das gotículas. Equação de Einstein-Stokes:

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h}$$

Sendo:

D = coeficiente de difusão das vesículas

K = constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$);

T = temperatura absoluta (293,15 K);

$\pi = 3,141592$;

$\eta =$ viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ Nm}^{-2}\text{s}$);

$R_h =$ raio hidrodinâmico

4.2.1- Preparação das amostras

As preparações foram previamente filtradas em membranas de polycarbonato (Millipore) com poros de 0,22 µm de diâmetro para que não ficasse nenhuma partícula estranha que pudesse interferir na leitura, e diluídas em tampão tris-HCL 10 mM pH 7,2 na proporção de 1:20 (V/V).

Foram realizadas 10 determinações de diâmetro médio para cada uma das amostras, calculando-se o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Os parâmetros para realização do ensaio foram:

- temperatura: 20 °C
- ângulo de incidência: 90°
- comprimento de onda do laser: 532.0 nm
- número de corridas: 10
- duração da corrida: 30 segundos

4.2.2- Índice de refração

Quando um feixe de luz incide sobre uma partícula suspensa em uma solução, esta refrata luz de acordo com seu índice de refração, o qual é diferente do solvente que a envolve.

O índice de refração é um parâmetro importante para determinação do raio hidrodinâmico dos lipossomas por espalhamento dinâmico de luz. Por isso, ele é determinado antes de se submeter as preparações ao equipamento de light scattering.

As determinações foram realizadas conforme a Farmacopéia Americana (USP 26, 2003) utilizando-se um refratômetro de Abbé e ambiente climatizado a 20 °C. O índice de refração da água purificada foi usado como padrão.

Foram realizadas 3 análises para cada tipo de preparação e calculada a média, conforme mostra a equação abaixo:

$$n_D^{20} = \frac{\sum n_i}{3}$$

5- ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Para o ensaio de liberação *in vitro* foi adotado o modelo de célula de difusão em sistema de fluxo conforme demonstra a figura 7.

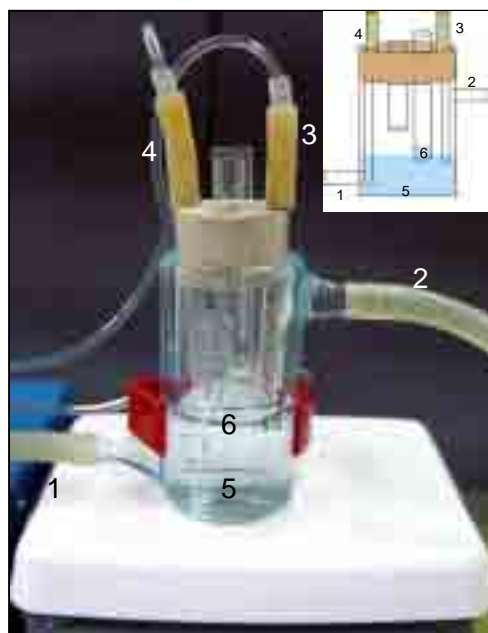


Figura 7. Representação da célula de difusão do sistema de liberação *in vitro*.

- 1- entrada de água do banho termostatizado
- 2- saída de água do banho termostatizado
- 3- entrada de meio de dissolução da bomba peristáltica
- 4- saída de meio de dissolução da bomba peristáltica
- 5- meio de dissolução
- 6- membrana de acetato de celulose onde serão colocadas as amostras

O aparelho de dissolução foi adaptado para as seguintes características:

- sistema de difusão: membrana de acetato de celulose
- área de exposição para liberação: 1,50 cm²
- temperatura: 37 ± 1 °C
- volume do compartimento receptor: 50 mL
- fase receptora: tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2
- fluxo: 20 mL/min

O volume contido no compartimento receptor foi determinado obedecendo à condição “sink”, isto é, a concentração de fármaco não é significativa para causar acúmulo no meio de dissolução (ABDOU, 1989).

A membrana de acetato de celulose empregada no ensaio foi previamente hidratada utilizando-se água purificada, na qual permaneceu por 10 minutos após ebulição. O procedimento foi realizado duas vezes e a membrana foi conservada em recipiente fechado, contendo água purificada, sob refrigeração por, no máximo, 7 dias.

As formulações utilizadas para os ensaios de liberação *in vitro* foram:

- Solução de CIPRO livre 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH 40 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH 50 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Solução de PLU 7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL.

Para cada amostra foi realizado ensaio com seu respectivo branco (preparação idêntica à amostra em questão diferindo apenas pela ausência de fármaco) nas mesmas

condições experimentais. Os valores das leituras de absorvâncias obtidos foram descontados dos valores encontrados nas preparações contendo fármaco para que não houvesse interferência na quantificação do CIPRO.

Procedimento experimental

Foram transferidos e espalhados uniformemente 0,2 mL (equivalente a 1 mg de fármaco) de cada preparação sobre a membrana de difusão. O cilindro contendo a membrana foi ajustado à célula de difusão de modo que a membrana ficou ligeiramente mergulhada (3 mm) na solução receptora. O banho e a fase receptora foram previamente estabilizados a 37 ± 1 °C, sendo a agitação do sistema realizada através de uma bomba peristáltica com fluxo de 20 mL/min.

1 mL da solução receptora foi coletado nos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos.

Após a coleta de cada amostra, 1 mL de tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 foi adicionado ao meio receptor para repor o volume retirado e manter a condição “sink”. As amostras coletadas foram diluídas na proporção de 1:1 com tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 e submetidas à análise por espectrofotometria em comprimento de onda de 271 nm para obtenção dos respectivos valores de absorvância. Estes valores foram aplicados na equação da reta do CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 (figura 12) para determinação da concentração de CIPRO nos referidos tempos de análise. O ensaio foi realizado em triplicata.

A concentração de CIPRO liberado foi determinada através da equação:

$$[CIPRO] = C_t \cdot F + \sum^{C_{t-1}}$$

Sendo:

[CIPRO] = concentração de CIPRO liberada

C_t = concentração da amostra no tempo t (mg/mL)

F = fator de diluição da amostra

6- ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VIVO* – BIODISPONIBILIDADE

Biodisponibilidade pode ser definida como a taxa e extensão nas quais uma substância ativa ou mistura ativa é absorvida a partir da forma farmacêutica e torna-se disponível no sítio de ação. A taxa representa o quão rápido o fármaco é absorvido a partir de uma forma de dosagem oral e a extensão representa quanto da substância ativa da forma de dosagem alcança o local de ação (BOROUJERDI, 2002).

O uso de animais para o ensaio de liberação *in vivo* foi previamente aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Unesp – Araraquara).

Para o estudo de biodisponibilidade utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters Alliance[®] (figura 8) e a metodologia para quantificação do CIPRO validada por Silva-Júnior (2006). Sendo as condições de trabalho as que seguem:

- fase móvel: acetonitrila:ácido fosfórico 1,5 mL/L (13:87 V/V)
- coluna de fase reversa C₁₈ 4, 6 x 150 mm com 5,0 µm de tamanho de partícula - Symmetry Waters[®]
- pré-coluna de fase reversa C₁₈ Symmetry Waters[®]
- temperatura da coluna: 30°C
- fluxo: 1,5 mL/min
- volume de injeção: 50 µL

- detector: UV/VIS
- comprimento de onda: 278 nm

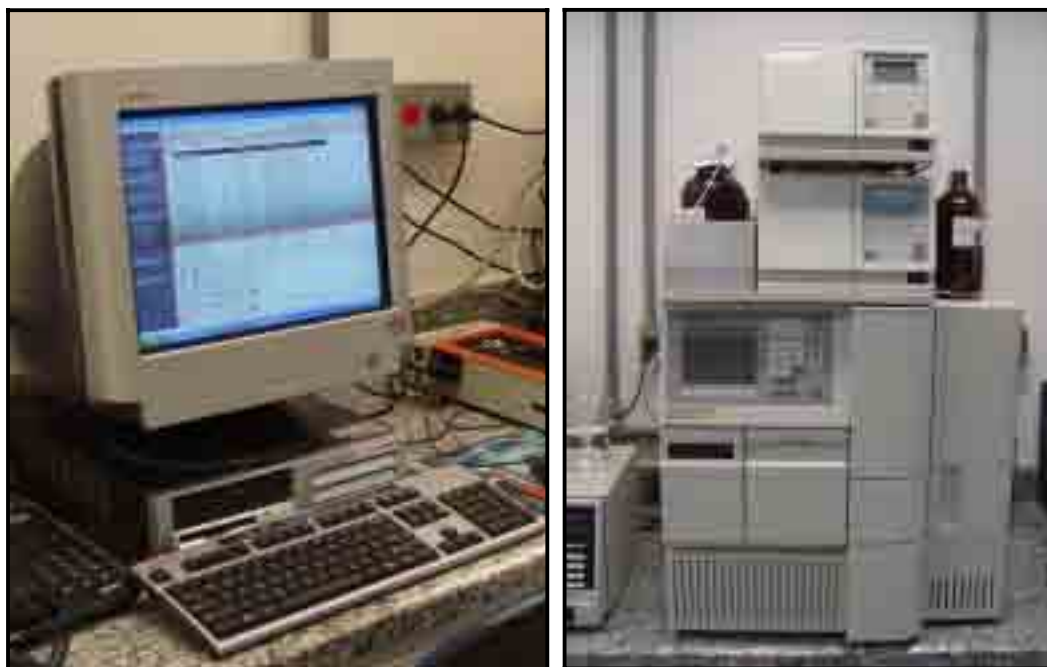


Figura 8. Cromatógrafo líquido de alta eficiência.

As formulações utilizadas para os ensaios de liberação *in vitro* foram:

- solução aquosa de CIPRO 5 mg/mL isotonzada com NaCl ;
- lipossomas contendo FSH:PLGA:PLU na proporção 40:0,085:9,9 mM e CIPRO 5 mg/mL (lipo CIPRO), isotonzada com NaCl;

Ambas as preparações foram previamente esterilizadas através de filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 μm .

Procedimento experimental

Para a determinação do perfil de biodisponibilidade do CIPRO foram utilizados coelhos albinos fêmeas, com peso corporal variando entre 1,5 e 2,0 kg, submetidos a jejum de 12 horas antes do início do ensaio. O experimento teve duração de 7 dias com coletas de amostras depois de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, sendo realizado em triplicata e totalizando, portanto, 48 animais. Os mesmos animais foram utilizados nos dois grupos experimentais, sendo o olho esquerdo para aplicação de CIPRO em solução e o olho direito para aplicação de CIPRO encapsulado em lipossomas.

Os animais foram previamente anestesiados injetando-se a associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, 35 e 3 mg/Kg respectivamente, via intramuscular. Após, aplicou-se 0,2 mL de cada preparação, equivalente a 1 mg de CIPRO, por via subconjuntival em dose única. Logo após a eutanásia dos animais foram coletadas as amostras de humor vítreo (HV) e humor aquoso (HA), as quais foram congeladas a - 32 °C e submetidas à ultracentrifugação por 15 minutos a 15 000 x g antes da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para determinação da concentração de CIPRO nas amostras de HV e HA elaborou-se uma curva analítica de CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,4, obtida através das diluições preparadas a partir de uma solução com concentração de 50,0 µg/mL de CIPRO. As diluições foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 0,05 µg/mL, 0,10 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,50 µg/mL, 2,50 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 15,0 µg/mL. A curva analítica foi elaborada utilizando-se as médias das áreas sob a curva obtidas em função da concentração de CIPRO. A equação linear representativa é dada por:

$$\text{Área} = a [\text{CIPRO}] + b$$

Sendo:

Área: área sob a curva no intervalo do tempo de retenção;

a: coeficiente angular da reta;

[CIPRO]: concentração de cloridrato de ciprofloxacino

b: intercepto da curva em relação ao eixo da área do pico do fármaco.

As áreas sob a curva obtidas das amostras de HV e HA nos diferentes tempos foram aplicadas na equação da reta para determinação da concentração de CIPRO presente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pico de máxima absorção de CIPRO, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ do fármaco em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2, foi obtido em 271 nm conforme pode ser observado na figura 9.

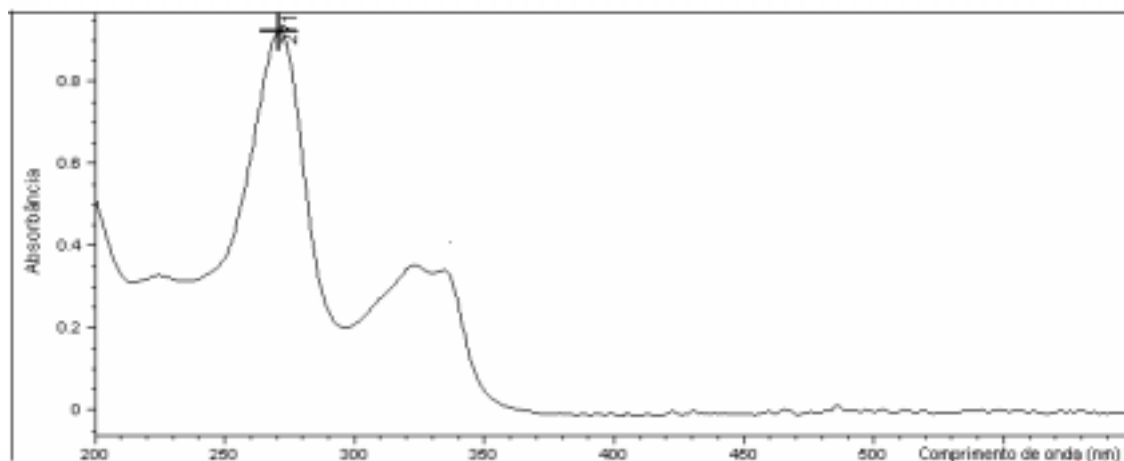


Figura 9. Espectro de varredura de CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.

O pico de máxima absorção de CIPRO, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ do fármaco em metanol foi obtido em 282 nm conforme pode ser observado na figura 10.

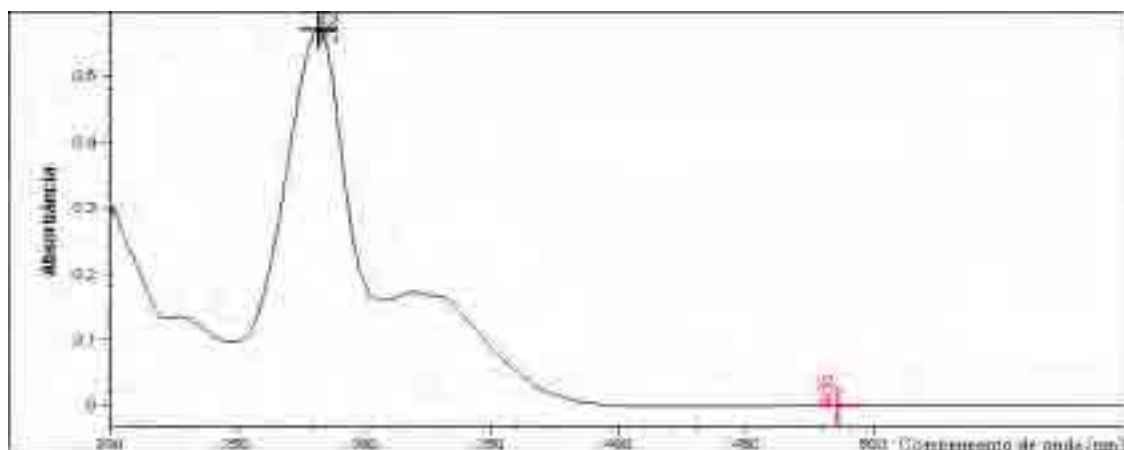


Figura 10. Espectro de varredura de CIPRO em metanol para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.

O pico de máxima absorção de CIPRO foi obtido em 271 nm conforme pode ser observado na figura 11, utilizando-se uma diluição em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 da dispersão de lipossomas constituídos de FSH:CIPRO:PLGA na proporção de 40:13,6:0,085 mM de modo a obter uma concentração do fármaco de 40 µg/mL.

