

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS PARA
LIBERAÇÃO PROLONGADA INTRAOCULAR DE
CETOROLACO DE TROMETAMINA OBTIDAS POR
“SPRAY DRYING”

GUSTAVO ROSSANEZI

ORIENTADOR: PROF. DR. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA - SP

- 2008-

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS PARA
LIBERAÇÃO PROLONGADA INTRAOCULAR DE
CETOROLACO DE TROMETAMINA OBTIDAS POR
“SPRAY DRYING”

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

GUSTAVO ROSSANEZI

ORIENTADOR: PROF. DR. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA-SP

-2008-

Ficha Catalográfica

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

R823m Rossanezi, Gustavo
 Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de
 cetorolaco de trometamina obtidas por *Spray drying* . / Gustavo Rossanezi.
 – Araraquara, 2008.
 64 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.Micropartículas. 2.Cetorolaco de trometamina. 3. PLGA. 4.Spray
 drying. 5.Tecnologia farmacêutica. I.Oliveira, Anselmo Gomes de, orient.
 II. Título.

CAPES: 40300005

GUSTAVO ROSSANEZI

***MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS PARA
LIBERAÇÃO PROLONGADA INTRAOCULAR DE
CETOROLACO DE TROMETAMINA OBTIDAS POR
“SPRAY DRYING”***

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 15/08/2008, consideraram o candidato Gustavo Rossanezi:

() REPROVADO

(X) APROVADO

1) *Prof. Dr. Vitor Hugo Vitorino Sarmiento* (Examinador)

2) *Prof^a. Dr^a. Ana Dóris de Castro* (Examinadora)

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Luiz Rossanezi e Sônia de Fátima Ragazzi Rossanezi, meus eternos tutores, educadores e incentivadores, que sempre me amaram e me apoiaram, e fizeram o possível e o impossível para tornar realidade esta etapa do meu sonho.

“Amizades podem ir e vir, amores podem chegar e partir, mas Pai e Mãe, mesmo que não estejam presentes estão sempre juntos daqueles que precisam e sabem sentir” – Gustavo Rossanezi

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me permitir nascer, crescer, desenvolver, conviver e aprender com pessoas maravilhosas. Por me manter saudável e pronto para absorver os conhecimentos da vida. Por me proporcionar vida farta e serena que me permitiu chegar aqui hoje.

Aos meus pais Toninho e Sônia, pessoas descentes, de bom caráter, que sempre me amaram, apoiaram, incentivaram e se dedicaram para que eu tivesse as oportunidades que eles não tiveram. EU AMO VOCÊS!!

A toda a minha família pelo carinho, apoio, brincadeiras, descontrações e muitos momentos marcantes de toda minha vida.

Aos meus saudosos avós Vitório e Violanda, e Dorival e Francisca, pelo carinho, dedicação e paciência com esse neto inquieto, travesso e pentelho durante a minha infância e pelo apoio afetivo de sempre.

Aos meus primos Leonardo, Ricardo, Fernando, Raphael, Guilherme, Sarah, Rafaela, Luan e Bruno, pessoas muito importantes, que eu tenho como os irmãos que meus pais não puderam me dar.

A minha tia Susana por dividir comigo essa empreitada durante mais de três anos de viagens, discussões, trabalhos e aprendizados, que nos fez crescer profissionalmente e criar um laço de amizade ainda maior.

Ao Prof.Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pela sua orientação, dedicação, ensinamentos, confiança e pela imensa amizade, sendo uma pessoa alegre, divertida, ética e moral, além de um profissional exemplar. Muito obrigado!!

A Prof^a.Dr^a. Ana Dóris de Castro e Prof^a.Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião pelas colaborações prestadas no Exame Geral de Qualificação.

Agradecimentos

Ao Prof.Dr. Celso Santilli e Prof.Dr. Vitor Hugo V. Sarmiento pelo auxilio e colaboração nas caracterizações físico-químicas.

Aos pesquisadores do Grupo de Pesquisa em Medicamentos Oftálmicos, em especial aos pesquisadores em oftalmologia Dr. José Augusto Cardillo, Fernando Paganelli e Dr. Acácio Alves de Souza Lima Filho, pelas colaborações

Aos docentes do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, em especial aos professores Dr^a. Ana Dóris, Dr^a.Maria Palmira e Dr. Raul César Evangelista pela convivência diária, momentos de descontração e amizade demonstrada.

Aos meus amigos Hermes, Arnaldo, Maicol, Delamano, Balla, Dani, Yukio, Cebola, Zito, Marcelo, Gui Vianna, e Pietro pela grande amizade de muito tempo, pelos momentos alegres e descontraídos que tive e tenho com vocês. Valeu Galera!!

A Diego, Deivide, Léo, Elton, Gustavinho, Gustavão, Puim, Zé Augusto, Marconato, Parizoto, Ronaldo, Maíra, Ivo, Ana, Lise e Orégano, moradores, ex-moradores e agregados da Rep. Sal, o meu muito obrigado a todos pelo acolhimento em suas vidas durante este período, inúmeros churrascos e convivência do dia-a-dia com muita amizade. Iiiiiisto!!!

A Arnóbio Antonio da Silva Junior pela sua amizade, acolhimento, paciência e disponibilidade de ensinar, discutir e colaborar de forma ativa com este trabalho além dos muitos momentos irreverentes durante este período.

A todos os meus amigos pesquisadores do laboratório de farmacotécnica: Priscileila, Kelly, Juliane, Fabrício, Ana Luiza, Cristina Franzini, Cristina Helena, Flavia, Flavio, Gisele, Hiuris, Luana, Thalita, Rubiana, Nelson, Karen, Traudi, Dani Michelin, Beatriz e todos aqueles que me acolheram em suas vidas e tornaram essa convivência muito agradável.

Agradecimentos

Aos funcionários Fátima, Margareth, Queila, Eduardo, Osmar, Matheus, Sandra, Olívia, Tiana, Francisco e tantos outros pela amizade e carinho.

A secretária de Pós-Graduação em especial a Claudia, Laura e Sônia.

A CAPES, CNPq, FAPESP E UNESP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

CETO	-Cetorolaco de trometamina
PLGA	-Ácido poli-lático-co-glicólico
MEV	-Microscopia eletrônica de varredura
TG	-Termogravimetria
DTG	-Termogravimetria derivada
DSC	-Calorimetria diferencial exploratória
DTA	-Análise térmica diferencial
CLAE	-Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CV	-Coeficiente de variação
DP	-Desvio padrão
ΔT	-Variação de temperatura
ANVISA	-Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	-Food and Drugs Administration
AIE	-Antiinflamatório esteroideal
AINE	-Antiinflamatório não-esteroideal

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Representação das estruturas do olho humano.....	6
2. Estrutura química do cetorolaco de trometamina.....	8
3. Estrutura química do ácido polilático co-glicólico.....	12
4. Representação do aparelho de <i>Spray dryer</i>	14
5. Espectro do CETO na região do UV-Vis.....	27
6. Curva padrão do CETO em acetonitrila: tampão acetato(3:7).....	28
7. Cromatograma de uma solução de CETO (315nm).....	29
8. MEV do pó do CETO sob aumento de 7500X.....	32
9. MEV das micropartículas contendo 15% de CETO, sob aumento de 2000X.....	32
10. MEV das micropartículas contendo 15% de CETO, sob aumento de 7500X.....	33
11. MEV das micropartículas contendo 15% de CETO, sob aumento de 15000X.....	33
12. MEV das micropartículas contendo 25% de CETO, sob aumento de 2000X.....	34
13. MEV das micropartículas contendo 25% de CETO, sob aumento de 7500X.....	34
14. MEV das micropartículas contendo 25% de CETO, sob aumento de 15000X.....	35
15. MEV das micropartículas contendo 35% de CETO, sob aumento de 7500X.....	35
16. Frequência e frequência acumulada do tamanho das micropartículas contendo 15% de CETO.....	36
17. Frequência e frequência acumulada do tamanho das micropartículas contendo 25% de CETO.....	37
18. Espectro de infravermelho do CETO.....	38
19. Espectro de infravermelho do PLGA.....	39