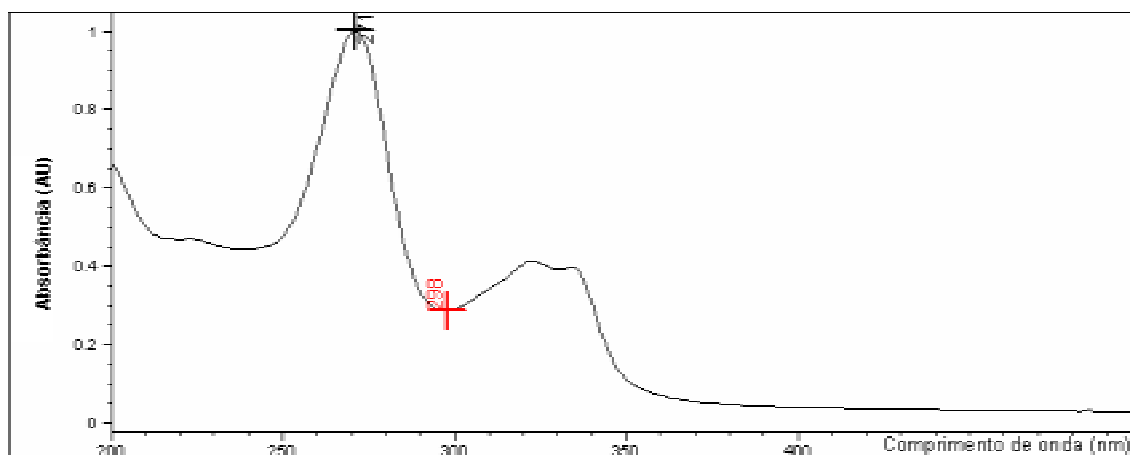


Figura 11. Espectro de varredura de CIPRO em lipossomas para determinação do comprimento de onda de máxima absorção.

A comparação dos resultados de λ_{max} obtidos nas figuras 9 e 11 demonstra que tanto a encapsulação em lipossomas como a presença do polímero PLGA não interferem nas análises.

Para obtenção da curva analítica de CIPRO em metanol foram realizadas determinações das absorvâncias em triplicata por espectrofotometria em 282 nm e calculados a média e o desvio padrão. Os resultados podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1. Valores das absorvâncias do CIPRO em metanol. Análise realizada em triplicata por espectrofotometria no comprimento de onda de 282 nm.

Concentração (µg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	Desvio Padrão
1,0	0,15431	0,14450	0,15767	0,152160	0,006843
2,5	0,36669	0,35819	0,36429	0,363057	0,004382
5,0	0,68769	0,68877	0,67889	0,685117	0,005419
7,5	1,00470	1,00310	0,97963	0,995810	0,014035
10,0	1,36010	1,31470	1,29300	1,322600	0,034240
12,5	1,66530	1,65770	1,66890	1,663967	0,005718
15,0	1,94770	1,96800	1,98990	1,968533	0,021105

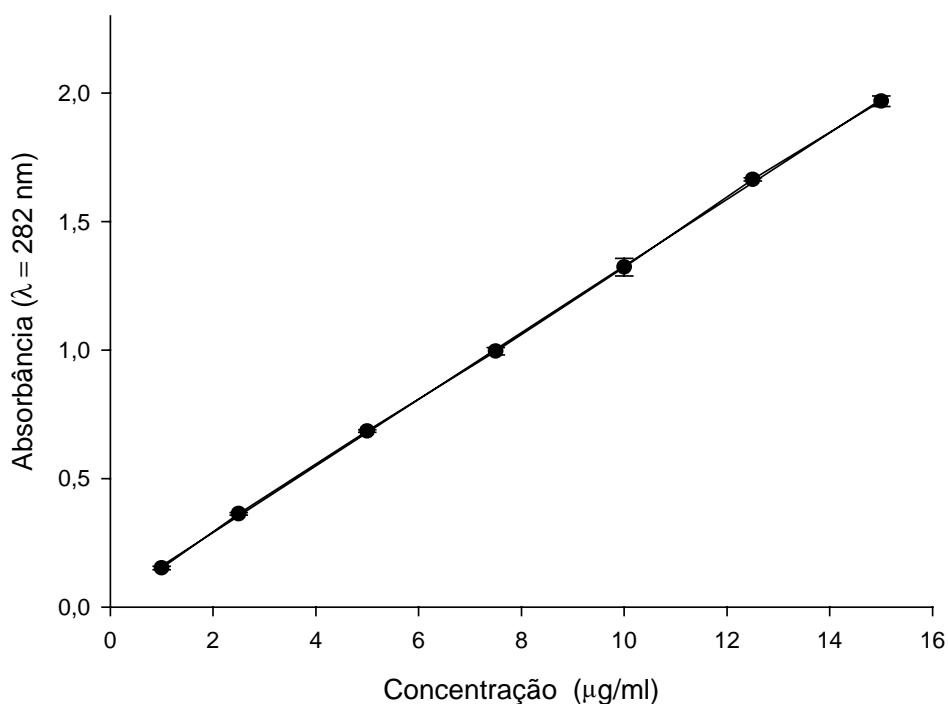


Figura 12. Curva analítica de CIPRO em metanol .

$$\text{Abs} = 0,1296 \cdot [\text{CIPRO}] + 0,0309, r^2 = 0,9998$$

Para obtenção da curva analítica de CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 as determinações das absorvâncias foram feitas em triplicata por espectrofotometria em 271 nm e calculados a média e o desvio padrão. Os resultados podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2. Valores das absorvâncias do CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2. Análise realizada em triplicata por espectrofotometria no comprimento de onda de 271 nm.

Concentração (µg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	Desvio Padrão
2,0	0,18408	0,19141	0,19034	0,188610	0,003959
4,0	0,37065	0,37225	0,37965	0,374183	0,004801
6,0	0,56169	0,56874	0,56798	0,566137	0,003870
8,0	0,74045	0,74886	0,75154	0,746950	0,005786
10,0	0,93615	0,94244	0,93930	0,939295	0,003145
15,0	1,40650	1,40770	1,40405	1,406083	0,001860
20,0	1,85150	1,86070	1,85610	1,856100	0,004600

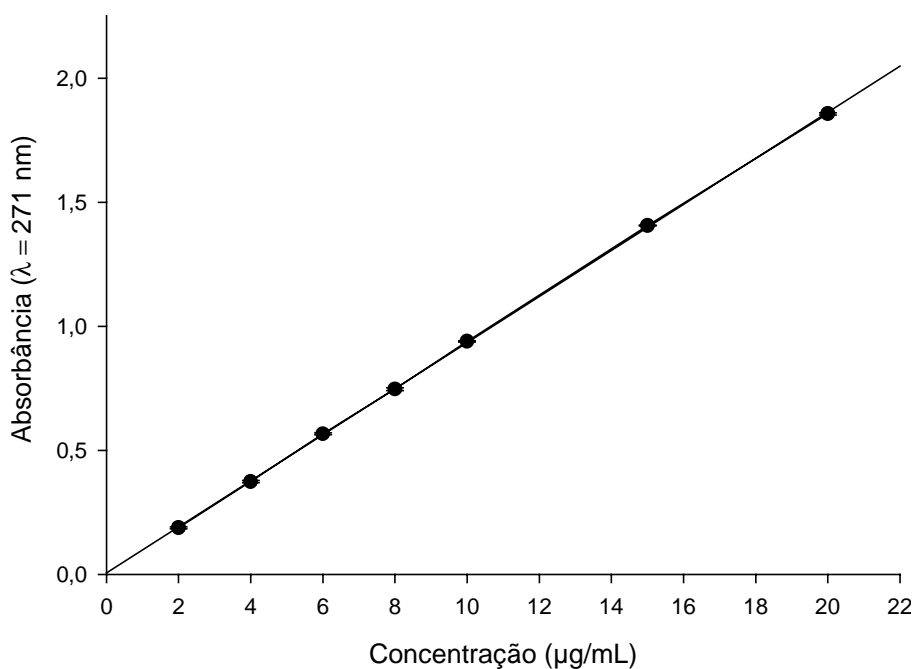


Figura 13. Curva analítica de CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.

$$Abs = 0,09013 \cdot [CIPRO] + 0,000589, r^2 = 0,9999$$

A incorporação de PLGA aos lipossomas foi realizada utilizando-se concentrações crescentes do copolímero às preparações até observação de precipitação. A concentração máxima incorporada foi obtida quando se utilizou a relação molar aproximada de FSH:PLGA 40:0,085, como demonstra a tabela 3.

A não incorporação foi avaliada através da observação visual de um precipitado amarelo depositado no fundo do balão e visualização em microscópio óptico, onde se verificou uma estrutura aparentemente rígida e compacta do precipitado; já as preparações isentas de precipitação não apresentaram este tipo de estrutura.

O revestimento de lipossomas com PLGA tem como objetivo aumentar a estabilidade “*in vivo*”, bem como aumentar o tempo de liberação do fármaco para o meio externo.

Tabela 3. Preparações de lipossomas constituídos de FSH 40 mM com concentrações variadas de PLGA.

Experimento	Concentração de PLGA (mg/ml)	Relação Molar FSH:PLGA	Precipitação
1	0,345	40:0,0345	Não
2	0,690	40:0,069	Não
3	0,850	40:0,085	Não
4	1,380	40:0,138	Sim

Em se tratando de lipossomas, número de agregação pode ser definido como o número de moléculas de lipídio necessário para formar uma bicamada. O processo de agregação depende de alguns fatores como estrutura do lipídio, concentração, método de

preparo, entre outros. Porém, pode ser simplifcadamente calculado pela equação (GREGORIADIS, 1993):

$$\ln [CBC] = - 0,4 - 1,7n$$

Sendo:

n = número de carbonos da cadeia hidrofóbica

Supondo que todas as moléculas de FSH formem lipossomas, o número de agregação será:

$$\ln [CBC] = - 0,4 - 1,7 \times 17$$

$$[CBC] = 1,8844 \times 10^{-13} \text{ mol}$$

$$1 \text{ mol} \text{ ----- } 6,02214 \times 10^{23} \text{ moléculas}$$

$$1,8844 \times 10^{-13} \text{ mol} \text{ ----- } x$$

$$x = 11,3481 \times 10^{10} \text{ moléculas de FSH para formar 1 lipossoma unilamelar}$$

$$6,02214 \times 10^{23} \text{ moléculas} \text{ ----- } 750 \text{ g de FSH}$$

$$11,3481 \times 10^{10} \text{ moléculas} \text{ ----- } y$$

$$y = 1,41 \times 10^{-7} \text{ mg de FSH para formar 1 lipossoma unilamelar}$$

$$1,41 \times 10^{-7} \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ lipossoma unilamelar}$$

$$120 \text{ mg ou } 150 \text{ mg} \text{ ----- } z \text{ ou } w$$

$$z = 85,11 \times 10^7 \text{ lipossomas nas preparações lipossomais } 40 \text{ mM de FSH}$$

$$w = 106,38 \times 10^7 \text{ lipossomas nas preparações lipossomais } 50 \text{ mM de FSH}$$

Supondo-se ainda que todas as moléculas de PLGA da preparação revestirão os lipossomas, teremos:

$$1 \text{ molécula PLGA} \text{-----} 1,66053 \times 10^{-16} \text{ mg}$$

$$k \text{-----} 3,4 \text{ mg}$$

$$k = 2,05 \times 10^{16} \text{ moléculas de PLGA em cada preparação}$$

Dividindo-se no número de moléculas de PLGA pelo número de lipossomas presentes na preparação obteremos aproximadamente 24×10^6 e 19×10^6 moléculas de polímero revestindo 1 lipossoma unilamelar nas preparações de 40 e 50 mM de FSH, respectivamente.

Desta forma, os lipossomas polímero-revestidos tornam-se estericamente estabilizados (BERGSTRAND, 2003) e o fármaco, uma vez encapsulado, tem mais dificuldade para se difundir para o meio externo devido ao impedimento estérico originado na bicamada.

Para estudar possíveis alterações nas preparações lipossomais foram realizadas leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm a cada 30 minutos nas primeiras oito horas, aumentando-se o intervalo para 1 hora nas oito horas subseqüentes e, após, de 12 em 12 horas por 4 dias, sendo a última leitura realizada 9 dias após o preparo das amostras.

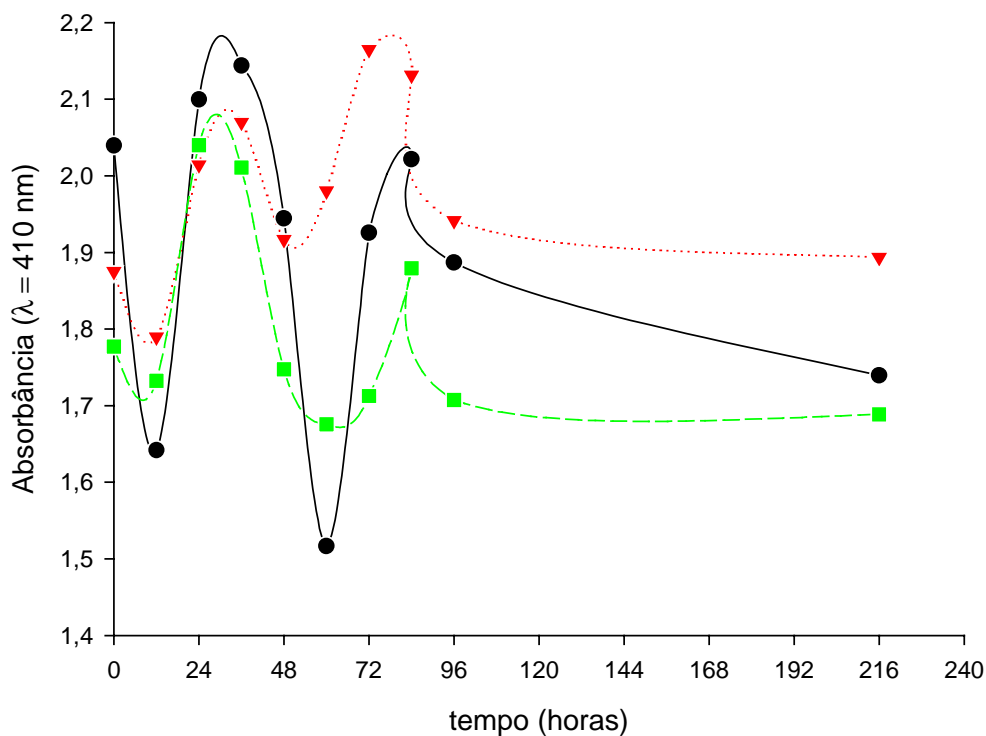


Figura 14. Estudo das alterações de lipossomas compostos por 40 mM de FSH, isentos de PLGA e diferentes concentrações do polímero. Monitoramento por espectrofotometria em 410 nm.

- Lipossomas contendo 40 mM FSH
- ▼ Lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,069 mM
- Lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM

Podem-se observar, de maneira indireta, modificações nos tamanhos das vesículas através do acompanhamento das preparações por espectrofotometria em períodos de tempo pré-determinados.

Verifica-se na figura 14 que os valores de turbidez do meio sofrem flutuações em torno dos valores de tempo iniciais. As flutuações diminuem de intensidade com o tempo e os valores de turbidez tendem aos valores iniciais em tempo infinito. Com isto podemos

concluir que não ocorrem variações significativas no tamanho dos lipossomas após a preparação.

Para se determinar a eficiência de encapsulação das preparações lipossomais foi necessário primeiramente separar o fármaco livre da fração encapsulada nos lipossomas. Para tanto, utilizou-se a cromatografia de exclusão em gel, sendo a fase estacionária constituída por Sephadex G-50.

Observa-se nas figuras 15 a 26 os perfis de separação das preparações lipossomais com diversas constituições, isentas de fármaco e contendo CIPRO. A eluição dos lipossomas pode ser observada no comprimento de onda de 410 nm (comprimento de onda de máxima absorção da FSH), enquanto que o CIPRO é visualizado em 271 nm.