20. Espectro de infravermelho da mistura física de CETO com micropartículas inertes de PLGA.....	39
21. Espectro de infravermelho das micropartículas contendo 15%, 25% e 35% de CETO sobrepostos.....	40
22. Curvas de TG, DTG e DTA do CETO.....	41
23. Curva de DSC do CETO.....	42
24. Curvas de TG, DTG e DTA do PLGA.....	42
25. Curva de DSC do PLGA.....	43
26. Curvas de TG, DTG e DTA da glicose.....	44
27. Curva de DSC da glicose.....	44
28. Curvas de TG, DTG e DTA das misturas físicas contendo 15%(a), 25%(b) e 35%(c) de CETO e curvas de DSC das misturas físicas contendo 15%(d), 25%(e) e 35%(f).....	45
29. Curvas de TG, DTG e DTA das micropartículas contendo 15%(a), 25%(b) e 35%(c) de CETO e curvas de DSC das micropartículas contendo 15%(d), 25%(e) e 35%(f).....	47
30. Curva padrão do CETO em ácido acético 0,1M.....	49
31. Curva padrão do CETO em Tampão Tris 10mM pH-7,4.....	50
32. Liberação do CETO 15% microencapsulado.....	52
33. Liberação do CETO 25% microencapsulado.....	52
34. CETO (Δ) e liberação do CETO 15% microencapsulado ($\square$) e do CETO 25% microencapsulado ($\circ$).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela	Pag
1. Dados de precisão e exatidão <i>interday</i> da validação da metodologia de análise quantitativa do CETO.....	30
2. Dados de recuperação da validação da metodologia de análise quantitativa do CETO.....	31
3. Dados do doseamento das micropartículas de CETO.....	50

SUMÁRIO	pág.
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
I-INTRODUÇÃO.....	5
II-OBJETIVOS.....	16
III-MATERIAL E METODOS.....	18
3.1-Material.....	19
3.1.1.Matérias-primas e Reagentes.....	19
3.1.2.Equipamentos e Acessórios.....	19
3.2-Métodos.....	20
3.2.1. Obtenção das microesferas de PLGA contendo CETO.....	20
3.2.2.Validação do método de análise quantitativa do CETO nas micropartículas.....	20
3.2.2.1.Seleção do comprimento de onda representante da região monomérica do CETO por espectrofotometria UV-Vis.....	20
3.2.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas.....	21
3.2.2.3. Linearidade e Alcance.....	21
3.2.2.4. Especificidade e Seletividade.....	21
3.2.2.5. Precisão e Exatidão.....	22
3.2.3. Caracterização físico-química das micropartículas.....	22
3.2.3.1. Morfologia.....	22
3.2.3.2. Determinação do tamanho de partícula por espalhamento de luz.....	22
3.2.3.3. Análise espectrofotométrica na região do infravermelho.....	23
3.2.3.4. Análise térmica.....	23
3.2.3.4.1. Termogravimetria/ termogravimetria derivada (TG/DTG).....	23
3.2.3.4.2. Calorimetria Exploratória Diferencial.....	24
3.2.3.5. Análise quantitativa do fármaco nas micropartículas.....	24
3.2.4. Liberação “in vitro” do fármaco a partir das micropartículas.....	24
IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Obtenção das micropartículas de PLGA contendo CETO.....	27

4.2.1. Seleção do comprimento de onda representante da região monomérica do CETO.....	27
4.2.2. Linearidade e Alcance.....	28
4.2.3. Especificidade e Seletividade.....	29
4.2.4. Precisão e Exatidão.....	30
4.2.5. Recuperação.....	30
4.3- Caracterização Físico-química das micropartículas.....	31
4.3.1. Morfologia.....	31
4.3.2. Determinação de tamanho de partícula por espalhamento de luz.....	36
4.3.3. Análise espectrofotométrica na região do infravermelho.....	37
4.3.4. Análise Térmica.....	40
4.3.5 -Análise quantitativa do fármaco nas micropartículas.....	48
4.3.6. Liberação <i>in vitro</i> do fármaco a partir das micropartículas.....	50
V-CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

As doenças que afetam o globo ocular de maneira geral têm a terapêutica limitada pela grande dificuldade de se atingir e manter níveis efetivos de fármacos nessa região. Isso porque as formas farmacêuticas convencionais para as doenças oculares são destinadas a aplicação tópica, e não proporcionam níveis terapêuticos no corpo vítreo, retina e coróide. Dessa forma, os sistemas de liberação prolongada de fármacos para aplicação intraocular representam um interesse significativo para a terapêutica em oftalmologia.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo produzir através da técnica de “Spray Drying” micropartículas biodegradáveis a partir do ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) contendo cetorolaco de trometamina (CETO), um antiinflamatório não-esteróide que tem apresentado resultados relevantes no tratamento pós-operatório de cirurgias oftálmicas, proporcionando maior conforto e diminuindo os efeitos colaterais causados pelos antiinflamatórios esteróides.