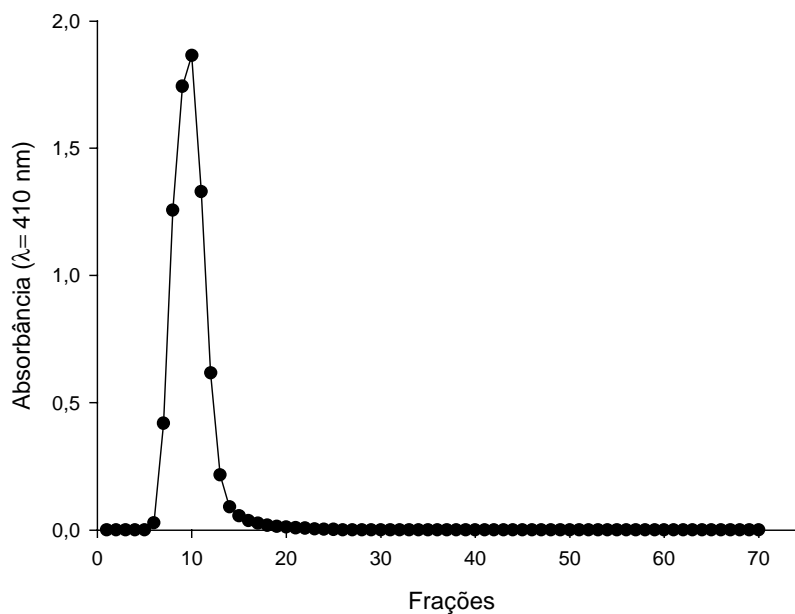


Figura 15. Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de 40 mM de FSH, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 410 nm.

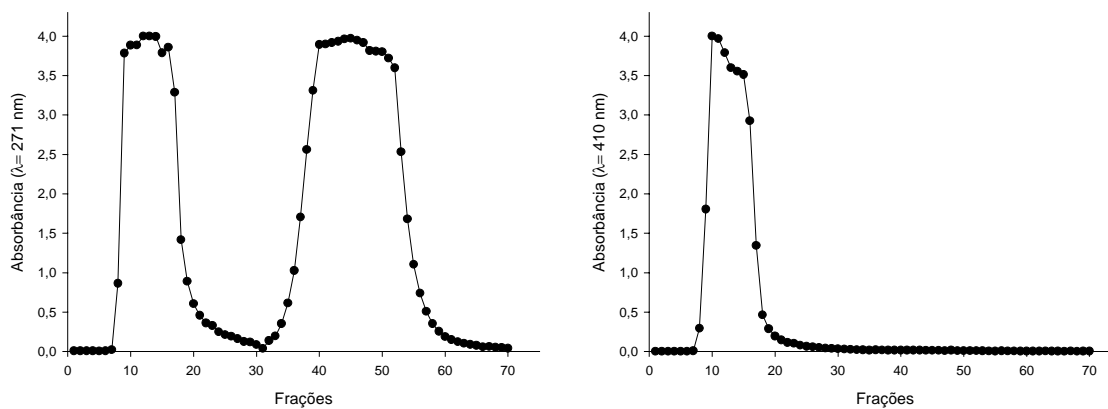


Figura 16. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 40:2,7 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

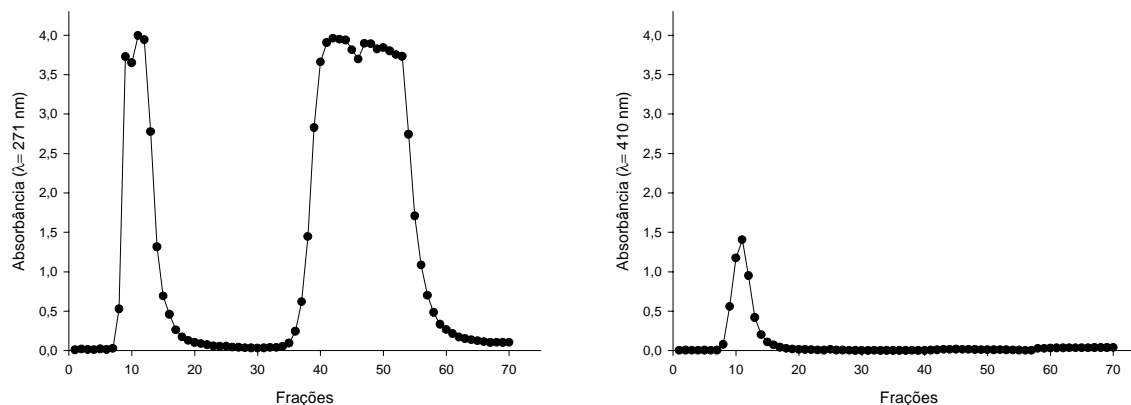


Figura 17. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 40:6,8 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

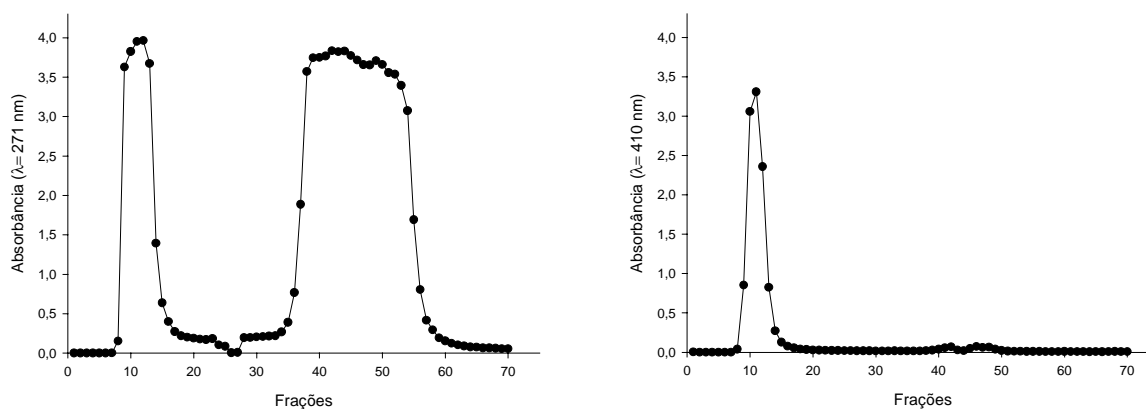


Figura 18. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 40:13,6 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

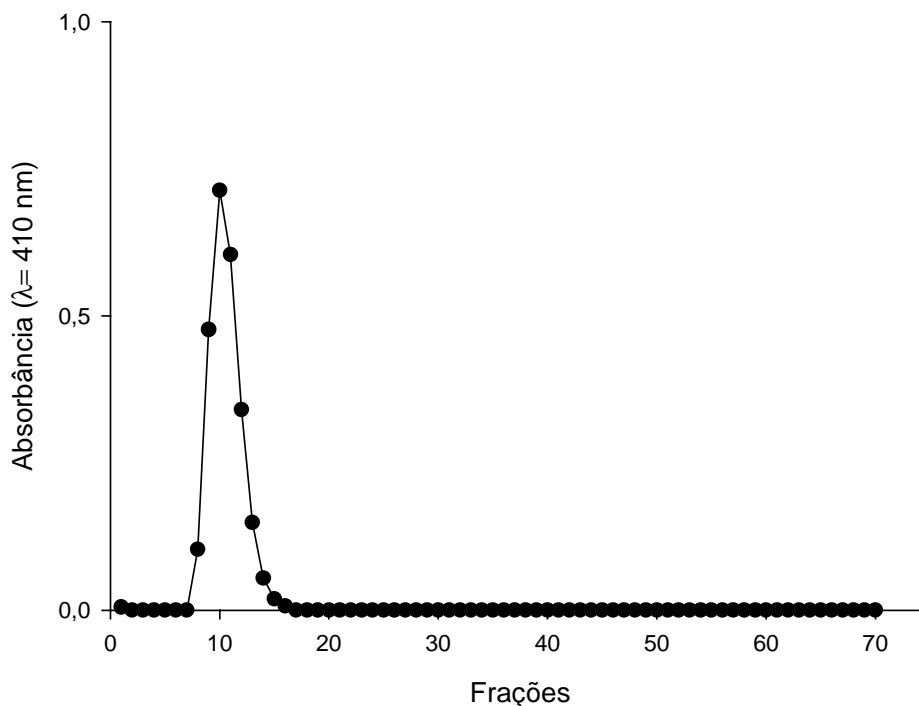


Figura 19. Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de FSH:PLGA 40:0,085 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 410 nm.

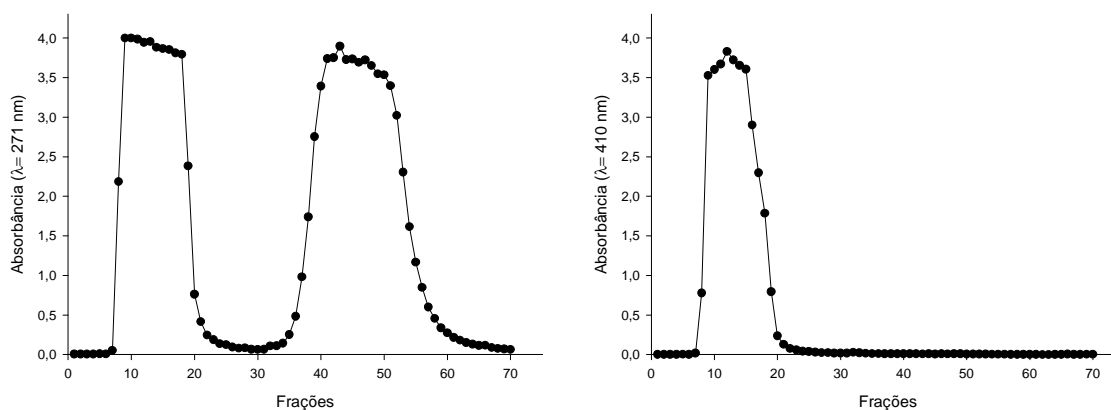


Figura 20. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO:PLGA 40:2,7:0,085 mM utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

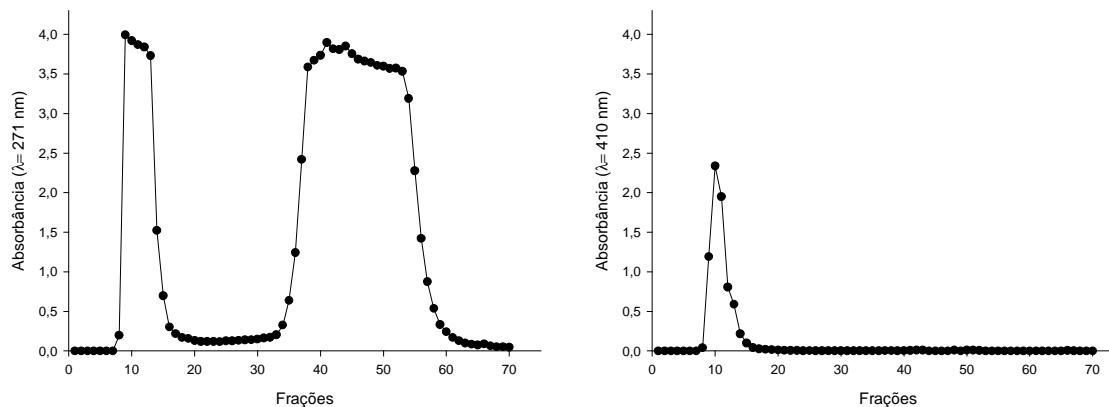


Figura 21. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO:PLGA 40:6,8:0,085 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

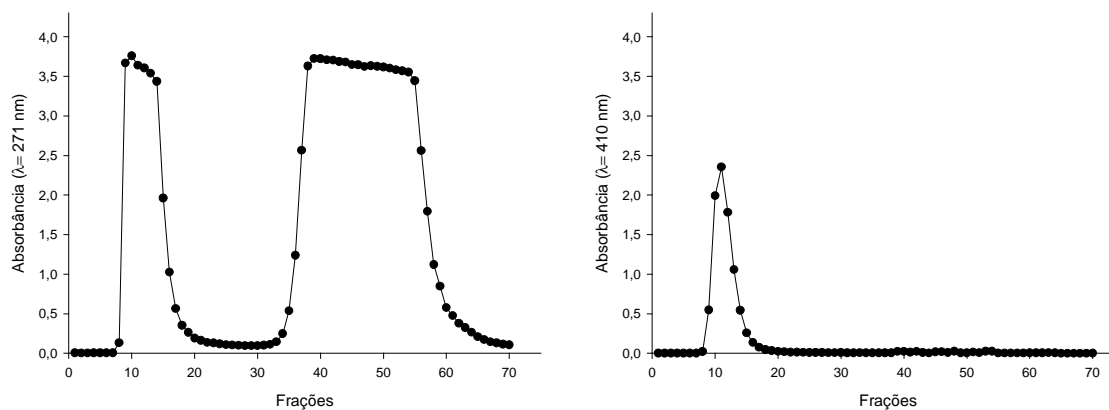


Figura 22. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO:PLGA 40:13,6:0,085 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

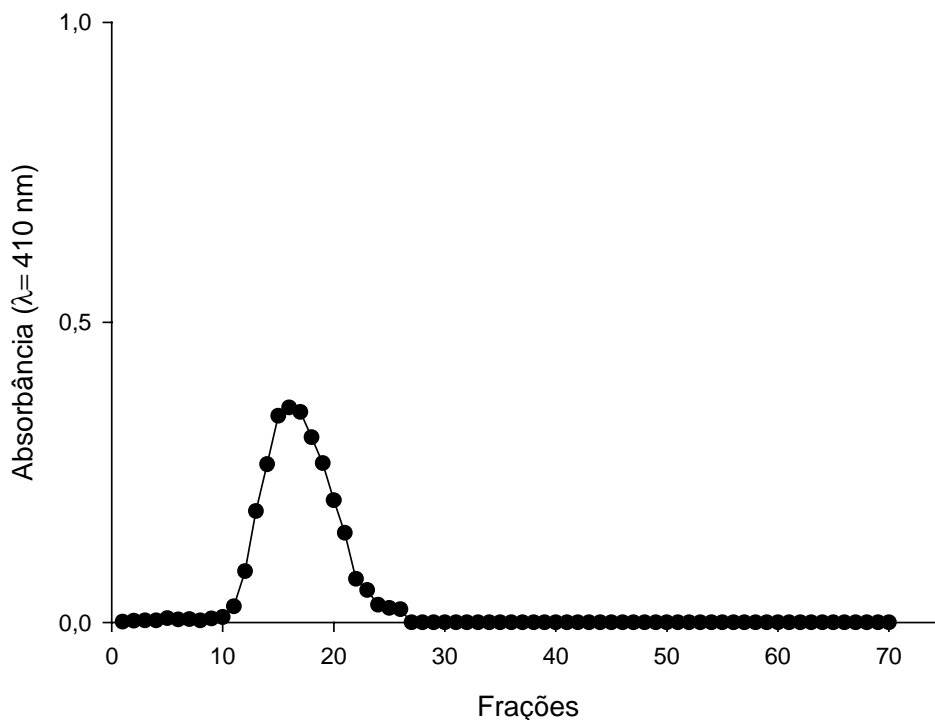


Figura 23. Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de 50 mM de FSH, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 410 nm.

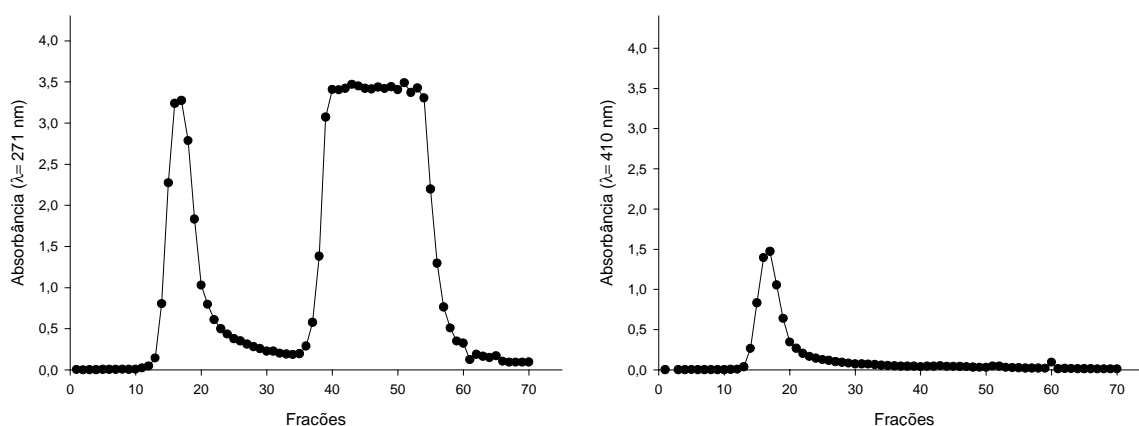


Figura 24. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO 50:13,6 mM , utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

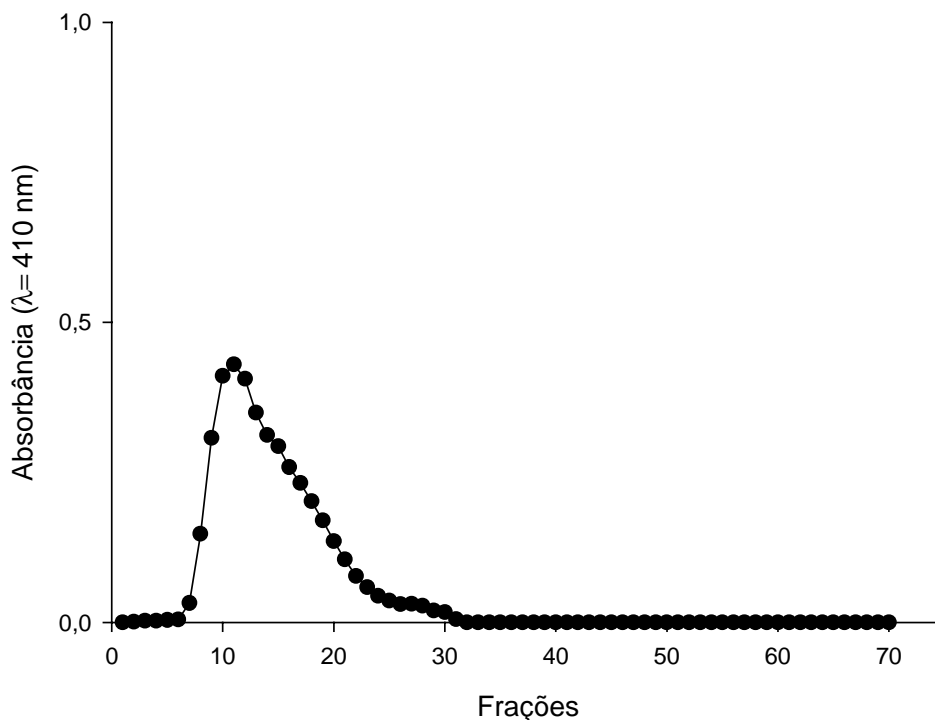


Figura 25. Perfil de eluição de lipossomas unilamelares vazios compostos de FSH:PLU 40:7,9 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 410 nm.

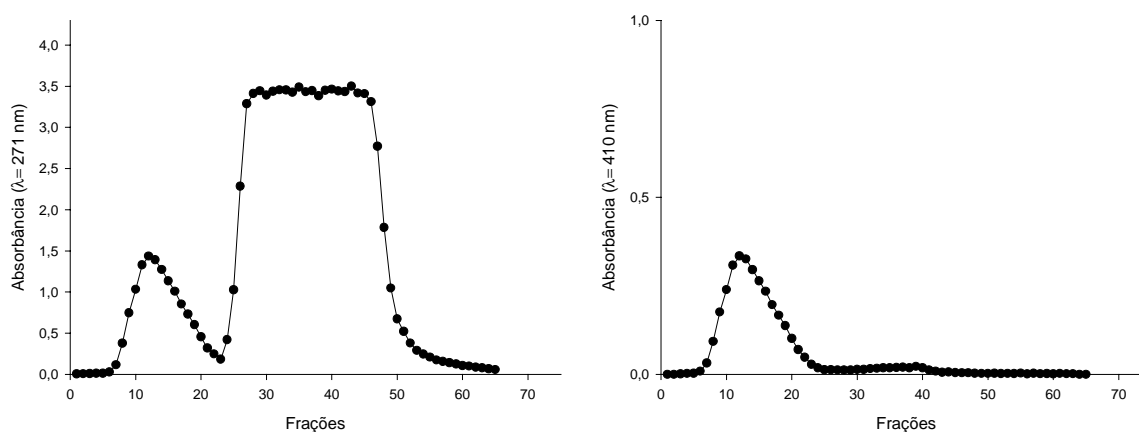


Figura 26. Perfil de separação de lipossomas unilamelares compostos de FSH:CIPRO:PLU 40:13,6:7,9 mM, utilizando coluna de Sephadex G-50 saturada com lipossomas isentos de fármaco e tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2 como eluente. Monitoramento da eluição por espectrofotometria em 271 e 410 nm.

Através da observação dos cromatogramas, foi possível reunir as frações contendo lipossomas e lipossomas carregados de fármaco e liofilizá-las para determinação da eficiência de encapsulação.

A cromatografia de exclusão em gel utilizando Sephadex G-50 mostrou-se eficiente na separação do fármaco não encapsulado e lipossomas com fármacos para todas as preparações.

Para determinação da eficiência de encapsulação das preparações de lipossomas foram realizados os seguintes procedimentos:

- liofilização das frações contendo lipossomas com fármaco eluídas da coluna de separação;
- determinação da massa total do liofilizado;
- rompimento das vesículas utilizando-se metanol e 10 mg do liofilizado;
- determinação da absorbância das amostras contendo fármaco, utilizando-se como branco os lipossomas isentos de fármaco submetidos ao mesmo tratamento;
- determinação da concentração de CIPRO (X mg/mL) através da equação obtida na curva analítica do CIPRO em metanol (figura 12);

X mg ----- 1 mL

Y ----- volume utilizado para romper as vesículas

Y mg ----- 10 mg liofilizado

Z ----- massa total do liofilizado

Z mg ----- 2,0 mL de dispersão de lipossomas aplicados na coluna

W ----- 4,0 mL de dispersão de lipossomas preparados

Uma vez determinada a massa de fármaco encapsulada pelos lipossomas (W), calculou-se a eficiência de encapsulação (EE) segundo Imura et al. (2002):

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

Tabela 4. Eficiência de encapsulação das preparações de lipossomas 40 mM isentos de polímero e diferentes concentrações de fármaco; preparações contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e diferentes concentrações de fármaco; preparações contendo FSH:CIPRO 40:13,6 mM e FSH:CIPRO:PLU 40:13,6:7,9 mM. Determinada através das respectivas absorbâncias em 282 nm.

Composição da Preparação de Lipossomas	Massa Adicionada (mg)	Massa Recuperada (mg)	Eficiência de Encapsulação (%)	Desvio Padrão
FSH:CIPRO 40:2,7 mM	4,0	$6,23 \times 10^{-2}$	1,6	0,05
FSH:CIPRO 40:6,8 mM	10,0	$31,20 \times 10^{-2}$	3,1	0,08
FSH:CIPRO 40:13,6 mM	20,0	$60,12 \times 10^{-2}$	3,0	0,06
FSH:CIPRO:PLGA 40:2,7:0,085 mM	4,0	$16,40 \times 10^{-2}$	4,1	0,06
FSH:CIPRO:PLGA 40:6,8:0,085 mM	10,0	$49,83 \times 10^{-2}$	5,0	0,08
FSH:CIPRO:PLGA 40:13,6:0,085 mM	20,0	$115,80 \times 10^{-2}$	5,8	0,09
FSH:CIPRO 50:13,6 mM	20,0	$64,00 \times 10^{-2}$	3,2	0,11
FSH:CIPRO:PLU 40:13,6:7,9 mM	20,0	$112,02 \times 10^{-2}$	5,6	0,09

Na tabela 4 observa-se que a eficiência de encapsulação de fármaco aumentou com sua concentração da preparação, sendo que preparações contendo PLGA apresentaram eficiência de encapsulação maior do que aquelas isentas de polímero. A presença de PLU

teve uma influência semelhante ao PLGA na eficiência de encapsulação, enquanto que o aumento da concentração de FSH não foi suficiente para ocasionar aumento significativo da encapsulação. Desta forma, podemos concluir que tanto PLGA quanto PLU auxiliaram a captura de fármaco pelos lipossomas.

O índice de refração das preparações lipossomais foi determinado antes de submetê-las à análise por espalhamento de luz. Foram realizadas 3 análises de índice de refração para cada tipo de preparação e feita a média. Na tabela 5 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 5. Valores de índice de refração das diversas preparações de lipossomas obtidos a partir de determinações realizadas em refratômetro Abbé a 20 °C e utilizando-se água deionizada como padrão.

Composição da preparação	Índice de Refração
Água	1,333 ± 0,001
FSH 40 mM	1,335 ± 0,001
FSH 50 mM	1,337 ± 0,001
FSH:PLGA 40:0,085 mM	1,335 ± 0,001
FSH:PLU 40:7,9 mM	1,352 ± 0,001
FSH:CIPRO 40:2,7 mM	1,335 ± 0,001
FSH:CIPRO 40:6,8 mM	1,335 ± 0,001
FSH:CIPRO 40:13,6 mM	1,336 ± 0,001
FSH:CIPRO:PLGA 40:2,7:0,085 mM	1,335 ± 0,001
FSH:CIPRO:PLGA 40:6,8:0,085 mM	1,335 ± 0,001
FSH:CIPRO:PLGA 40:13,6:0,085 mM	1,336 ± 0,001
FSH:CIPRO 50:13,6 mM	1,336 ± 0,001
FSH:CIPRO:PLU 40:13,6:7,9 mM	1,353 ± 0,001

A técnica de espalhamento dinâmico de luz baseia-se nas flutuações das concentrações locais de partículas, devidas aos movimentos Brownianos (HELDT et al., 2001; SANTOS e CASTANHO, 1996). Nos estudos com espalhamento dinâmico de luz utilizam-se volumes de dispersão reduzidos e os tempos de análise são de microsegundos (SANTOS e CASTANHO, 1996).

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

Na tabela 6 estão relacionadas as preparações lipossomais e seus respectivos diâmetros, índices de polidispersidade e coeficientes de difusão.

Tabela 6. Resultado das análises realizadas por espalhamento dinâmico de luz.

As preparações foram diluídas na proporção de 1:20 (V/V) em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2.

Composição da preparação de lipossomas	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade	Coefficiente Difusão (cm ² /s)
FSH 40 mM	83,9	0,191	5,1084 e ⁻⁸
FSH 50 mM	392,2	0,276	1,0928 e ⁻⁸
FSH:PLGA 40:0,085 mM	93,3	0,243	4,5938 e ⁻⁸
FSH:PLU 40:7,9 mM	68,9	0,215	6,2206 e ⁻⁸
FSH:CIPRO 40:2,7 mM	260,0	0,285	1,6485 e ⁻⁸
FSH:CIPRO 40:6,8 mM	149,2	0,286	2,8726 e ⁻⁸
FSH:CIPRO 40:13,6 mM	84,4	0,235	5,0782 e ⁻⁸
FSH:CIPRO:PLGA 40:2,7:0,085 mM	159,0	0,164	2,6956 e ⁻⁸
FSH:CIPRO:PLGA 40:6,8:0,085 mM	95,9	0,186	4,4692 e ⁻⁸
FSH:CIPRO:PLGA 40:13,6:0,085 mM	75,6	0,208	5,6693 e ⁻⁸
FSH:CIPRO 50:13,6 mM	147,4	0,283	2,9077 e ⁻⁸
FSH:CIPRO:PLU 40:13,6:7,9 mM	64,3	0,175	6,6666 e ⁻⁸

O índice de polidispersidade é a medida para a faixa de distribuição de tamanho de partículas (MULLER et al., 2004). Na tabela 6 podem ser observados os valores de polidispersidade encontrados para as preparações de lipossomas, os quais foram relativamente baixos, indicando uma boa distribuição de tamanho dos lipossomas.

O coeficiente de difusão foi calculado utilizando-se a equação de Einstein-Stokes. Uma vez que a temperatura é constante, quanto maior o tamanho da partícula, menor seu coeficiente de difusão e, portanto, menor a quantidade de vesículas que passa por unidade de área num determinado tempo.

Conforme pode ser observado na figura 27, ocorreu ligeira redução no tamanho das vesículas quando se incorporou PLGA e PLU aos lipossomas. Esta diminuição pode ser devida à interação entre as moléculas de FSH e as moléculas do polímero, o que levaria a uma modificação no parâmetro de empacotamento da bicamada lipídica e consequentemente à formação de lipossomas menores (ISRAELACHVILI et al. 1976; SCHUTZE e MULLER-GOYMANN, 1998; EL JASTIMI et al., 1999; MULLER et al., 2004).

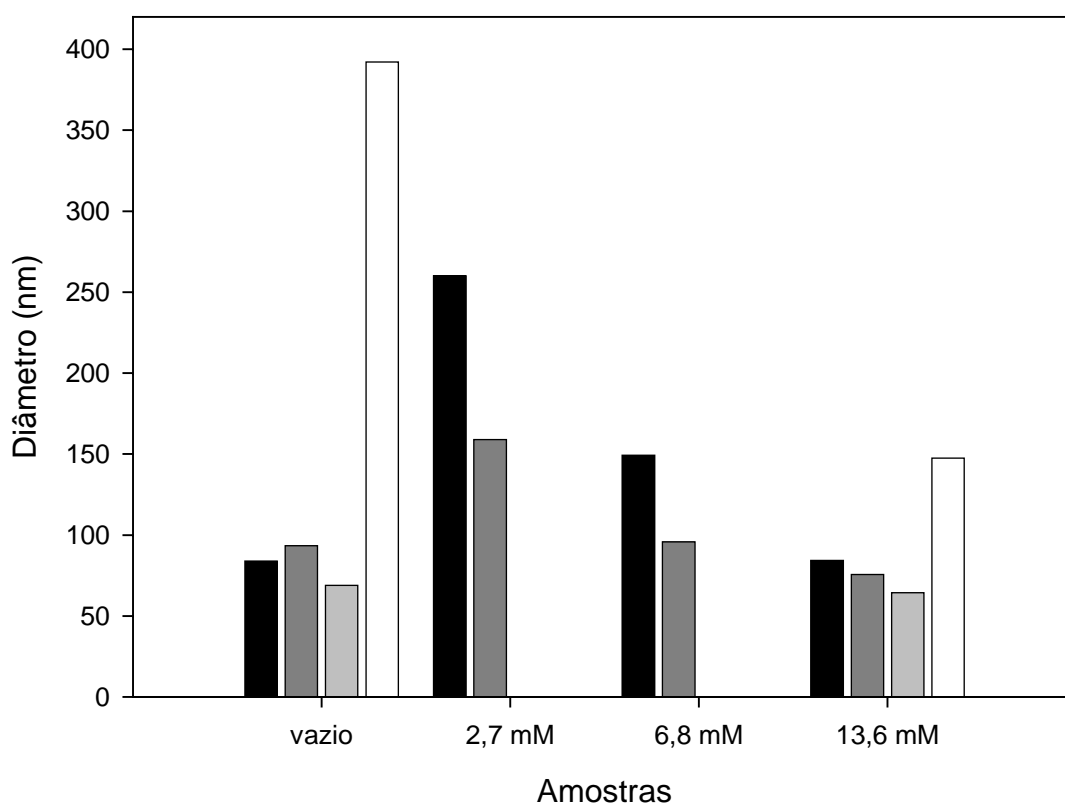


Figura 27. Análises realizadas por espalhamento de luz para determinação do diâmetro médio de lipossomas contendo FSH 40 mM (■), lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM (■), lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM (■), lipossomas contendo FSH 50 mM (□). As preparações foram diluídas na proporção de 1:20 (V/V) em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2.

O aumento de tamanho das vesículas carregadas com fármaco em relação às vesículas vazias pode ser explicado devido ao volume ocupado pelo fármaco.

Porém com o aumento da concentração do fármaco, ocorreu uma redução relativa do diâmetro dos lipossomas.

Através de estudos realizados por $^1\text{H-NMR}$, MAURER e colaboradores, 1998, concluíram que apenas uma pequena proporção de CIPRO localiza-se na bicamada lipídica (aproximadamente 3%). O fármaco, porém, não permanece estático e se desloca para fora e para dentro da membrana mantendo um equilíbrio dinâmico. CIPRO teria, como outros compostos anfífilicos, propriedades ativas na superfície e deve, portanto, induzir mudanças em fosfolipídios neutros, como a fosfatidilcolina de soja (HERNÁNDEZ-BORRELL e MONTERO, 2003). Desta forma, esta pequena fração de CIPRO estaria interagindo com os grupos trimetilamônio positivamente carregados da molécula da fosfatidilcolina de soja, alterando os parâmetros de empacotamento da bicamada lipídica e reduzindo o tamanho das vesículas (MULLER et al., 2004; ISRAELACHVILI et al., 1976). Além destas possibilidades estão o deslocamento da água de hidratação da fosfatidilcolina de soja devido a interações entre as suas moléculas e o fármaco assim como uma diminuição no pH que ocorre com a incorporação de fármaco, (MULLER et al., 2004), o que levaria a uma interação eletrostática do fármaco com a bicamada. Isto porque enquanto microespécies neutras e zwitteriônicas predominam em pH neutro, microespécies positivas predominam em pH ácido, sendo que somente as microespécies sem carga podem difundir através da bicamada lipídica (MONTERO et al., 1996) e somente as microespécies carregadas podem interagir eletrostaticamente com a bicamada (HERNÁNDEZ-BORRELL e MONTERO, 2003).

O elevado diâmetro médio obtido para lipossomas vazios constituídos por 50 mM de fosfatidilcolina de soja poderia ser explicado pelo fato de que o espalhamento de luz I é proporcional a d^6 (diâmetro partícula); assim, mesmo uma pequena população de vesículas

grandes oligolamelares que presumivelmente existe nos sistemas livres de fármaco, leva a um forte aumento em *I*. Então, a média aumenta, porque é medida pela intensidade. Este efeito é a razão para a diminuição no tamanho da partícula de sistemas lipossomais carregados de fármaco, nos quais somente vesículas unilamelares pequenas em uma distribuição relativamente estreita existem (MULLER et al., 2004).

O ensaio de liberação *in vitro* do CIPRO nas diferentes formulações foi realizado através da quantificação de fármaco presente no meio receptor após atravessar a membrana de acetato de celulose.

Em intervalos de tempo determinados foram coletadas amostras e estas analisadas por espectrofotometria em 271 nm. O tempo total de experimento foi de 720 minutos, sendo que a partir de 360 minutos a liberação de fármaco praticamente cessou. Todas as amostras foram analisadas contra seus respectivos brancos, submetidos ao mesmo processo de liberação *in vitro*. Os valores das médias das absorbâncias medidas para os brancos, nos mesmos intervalos de tempo, foram subtraídos dos valores médios de absorbância das amostras contendo fármaco e aplicados na equação da reta obtida através da curva padrão do CIPRO (figura 13) a fim de se determinar a massa real de CIPRO liberada em função do tempo. Sendo os experimentos realizados em triplicata.

Para os ensaios de liberação *in vitro* foram utilizadas as seguintes amostras:

- Solução de CIPRO livre 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH 40 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH 50 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL;
- Solução de PLU 7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL.

Para todos os experimentos as condições foram: T °C = 37±1; Meio receptor: tampão tris-HCl 10 mM pH 7,2; Volume aplicado: 0,2 mL (equivalente a 1 mg de fármaco).

Os perfis de liberação *in vitro* do CIPRO podem ser observados através do gráfico da concentração de CIPRO no meio receptor (mg/mL) em função do tempo (minutos) para cada uma das preparações utilizadas no experimento (figuras 29-32).

Para comparação dos valores obtidos no ensaio de liberação *in vitro* do CIPRO nas diversas formulações foram determinadas as áreas sob a curva (AUC) pelo método do trapezóide a partir da curva de liberação de cada uma das replicatas das amostras. Essas determinações foram utilizadas no teste de variância ANOVA para comparação do perfil de liberação entre as formulações, associado à comparação múltipla entre os resultados (“teste de Tukey-Kramer”) com significância de $p < 0,05$ e estão ilustrados na figura 28. Os valores da AUC encontrados estão dispostos na tabela 7.

Tabela 7: Área sob a curva (AUC) determinada pelo método do trapezóide a partir da curva de liberação de cada uma das replicatas das amostras

Amostras	Determinação - AUC	
	Média	Desvio padrão
Solução de CIPRO livre 5 mg/mL	5,4371	0,4254
Lipossomas contendo FSH 40 mM e CIPRO 5 mg/mL	4,5834	0,3054
Lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL	4,0309	0,0747
Lipossomas contendo FSH 50 mM e CIPRO 5 mg/mL	4,6504	0,0765
Lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL	4,3045	0,0055
Solução de CIPRO 5 mg/mL e PLU 7,9 mM	4,4395	0,1019

Analisando-se a figura 28 é possível comparar as AUC de cada uma das replicatas das amostras. Os círculos representativos indicam que quanto menor a sobreposição maior é a diferença entre as preparações.

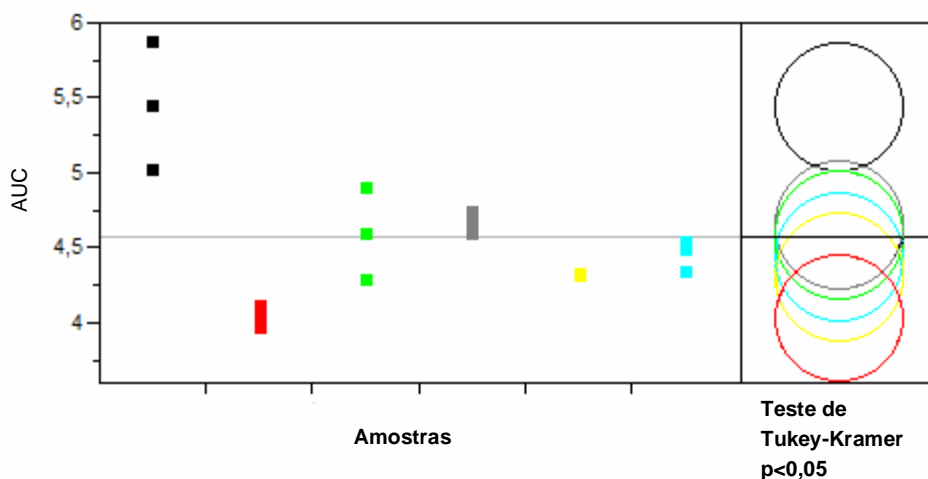


Figura 28: Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC obtidos a partir do experimento de liberação *in vitro* para solução de CIPRO livre 5 mg/mL (■), lipossomas contendo FSH 40 mM e CIPRO 5 mg/mL (■), lipossomas contendo FSH 50 mM e CIPRO 5 mg/mL (■), lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL (■), lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL (■), solução de CIPRO 5 mg/mL e PLU 7,9 mM (■).

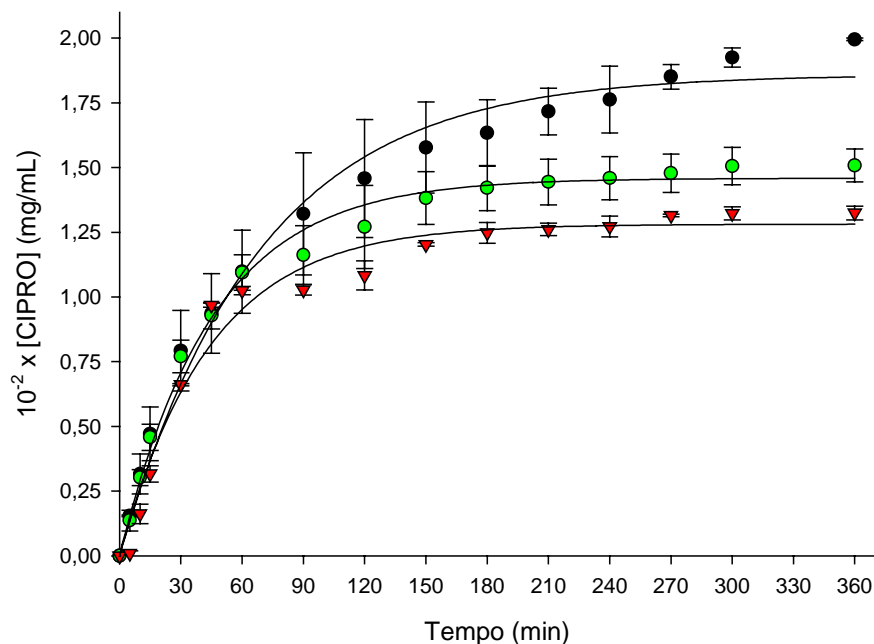


Figura 29. Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL (●), lipossomas contendo FSH 40 mM e CIPRO 5 mg/mL (●) e lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL (▼).

Os resultados apresentados na figura 29 e sua análise estatística permitiram a comparação do perfil de liberação do fármaco não encapsulado com o perfil de liberação do fármaco encapsulado em lipossomas e em lipossomas revestidos com PLGA carregados com fármaco na mesma concentração. Ambas as amostras de lipossomas apresentaram velocidade de liberação menor que o fármaco livre. A presença de polímero na preparação lipossomal proporcionou diminuição da velocidade de liberação em relação à preparação isenta de PLGA a partir de 3 horas e meia após iniciado o ensaio. Este fato sugere que o polímero foi incorporado na bicamada lipídica, diminuindo a permeabilidade e dificultando a saída do fármaco do interior da estrutura para o meio de dissolução.

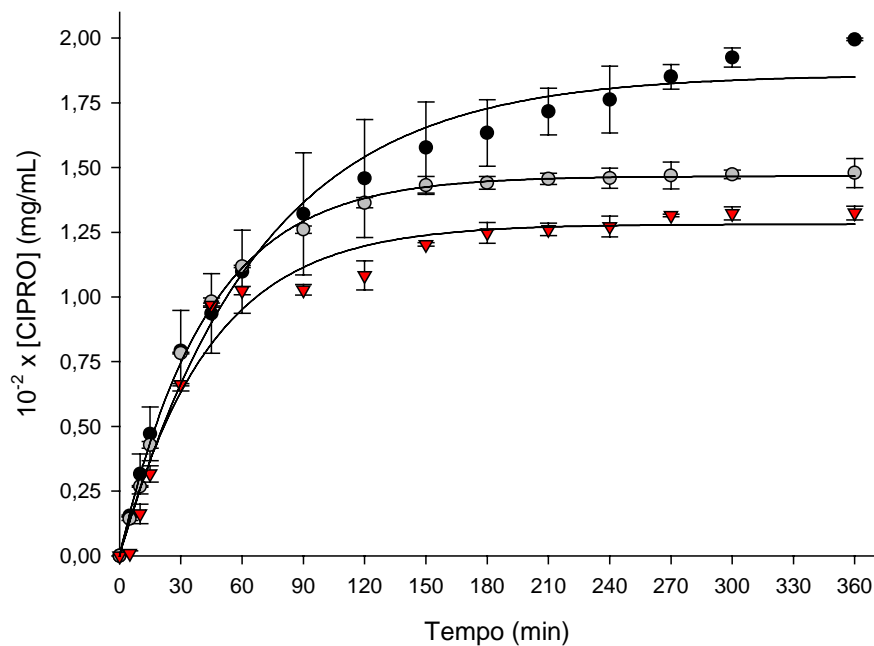


Figura 30. Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL (●), em lipossomas contendo FSH 50 mM e CIPRO 5 mg/mL (○) e lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL (▼).

O aumento da concentração molar de FSH (figura 30) diminuiu significativamente a velocidade de liberação do fármaco a partir dos lipossomas quando comparado ao fármaco livre. Porém, a velocidade de liberação da preparação de lipossomas 50 mM ainda é significativamente maior que a velocidade de liberação da preparação de lipossomas contendo PLGA, reforçando a hipótese de que o polímero está revestindo as vesículas, retardando, deste modo, a difusão do antibiótico para o meio de dissolução.

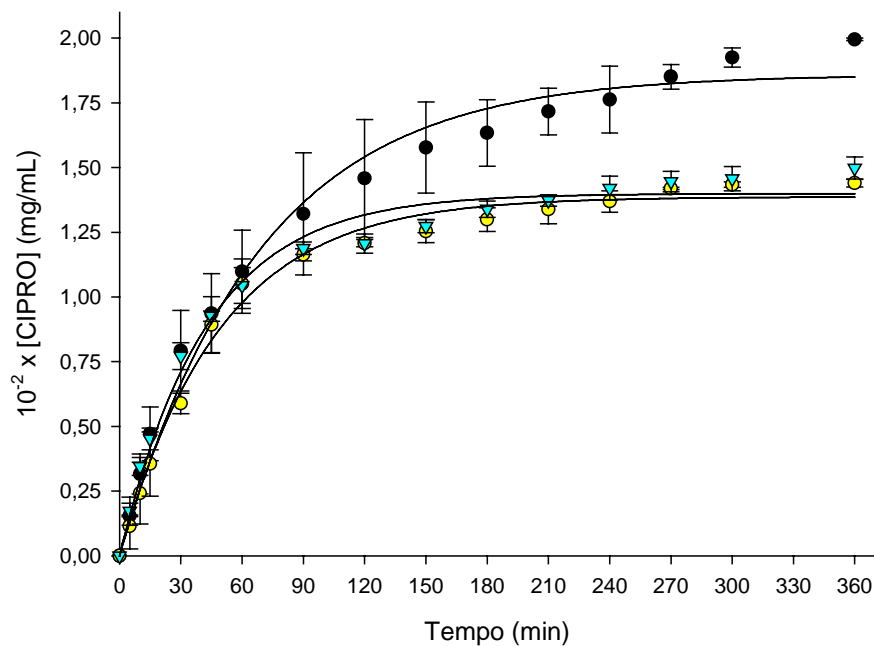


Figura 31. Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL (●), solução de PLU 7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL (▼) e em lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL (●).

A amostra contendo fármaco livre apresentou velocidade de liberação maior que o fármaco veiculado em gel de PLU e encapsulado em lipossomas veiculados em gel de PLU (figura 31). Não foram identificadas diferenças significativas na velocidade de liberação do CIPRO nessas condições experimentais sugerindo que a fase gel do PLU é o fator determinante na liberação *in vitro*.

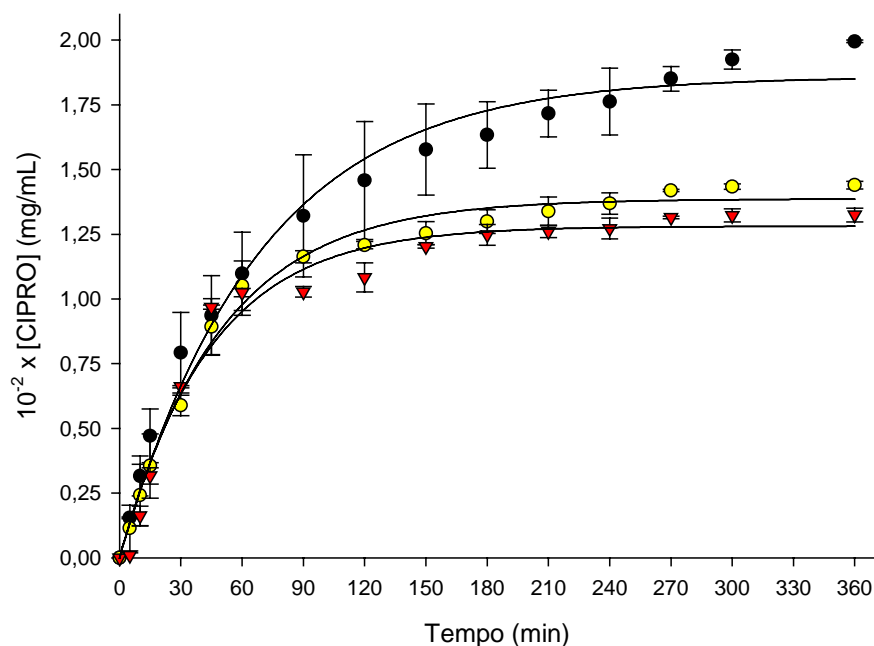


Figura 32. Perfil de liberação *in vitro* de CIPRO livre 5 mg/mL (●), em lipossomas contendo FSH:PLGA 40:0,085 mM e CIPRO 5 mg/mL (●) e lipossomas contendo FSH:PLU 40:7,9 mM e CIPRO 5 mg/mL (▼).

Quando se comparou a preparação de lipossomas contendo PLGA e a preparação de lipossomas contendo PLU, ambos com fármaco na mesma concentração, pode-se observar uma menor velocidade de liberação para a preparação de lipossomas contendo PLGA (figura 32), porém esta diferença passa a ser estatisticamente significativa somente após 6 horas de liberação.

Na representação esquemática do processo de liberação *in vitro* (figura 33), K_0 representa a velocidade de liberação de CIPRO a partir das vesículas lipossomais para o meio externo. O fármaco foi liberado através do processo de difusão e, quando no meio dispersante, atravessou a membrana polimérica atingindo o meio receptor. Observou-se em todos os perfis de liberação *in vitro*, que a velocidade de passagem do antibiótico através

da membrana (K) foi maior que a velocidade de saída dos lipossomas (K_0). Sendo, portanto, K_0 menor que K podemos concluir que a velocidade de saída do fármaco dos lipossomas foi o fator limitante da liberação.

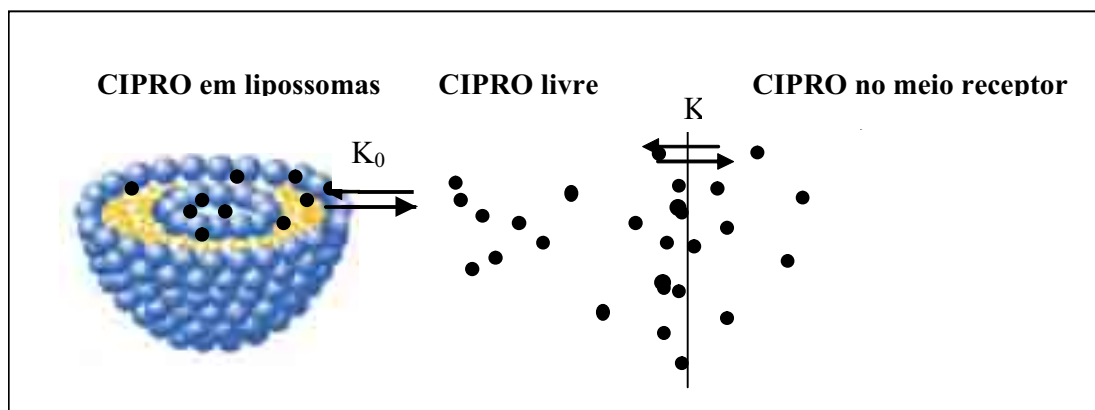


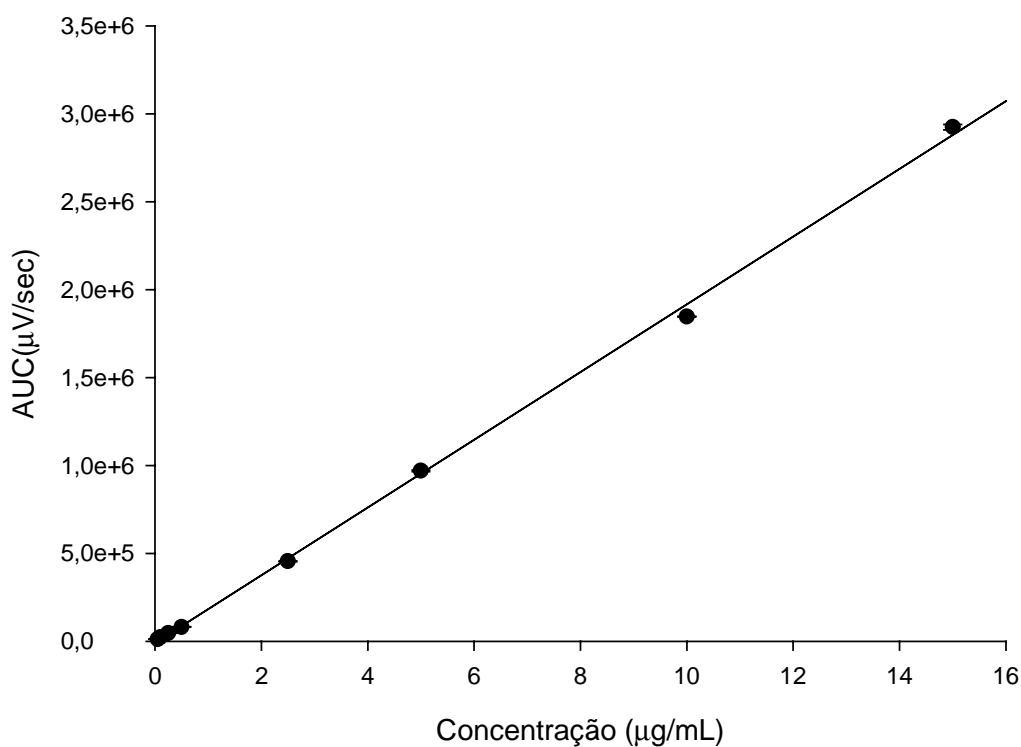
Figura 33. Representação esquemática do processo de liberação *in vitro*.

Com o objetivo de melhor avaliar o sistema de liberação desenvolvido, foi selecionada uma amostra de lipossomas para determinação da biodisponibilidade ocular do CIPRO. O ensaio de liberação *in vivo* foi realizado em triplicata através da aplicação subconjuntival de 0,2 mL das preparações de fármaco livre 5 mg/mL e lipossomas contendo FSH:PLGA:PLU na proporção 40:0,085:9,9 mM e CIPRO 5 mg/mL (lipo CIPRO) em coelhos albinos.

A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo os valores das áreas sob a curva aplicados na equação da reta obtida através da curva analítica conforme apresentado na tabela 8 e na figura 34 para determinação da concentração de CIPRO no HV e HA.

Tabela 8. Valores das áreas de CIPRO em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4.

Concentração (µg/mL)	n ₁	n ₂	n ₃	Média	Desvio Padrão	Coefficiente variação%
0,05	11969	12198	11867	12011,33	169,5	1,41
0,10	22962	22872	23554	23129,33	370,52	1,60
0,25	46522	47312	47241	47025,00	437,05	0,93
0,50	81644	82124	81005	81591,00	561,38	0,69
2,50	452932	456015	456216	455054,3	1840,70	0,40
5,0	964950	969125	973905	969326,7	4480,91	0,46
10,0	1845491	1849559	1845595	1846882	2319,22	0,13
15,0	2909479	2925085	2940092	2924884	15309,99	0,52

**Figura 34.** Curva analítica do CIPRO em tampão tris-HCl 10 mM pH 7,4.

$$\text{Área} = 192645,93 \cdot [\text{CIPRO}] - 9308,89, r^2 = 0,999$$

Na figura 35 pode-se observar o perfil biodisponibilidade do CIPRO livre e encapsulado em lipossomas no HA durante 7 dias de experimento.

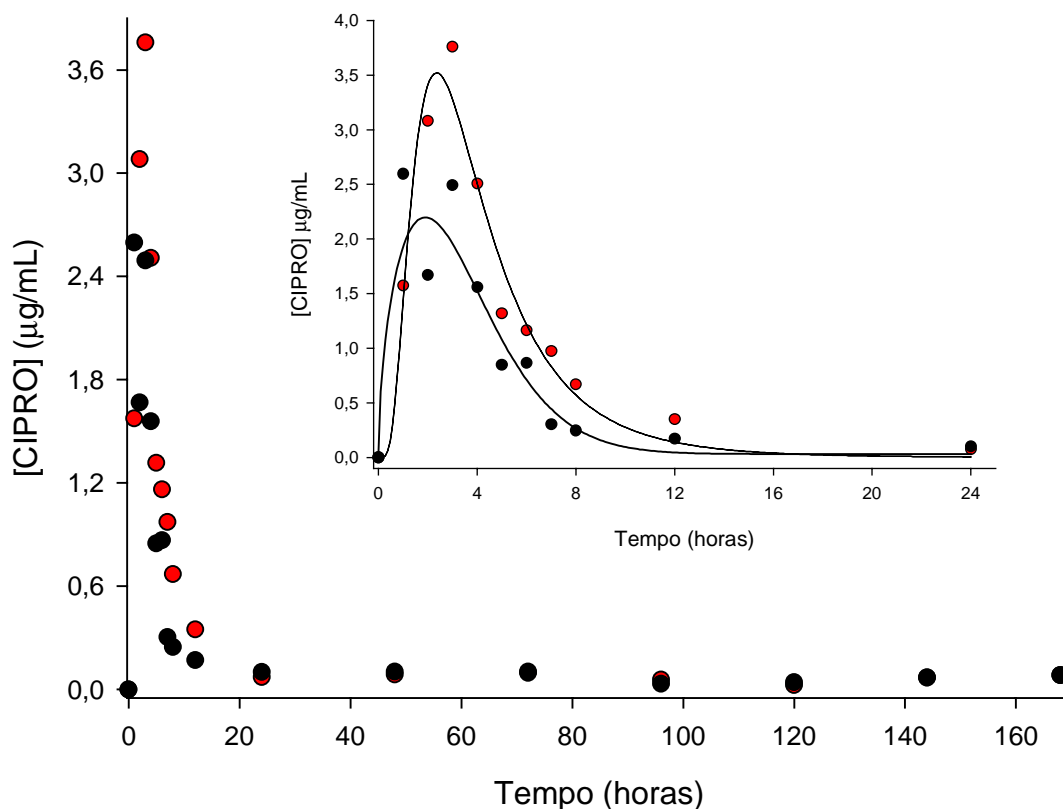


Figura 35. Quantificação de CIPRO nas amostras de HA em função do tempo para as preparações de CIPRO livre 5 mg/mL (●) e lipo CIPRO (●).

Para comparação das amostras de CIPRO livre e CIPRO encapsulado em lipossomas no HA foram determinadas as áreas sob a curva (AUC) pelo método do trapezóide a partir do gráfico da concentração do fármaco em função do tempo (figura 35). Essas determinações foram utilizadas no teste t-Student para análise estatística dos resultados, com significância de $p < 0,05$.

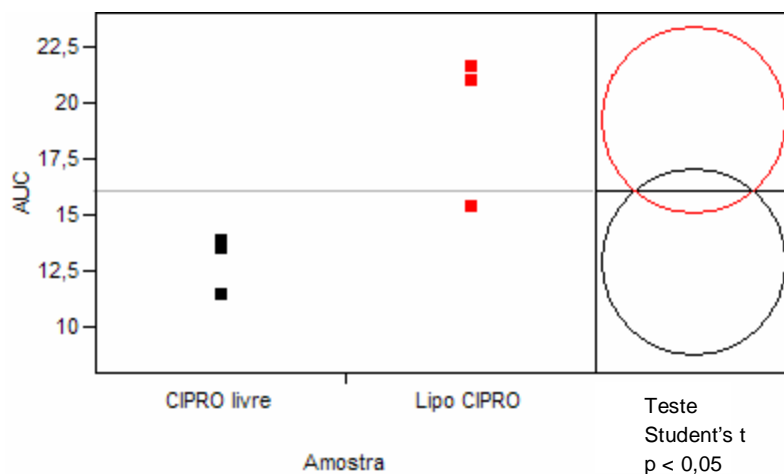


Figura 36: Ilustração da análise estatística pelo teste t-Student aplicada aos resultados de AUC obtidos a partir do HA para solução de CIPRO livre 5 mg/mL (■) e lipo CIPRO (■) nas primeiras 24 horas de ensaio.

A análise estatística representada na figura 36 mostrou que as amostras de HA de CIPRO livre e CIPRO encapsulado em lipossomas apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando aplicado o teste t-Student com significância de $p < 0,05$ nas primeiras 24 horas de ensaio. Após este período não houve diferença estatisticamente significativa entre a amostra de CIPRO livre e lipo CIPRO.

Na figura 37 pode-se observar o perfil biodisponibilidade do CIPRO livre e encapsulado em lipossomas no HV durante 7 dias de experimento.

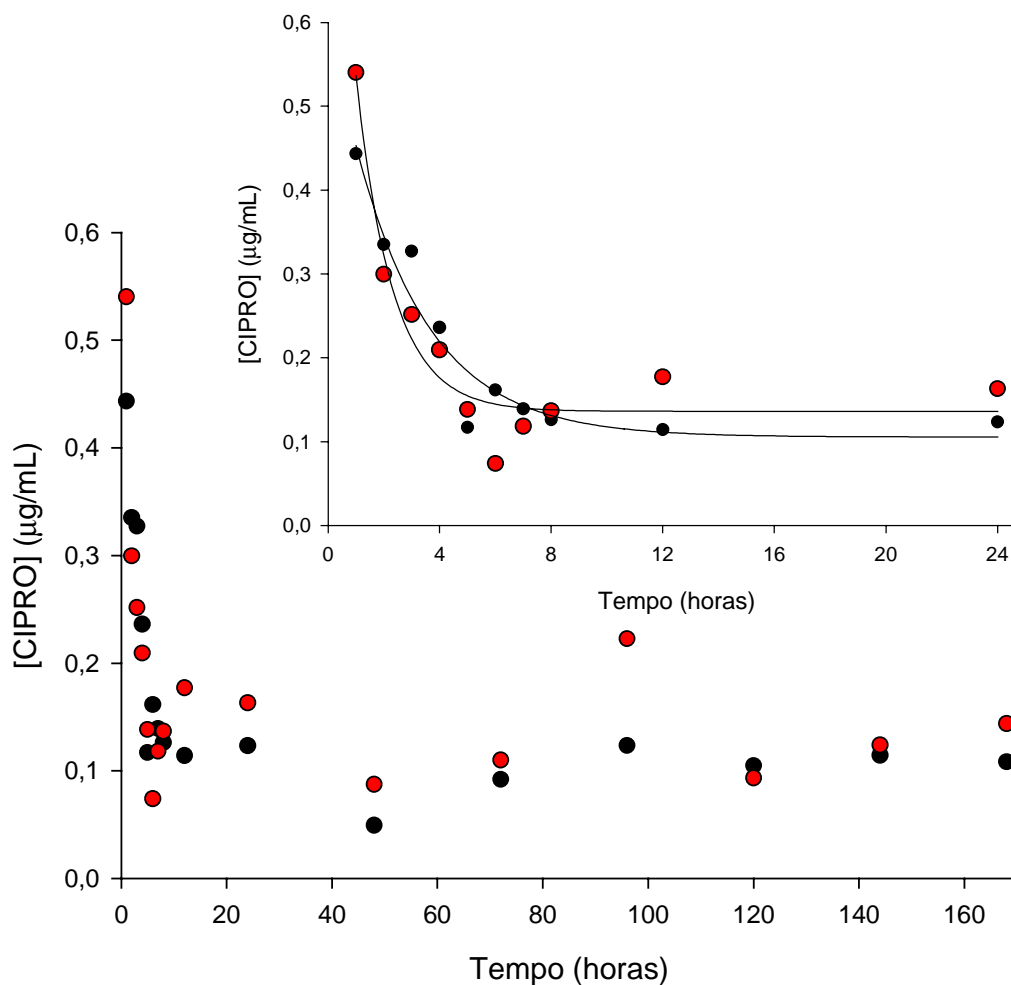


Figura 37. Quantificação de CIPRO nas amostras de HV em função do tempo para as preparações de CIPRO livre 5 mg/mL (●) e lipo CIPRO (●).

Para comparação das amostras de CIPRO livre e CIPRO encapsulado em lipossomas no HV foram determinadas as áreas sob a curva (AUC) pelo método do trapezóide a partir do gráfico da concentração do fármaco em função do tempo (figura 37). Essas determinações foram utilizadas no teste t-Student para análise estatística dos resultados, com significância de $p < 0,05$, e estão ilustradas na figura 38.

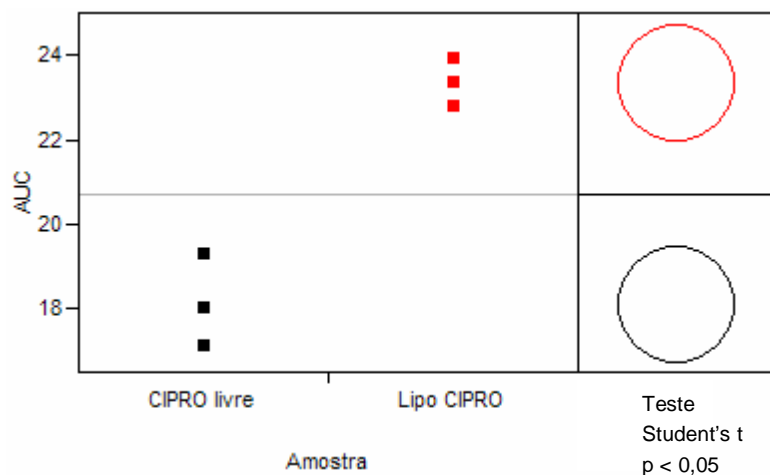


Figura 38: Ilustração da análise estatística pelo teste t-Student aplicada aos resultados de AUC obtidos a partir do HV para solução de CIPRO livre 5 mg/mL (■) e lipo CIPRO (■).

A análise estatística representada na figura 38 mostrou que as amostras de HV de CIPRO livre e CIPRO encapsulado em lipossomas apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando aplicado o teste t-Student com significância de $p < 0,05$.

A tabela 9 ilustra os valores de AUC para as amostras de HA e HV.

Tabela 9: Área sob a curva (AUC) determinada pelo método do trapézóide a partir da curva de liberação de cada uma das replicatas das amostras.

Amostras	Determinação - AUC		
		Média	Desvio padrão
CIPRO livre 5 mg/mL	HA	23,2586	4,2659
	HV	18,1098	1,0879
Lipo CIPRO	HA	29,2652	2,2164
	HV	21,7214	2,8494

A concentração de CIPRO no HA e HV após aplicação por via subconjuntival em olhos saudáveis de coelhos albinos foi relacionada à MIC₉₀ para microorganismos comumente associados com infecções do segmento posterior e anterior do olho. A tabela 10 apresenta a MIC₉₀ de ciprofloxacino para os principais patógenos associados às infecções oculares.

Tabela 10. Atividade *in vitro* de ciprofloxacino contra patógenos oculares (COKINGTIN e HYNDIUK, 1991).

Bactéria	MIC ₉₀ (µg/mL)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,50
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,61
<i>Enterococci</i>	2,00
<i>Escherichia coli</i>	0,08
<i>Proteus mirabilis</i>	0,18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,73

Após aplicação subconjuntival, lipossomas mantiveram, no HA, níveis de CIPRO maiores que a MIC₉₀ para os patógenos oculares mais comuns incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e a maioria das espécies de *Enterobacteriaceae* por 8 horas. O fármaco livre manteve-se nestas concentrações por 6 horas aproximadamente. Mesmo 12 horas após a administração subconjuntival de CIPRO encapsulado em lipossomas, a concentração manteve-se efetiva para *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*.

A preparação lipossomal manteve a MIC₉₀ também para *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococci* por mais de 4 horas enquanto que o fármaco livre a manteve por 3 horas.

A concentração de CIPRO no vítreo ainda era superior a MIC₉₀ para *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumonia* por volta de 4 horas após a administração das amostras de CIPRO livre e encapsulado em lipossomas. A preparação de lipossomas também apresentou concentração superior para *Staphylococcus epidermidis* depois de 1 hora da aplicação.

A administração subconjuntival de CIPRO alcançou, em média, 9,9 e 5,2 vezes mais concentração de fármaco na câmara anterior que no vítreo nas primeiras 8 horas para as preparações de lipossomas e fármaco livre, respectivamente.

Desta forma, pode-se concluir que a encapsulação do CIPRO no sistema proposto direcionou o fármaco para o compartimento anterior do olho e proporcionou a obtenção de C_{max} maior para alguns patógenos oculares quando comparada ao fármaco livre. Este resultado pode beneficiar pacientes pré e pós cirúrgicos que requerem administração da solução tópica de antibiótico de hora em hora.

CONCLUSÕES

- Nas condições estudadas é possível o revestimento dos lipossomas com PLGA numa concentração máxima equivalente a relação molar FSH:PLGA 40:0,085, aproximadamente.
- Tanto a adição de PLU quanto a de PLGA foi eficiente em aumentar a eficiência de encapsulação dos lipossomas.
- O aumento da concentração de FSH de 40 para 50 mM não foi suficiente para ocasionar aumento significativo da encapsulação de CIPRO.
- O tamanho dos lipossomas é reduzido quando se incorpora PLGA ou PLU às preparações.
- A adição de CIPRO ao sistema provocou aumento do tamanho das vesículas quando comparadas às preparações isentas de antibiótico. Porém, o diâmetro médio dos lipossomas diminuiu com o aumento da concentração de fármaco.
- Neste estudo, o aumento da concentração de FSH de 40 para 50 mM aumentou o tamanho dos lipossomas.

- Os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram que todas as preparações de lipossomas e a preparação de gel de PLU apresentaram menor velocidade de liberação do fármaco quando comparadas à preparação de fármaco livre.
- A presença de PLGA nas preparações de lipossomas diminuiu ainda mais a velocidade de liberação do fármaco quando se compara com as preparações isentas de polímero. Lipossomas revestidos com PLGA também foram mais eficientes em diminuir a velocidade de liberação que gel de PLU e lipossomas contendo PLU após 5 e 6 horas de liberação, respectivamente.
- O estudo *in vivo* demonstrou que lipossomas mantiveram a MIC₉₀ de CIPRO por mais tempo que o fármaco em solução na mesma concentração nas amostras de HA. As diferenças foram estatisticamente significativas quando aplicado o teste t-Student com significância de $p < 0,05$ nas primeiras 24 horas de ensaio.
- As amostras de HV de CIPRO livre e CIPRO encapsulado em lipossomas apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Além disso, a concentração de CIPRO no vítreo ainda era superior a MIC₉₀ para alguns patógenos em torno de 4 horas após a administração das amostras de CIPRO livre e encapsulado em lipossomas.
- O ensaio de liberação *in vivo* demonstrou que a preparação lipossomal aplicada via subconjuntival apresentou uma concentração de fármaco maior para alguns patógenos quando comparada ao fármaco livre.

REFERÊNCIAS

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

AGRAWAL, A.K.; GUPTA, C.M. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. **Adv Drug Delivery Rev.** v. 41, p. 135-146, 2000.

AL-MUHAMMED, J.; OZER, A.Y.; ERCAN, M.T.; HINCAL A.A. In-vivo studies on dexamethasone sodium phosphate liposomes. **J Microencapsul.** v. 13, p. 293-306, 1996.

ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; LEROUX, J.C. Biodegradable nanoparticles of poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. In: LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S. (Ed.) **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1998. v. 3. p. 165.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.Jr. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 6th ed. Baltimore: Williams & Williams, 1995. cap. 11, p. 396-423.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T. **Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology**. London: Chapman & Hall, 1985. p. 207, 739-748.

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

BANGHAM, A.D.; HILL, M.W.; MILLER, N.G. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. **Methods Memb. Biol.** v. 1, p.1-68, 1974.

BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci. **Int J Antimicrob Agents.** v. 19, p. 299-311, 2002.

BARZA, M.; BAUM, J.; SZOKA, F. J. Pharmacokinetics of subconjunctival liposome-encapsulated gentamicin in normal rabbit eyes. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 25, p. 486–490, 1984.

BATZRI, S. KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochim Biophys Acta.** v. 298, p. 1015-1019, 1973.

BERGSTRAND, N. **Liposomes for drug delivery: from physico-chemical studies to applications.** 2003. 71f. Dissertation for the Degree of Doctor - Faculty of Science and Technology Uppsala University, Edsbruk, 2003.

BOCHOT, A.; FATTAL, E.; GROSSIORD, J.L.; PUISIEUX, F.; COUVREUR P. Characterization of a new ocular delivery system based on a dispersion of liposomes in a thermosensitive gel. **Int J Pharm.** v. 162, p. 119-127, 1998.

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

BOROUJERDI, M. Bioavailability and bioequivalence evaluation. In:____
Pharmacokinetics: principles and applications. New York: McGraw-Hill, 2002. cap 16, p.
315-329.

BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; BRAS, W; TALSMA, H. Small angle X-ray
scattering: possibilities and limitations in characterization of vesicles. **Chem Phys Lipids.**
v. 64, p.83-98, 1993.

BRITISH Pharmacopoeia 2001. London: The Stationery Office, 2001. v. 1, p. 426-427.

BROOKHAVEN. [Online] Disponível em: <http://www.brookhaven.co.uk/dynamic-light-scattering.html>. Acesso em: 10 Fev., 2005).

BUZARD, K.; LIAPIS, S. Prevention of endophthalmitis. **J Cataract & Refractive Surgery.** v. 30, p. 1953-1959, 2004.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated
nanocapsules as ocular drug carriers. **Int J Pharm.** v. 153, p. 141-150, 1997.

CHANDAROY, P.; SEM, A.; HUI, S.W. Temperature-controlled content release from
liposomes encapsulating Pluronic F127. **J Control Release.** v. 76, p. 27-37, 2001.

CHANDAROY, P.; SEN, A.; ALEXANDRIDIS P.; HUI, S.W. Utilizing temperature-
sensitive association of Pluronic F-127 with lipid bilayers to control liposome-cell
adhesion. **Biochim Biophys Acta.** v. 1559, p. 32-42, 2002.

CHASTAIN, J.E. General considerations in ocular drug delivery. In: MITRA, A. K. **Ophthalmic drug delivery systems**. 2nd ed, New York: Marcel Dekker, 2003. v. 130, p. 83 e 90.

CHOU, T.H.; CHEN, S.C.; CHU, I.M. Effect of composition on the stability of liposomal irinotecan prepared by a pH gradient method. **J Biosci Bioeng**. v. 95, n.4, p. 405-408, 2003.

COKINGTIN, C.D.; HYNDIUK, R.A. Insights from experimental data on ciprofloxacin in the treatment of bacterial keratitis and ocular infections. **Am J Ophthalmol**. v. 112, p.25S-28S, 1991.

COLTHURST, M.J.; WILLIAMS, R.L.; HISCOTT, P.S.; GRIERSON, J. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**. v. 21, p. 649-665, 2000.

COUVREUR, P.; FATTAL, E.; ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. **Pharm Res**. v. 8, p. 1079-1086, 1991.

DAMJI, K.F.; NOEL, L.P.; PETERSON, R.G.; MA, P.E.; CLARKE, W.N.; GILBERG, S.; CROUCH JR, E.R.; WILLIAMS, P.B. Topical versus intravenous administration of tranexamic acid: a comparison of intraocular and serum concentrations in the rabbit. **Can J Ophthalmol**. v. 33, p. 308-313, 1998.

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

DEL NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; PAMPLIEGA, A.; MARINERO, P.; LÓPEZ, M.I.; COCO, R. High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug. **J Chromatogr A**. v. 727, p. 231-238, 1996.

DESNOYER, J.R.; MCHUGH, A.J. The effect of Pluronic on the protein release kinetics of an injectable drug delivery system. **J Control Release**. v. 86, p. 15-24, 2003.

DILLEN, K.; WEYENBERG, W.; VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. The influence of the use of viscosifying agents as dispersion media on the drug release properties from PLGA nanoparticles. **Eur J Pharm Biopharm**. v. 58, p. 539–549, 2004.

DING, S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *PSTT*. v. 1, n.8, p. 328-335, 1998.

DORTA, M.J.; SANTOVEÑA, A.; LLABRÉS, M.; FARIÑA, J.B. Potential applications of PLGA film-implants in modulating in vitro drugs release. **Int J Pharm**. v. 248, p. 149-156, 2002.

EBRAHIM, S.; PEYMAN, G.A.; LEE, P.J. Applications of liposomes in ophthalmology. **Surv Ophthalmol**. v. 50, n.2, p. 167-182, 2005.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSSON, R. Rheological evaluation of polaxamer as an in situ gel for ophthalmic use. **Eur J Pharm**. v. 45, p. 105-112, 1998.

EL JASTIMI, R; EDWARDS, K; LAFLEUR, M. Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membranes. **Biophys J.** v. 77, p. 842-852, 1999.

EL-KAMEL, A.H. In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. **Int J Pharm.** v. 241, p. 47-55, 2002.

FENG, S.S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chem Eng Sci.** v. 58, p. 4087- 4114, 2003.

FENG, S.S.; RUAN G.; LI, Q.T. Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM). **Biomaterials.** v. 25, p. 5181-5189, 2004.

FOONG, W.C.; HARSANYI, B.B.; MEZEI, M. Effects of liposomes on hamster oral mucosa. **J Biomed Mater Res.** v. 23, p. 1213-1229, 1989.

GABIZON, A. et al. Doxorubicin encapsulated in polyethylene glycol-coated liposomes: initial clinical-pharmacokinetic studies in solid tumors. In: LASIC, D.; MARTIN, F. (Ed.) **Stealth liposomes.** Boca Raton: CRC Press, 1995. cap. 21, p. 245-255.

GABIZON, A.; GOREN, D.; HOROWITZ, A.T.; TZEMACH, D.; LOSSOS, A.; SIEGAL, T. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals. **Adv Drug Delivery Rev.** v. 24, p. 337-344, 1997.

GARBUZENKO, O; BARENHOLZ, Y.; PRIEV, A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. **Chem Phys Lipids**. v. 135, p. 117-129, 2005.

GARCIA SAGRADO, F.; GUZMAN, M.; MOLPERECES, J.; ABERTURAS, M.R. Pluronic copolymers – characteristics, properties, and pharmaceutical applications. Part I. **Pharm Technol Eur**. 1994. p. 46-56.

GASPAR, O.P. **Estudo de Sistemas da Encapsulação de Vancomicina em Lipossomas Unilamelares e Veiculação em Meio Contendo Block Copolymer Pluronic F127, Termossensível, para Liberação Controlada Intravitreal**. 2003. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2003.

GEROSKI, H.D.; EDELHAUSER, F.H. Transcleral drug delivery for posterior segment disease. **Adv Drug Delivery Rev**. v. 52, p. 37-48, 2001.

GÓMEZ-HENS, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J.M. The role of liposomes in analytical processes. **Trends Anal Chem**. v. 24 n.1, p. 9-19, 2005.

GREGORIADIS, G.; POSTE, G. **Targeting of drugs**: anatomical and physiological considerations. New York: Plenum, 1988. p. 222.

GREGORIADIS, G. **Liposome Technology**: liposome preparation and related techniques. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 1993.

GREGORIADIS, G.; FLORENCE, A.T. Liposomes in drug delivery. **Drugs**. v. 45, p. 15-28, 1993.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **Trends Biotechnol.** v. 13, p.527-537, 1995.

GU, Z.; ALEXANDRIDIS, P. Osmotic Stress Measurements of Intermolecular Forces in Ordered Assemblies Formed by Solvated Block Copolymers. **Macromolecules**. v. 37, p. 912-924, 2004.

HANNA, C. Delivery of antibiotics to the eye. **Life Sci**. v. 27, p. 2509-2512, 1980.

HARRIS, J.M.; MARTIN, N.E.; MODI, M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. **Clin Pharmacokinet**. v. 40, p. 539-551, 2001.

HELDT, N.; GAUGER, M.; ZHAO, J.; SLACK, G.; PIETRYKA, J.; LI, Y. Characterization of a polymer-stabilized liposome system. *React Funct Polym*. v.48, p.181-191, 2001.

HERNÁNDEZ-BORRELL, J.; MONTERO, M.T. Does ciprofloxacin interact with neutral bilayers? an aspect related to its antimicrobial activity. **Int J Pharm**. v. 252, p. 149-157, 2003.

HIRNLE, E.; HIRNLE, P.; WRIGHT, J.K. Distribution of liposome incorporated carboxyfluorescein in rabbit eyes. **J Microencapsul**. v. 8, p. 391–399, 1991.

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

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

IMURA, T.; OTAKE, K.; HASHIMOTO, S.; GOTOH, T.; YUASA, M.; YOKOYAMA, S.; SAKAI, H.; RATHMAN, J.F.; ABE, M. Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. **Colloids Surf B: Biointerfaces.** v. 27, p. 133-140, 2002.

ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **J Chem Soc Farad Trans.** v. 72, p.1525-1568, 1976.

IVANOVA, R.; LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Evolution in structural polymorphism of Pluronic F127 poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer in ternary systems with water and pharmaceutically acceptable organic solvents: from “glycols” to “oils”. **Langmuir.** v. 16, p. 9058-9069, 2000.

JAIN, R.A. The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly (Lactide-Co-Glycolide) PLGA devices. **Biomaterials.** v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JEONG, B.; KIM, S.W.; BAE, Y.H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. **Adv Drug Delivery Rev.** v. 54, p. 37-51, 2002.

JOHNSTON, T.P.; MILLER, S.C. Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. **J Parent Sci Technol.** v. 39, p. 83-89, 1985.

JOUSMA, H.; TALSMA, H.; SPIES, F.; JOOSTEN, J.G.H. JUNGINGER, H.E; CROMMELIN, D.J.A. Characterization of liposomes. The influence of multilamellar vesicle through polycarbonate membranes on particle sizing, particle size distribution and number of bilayers. **Int J Pharm.** v. 35, p. 263-274, 1987.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **J Control Release.** v. 82, p. 189-212, 2002.

KAUR, I.P.; SMITH, A. R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. **Drug Dev Ind Pharm.** v. 28, p. 353–69, 2002.

KAUR, I. P.; GARG, A.; SINGLA, A. K.; AGGARWAL D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **Int J Pharm.** v. 269, p. 1-14, 2004.

KAWAKAMI, S.; YAMAMURA, K.; MUKAI, T. NISHIDA, K.; NAKAMURA, J.; SAKAEDA, T.; NAKASHIMA, M.; SASAKI, H. Sustained ocular delivery of tilisolol to rabbits after topical administration or intravitreal injection of lipophilic prodrug incorporated in liposomes. **J Pharm Pharmacol.** v. 53, p.1157–1161, 2001.

KIBBE, A.H. **Handbook of pharmaceutical excipients.** 3rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2000. p. 13-17.

KONDURI, K. S.; NANDEDKAR, S.; DÜZGÜNES, N.; SUZARA, V.; ARTWOHL, J.; BUNTE, R.; GANGADHARAM, P.R.J. Efficacy of liposomal budesonide in experimental asthma. **J Allergy Clin Immunol.** v. 111, n. 2, p. 321-327, 2003.

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

KONOPKA, K.; GUO, L.S.S.; DUZGUNES, N. Anti-HIV activity of amphotericin B-cholesteryl sulfate colloidal dispersion in vitro. **Antiviral Res.** v. 42, p. 197-209, 1999.

LALLEMAND, F.; FELT-BAEYENS, O.; BESSEGHIR, K.; BEHAR-COHEN, F.; GURNY, R. Cyclosporine A delivery to the eye: A pharmaceutical challenge. **Eur J Pharm and Biopharm.** v. 56, p. 307–318, 2003.

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

LANG, J.; PELFREY, C.V.; MARTIN, F. Liposomes composed of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine: fatty acid composition, thermal phase behavior and oxidative stability. **Chem Phys Lipids.** v. 53, p. 91-101, 1990.

LASIC, D.D.; WEINER, N.; RIAZ, M.; MARTIN, F. Liposomes. In: LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S. (Ed.) **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems.** 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 1998, v. 3, p. 43-73.

LE BOURLAIS, C.A.; TREUPEL-ACAR, L.; RHODES, C.T.; SADO, P.A.; LEVERGE, R. New ophtalmic drug delivery systems. **Drug Dev Delivery Syst.** v. 21, p. 19-59, 1995.

LEE, V.H.L.; ROBINSON, J.R. Topical ocular drug delivery: recent development and future challenges. **J Ocul Pharmacol.** v. 2, p. 67-108, 1986.

LEE T.W., ROBINSON J.R. Drug delivery to the posterior segment of the eye: some insights on the penetration pathways after subconjunctival injection. **J Ocul Pharmacol Ther.** v. 17, p. 565-572, 2001.

LI, V.H.K.; LEE, V.H.L.; ROBINSON, J.R. Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems. In: ROBINSON, J.R.; LEE, V.H.L (ED). **Controlled Drug Delivery: Fundamental and Applications.** 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 4-61. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v.29).

LIMA, E.M. **Estudo da incorporação do diclofenaco de sódio em lipossomas unilamelares e avaliação da toxicidade tissular após administração intramuscular.** 1998. 233 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

LIN, H.H.; KO, S.M.; HSU, L.R.; TSAI, Y.H. The preparation of norfloxacin-loaded liposomes and their in-vitro evaluation in pig's eye. **J Pharm Pharmacol.** v.48, p. 801-805, 1996.

LOPES, L.B.; OLIVEIRA, A.G. Lipossomas de longa circulação: estrutura e aplicações. **Infarma.** v. 12, p. 66-70, 2000.

LOPES, L.B.; SCARPA, M.V.; SILVA, G.V.J.; RODRIGUES, D.C.; SANTILII, C.V.; OLIVEIRA, A.G. Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine. **Colloids Surf.** v. 39, p. 151-158, 2004.

MACHA, S.; MITRA, A.K.; HUGHES, P.M. Overview of ocular drug delivery. In: **Ophthalmic drug delivery systems**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 1-2.

MANCONI, M.; VALENTI, D.; SINICO, C.; LAI, F.; LOY, G.; FADDA, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. **Int J Pharm.** v. 260, p. 261-272, 2003.

MARRAKCHI-BENJAAFAR, S.; COCHEREAU, I.; D'HERMIES, F.; POCIDALO, J.J. Tolerability, kinetics, and efficacy of subconjunctival pefloxacin in pigmented rabbits. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 39, p. 834–838, 1995.

MAURER, N.; WONG, K.F.; HOPE, M.J.; CULLIS, P.R. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a H-NMR study. **Biochim Biophys Acta.** v. 1374, p. 09-20, 1998.

MEISNER, D.; MEZEI, M. Liposome ocular delivery systems. **Adv Drug Delivery Rev.** v. 16, p. 75-93, 1995.

MONEM, A.S.; ALI, F.M.; ISMAIL, M.W. Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCl in normal and glaucomatous rabbits. **Int J Pharm.** v. 198, p. 29-38, 2000.

MONTERO, M.T.; SAIZ, D.; SITGES, R.; VÁZQUEZ, J.L.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J. Influence of physicochemical properties of fluoroquinolones on encapsulation efficiency in liposomes. **Int J Pharm.** v. 138, p. 113-120, 1996.

MORISHITA, M.; BARICHELLO, J.M.; TAKAYAMA, K.; CCHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T. Pluronic F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. **Int J Pharm.** v. 212, p. 289-293, 2001.

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

MYLES, M.E.; NEUMANN, D.M.; HILL, J.M. Recent progress in ocular drug delivery for posterior segment disease: emphasis on transscleral iontophoresis. **Adv Drug Delivery Rev.** v. 57, p. 2063-2079, 2005.

NAGARSENKER, M.S.; LONDHE, V.Y.; NADKARNI, G.D. Preparation and evaluation of liposomal formulations of tropicamide for ocular delivery. **Int J Pharm.** v. 190, p. 63-71, 1999.

NEW, R.R.C. **Liposomes: a practical approach.** Oxford: University Press, 1990. p. 1-15, 33-103

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

OH, K.T.; BRONICH T.K.; KABANOV, A.V. Micellar formulations for drug based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic® block copolymers. **J Control Release**. v. 94, p. 411-422, 2004.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. ; LEITE, C.Q.F. Lipossomas: Estratégia biotecnológica para liberação controlada e direcionamento de fármacos com efeito antimicobacteriano. **Rev Ciências Farm**. v. 18, p. 109-121, 1997.

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

O'NEIL, M.J. (Ed.) THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th ed. Rahway: Merck, 2001, p. 2341.

ÖZTÜRK, F.; KURT, E.; İNAN, Ü.Ü.; KORTUNAY, S.; İLKER, S.S.; BAŞCI, N.E.; BOZKURT, A. The effects of prolonged acute use and inflammation on the ocular penetration of topical ciprofloxacin. **Int J Pharm**. v. 204, p. 97-100, 2000.

PANDIT, N.; KISAKA, J. Loss of gelation ability of Pluronic F127 gels in the presence of some salts. **Int J Pharm**. v. 145, p. 129-136, 1996.

PATTON, T.F.; FRANCOEUR, M. Ocular bioavailability and systemic loss of topically applied ophthalmic drugs. **Am J Ophthalmol**. v. 5, p. 225-229, 1978.

PINTO-ALPHANDARARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Target delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **Int J Antimicrob Agents**. v. 13, p. 155-168, 2000.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Preparações para aplicação oftálmica. In: _____. **Tecnologia farmacêutica**. 4th ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. p. 1596-1684.

PUGLISI, G.; FRESTA, M.; MAZZONE, G.; FURNERI, P.M.; TEMPERA, G. Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and in vitro antimicrobial activity. **Int J Pharm**. v. 118, p. 65-76, 1995.

RAMCHANDANI, M.; ROBINSON, D. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. **J Control Release**. v. 54, p. 167-175, 1998.

ROTH, D.B.; FLYNN-JR., H.W. Antibiotic selection in the treatment of endophthalmitis: The significance of drug combinations and synergy. **Surv Ophthalmol**. v. 41, p. 395-401, 1997.

RUEL-GARIÉPY, E.R.; LEROUX, J.C. In situ-forming hydrogels: review of temperature-sensitive systems. **Eur J Pharm Biopharm**. v. 58, n.2, p. 409-426, 2004.

SALMINEM, L.; URTTI, A.; PERIVITA, L. Effects of ocular pigmentation on pilocarpine pharmacology in the rabbit eye. Drug distribution and metabolism. **Int J Pharm**. v. 18, p. 17-24, 1984.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Teaching light scattering spectroscopy: the dimensions and shape of the tobacco mosaic virus. **Biophys J.** v. 71, p. 1641-1650, 1996.

SCHMOLKA, I.R. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. **J Biomed Mater Res.** v. 6, p. 571-582, 1972.

SCHUTZE, W.; MULLER-GOYMANN, C.C. Phase transformation of a liposomal dispersion into a micellar solution induced by drug-loading. **Pharm Res.** v.15, p. 538-543, 1998.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **Int J Pharm.** v. 154, p. 123-140, 1997.

SILVA-JÚNIOR, A.A. **Desenvolvimento de micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos.** 2006. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas – em andamento) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

SMITH, A.W. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? **Adv Drug Deliv Rev,** v. 57, n.10, p. 1539-1550, 2005.

SMITH, A.W.; PENNEFATHER P.M.; KAYE S.B.; HART, C.A. Fluoroquinolones: place in ocular therapy. **Drugs.** v. 61, n.6, p. 747-61, 2001.

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

SOULI, M.; KOPSINIS,G.; KAVOUKLIS, E.; GABRIEL, L. ; GIAMARELLOU, H. Vancomycin levels in human aqueous humour after intravenous and subconjunctival administration. **Int J Antimicrob Agents.** v. 18, p. 239–243, 2001.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Arch Biochem Biophys.** v. 391, p. 79-89, 2001.

SVINGEN, R.; ALEXANDRIDIS, P.; ÅKERMAN, B. On the mechanism of electrophoretic migration of DNA in pluronic gels. **Langmuir.** v. 18, p. 8616-8619, 2002.

SWEEYTMAN, S.C. (Ed) **Martindale:** the complete drug reference. 33rd.ed. London: The Pharmaceutical Press, 2002. p. 182-186.

SZOKA, F.; PAPAHADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 75, p. 4194-4198, 1978.

TAKEUCHI, H.; KOJIMA, H.; TOYODA, T.; YAMAMOTO, H.; HINO, T.; KAWASHIMA, Y. Prolonged circulation time of doxorubicin-loaded liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol after intravenous injection in rats. **Eur J Pharm Biopharm.** v. 48, p. 123-129, 1999.

UNITED States Pharmacopeia. 26th. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p. 457, 2216.

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

VEYRIES, M.L.; COUARRAZE, G.; GEIGER, S.; AGNELY, F.; MASSIAS, L.; KUNZLI, B.; FAURISSON, F.; ROUVEIX, B. Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. **Int J Pharm.** v. 192, p. 183-193, 1999.

VILLANOVA, J.C.O.; CONSIGLIERE, V.O. Aspectos farmacotécnicos dos lipossomas: produção, caracterização e estabilidade. **Braz J Pharm Sci.** v. 36, p. 179-200, 2000.

WANCZINSKI, B. **Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina veiculados em polímero termosensível Pluronic[®] para aplicação intraocular.** 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2005.

WEI, G.; XU, H.; DING, P.T.; LI, S.M.; ZHENG, J.M. Thermosetting gels with modulated gelation for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. **J Control Release.** v. 83, p. 65-74, 2002.

WIECHENS, B.; KRAUSSE R.; GRAMMER, .B.; NEUMANN, D.; PLEYER, U.; DUNCKER, G.I. Clearance of liposome-incorporated ciprofloxacin after Intravitreal injection in rabbit eyes. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* v. 213, n.5, p. 284-292, 1998.

WONG, J.P.; YANG, H.; BLASETTI K.L.; SCHNELL G.; CONLEY J.; SCHOFIELD, L.N. Liposome Delivery of Ciprofloxacin Against Intracellular *Francisella Tularensis* Infection. **J Control Release**. v. 92, p. 265-273, 2003.

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

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

YANG, R.; FU, Y.; LI, L.D.; LIU, J.M. Medium effects on fluorescence of ciprofloxacin hydrochloride. **Spectrochim Acta Part A**. v. 59, p. 2323-2332, 2003.

YASUKAWA, T.; OGURAC, Y.; TABATAD, Y.; KIMURAE, H.; WIEDEMANNNA, P.; HONDA, Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. **Prog Retinal Eye Res**. v. 23, p. 253–281, 2004.

ZAMIR, E.; READ, R.W.; SMITH, R.E.; WANG, R.C.; RAO, N.A. A prospective evaluation of subconjunctival injection of triamcinolone acetonide for resistant anterior scleritis. **Ophthalmology**. v. 109, n. 4, p. 798-805, 2002.

ZEIMER, R.; GOLDBERG, M.D. Novel ophthalmic therapeutic modalities base on noninvasive light-targeted drug delivery to the posterior pole of the eye. **Adv Drug Delivery Rev**. v. 52, p. 49-61, 2001.