Utilizando o método proposto foram produzidas micropartículas com diferentes proporções de CETO:PLGA. As micropartículas foram visualizadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), apresentando formato esférico e uniforme, com superfícies lisas, e o tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas foram determinados através do espalhamento de luz. Somente uma das amostras foi descartada, devido a não formação de microesferas.

As propriedades físico-químicas de todos os sistemas foram estudadas utilizando espectroscopia de infravermelho (IR), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada. Os resultados destes estudos mostraram que após a obtenção as estruturas químicas dos componentes foram preservadas, havendo entre estes apenas a interação necessária para promover liberação prolongada.

O teor de fármaco encapsulado foi determinado utilizando espectroscopia de UV-Vis e foram obtidos os perfis de liberação *in vitro* do CETO a partir das micropartículas. As micropartículas biodegradáveis contendo CETO aumentam o tempo de liberação do fármaco, porém o perfil de liberação obtido não foi o mais apropriado.

*Palavras-chave: Cetorolaco de trometamina; Micropartículas; *Spray drying*; PLGA.

ABSTRACT

The diseases that affect the ocular globe generally have limited treatment due their difficulty to achieve and sustain effective levels of drugs in this region. Because conventional pharmaceutical forms for ocular diseases are destined to topical application, and not provide therapeutic levels in vitreous, retina and choroid. In this way, the ocular drug delivery systems represent a strategy for therapy in ophthalmology.

Thus, the present work had as aim to produce through Spray drying technique biodegradable microparticles of poly-lactic co-glycolic acid (PLGA) containing ketorolac tromethamine (CETO), a nonsteroidal anti-inflammatory that has presented relevant results in post-operative treating of ophthalmic surgery, providing greater comfort and reducing the adverse effects caused by steroidal anti-inflammatory.

Using the considered method were produced microparticles with different ratios of CETO: PLGA. The microparticles were accessed through Scanning Electronic Microscopy (SEM), presenting itself spherical and uniform, smooth surface, and the particle size analysis and mean diameter were determined by Dynamic Light Scattering. Only one non spherical sample was dismissed.

The physicochemical properties of all systems were studied using infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry/ derivative thermogravimetry (TG/DTG). The results of these studies showed that after produced the chemical structure of components were preserved, only having the necessities interactions to promote prolonged released.

The amounts of encapsulated CETO were determined by UV-Vis spectrophotometry and the *in vitro* drug release profiles from PLGA microparticles were

obtained. The biodegradable microparticles containing CETO prolonged the time of drug release, however the release profile obtained was not the most appropriate.

*Keywords: Ketorolac tromethamine; microparticles; spray drying; PLGA

I- Introdução

I - INTRODUÇÃO

A magnitude da resposta terapêutica relaciona-se com a concentração do fármaco que atinge o local de ação. Essa concentração depende da dose administrada, da quantidade absorvida, da distribuição no local e da velocidade e quantidade eliminada pelo organismo (ANSEL; POPOVICH; ALEN, 2000).

A biodisponibilidade e a solubilidade de fármacos são fatores que frequentemente implicam em dificuldades no desenvolvimento de formas farmacêuticas. Nos métodos terapêuticos tradicionais, muitas vezes, são administradas grandes quantidades do fármaco e porções consideráveis são excretadas sem que exerça a sua função (LIMA, 2006).

O OLHO

O olho humano é dividido anatomicamente em duas partes: segmento anterior e segmento posterior. O segmento anterior inclui córnea, câmara anterior, íris, pupila, lente, cristalino e corpo ciliar. O segmento posterior inclui o corpo vítreo, retina, coróide e esclerótica (figura 1) (KIKUTA, 2000; OGURA, 2001).

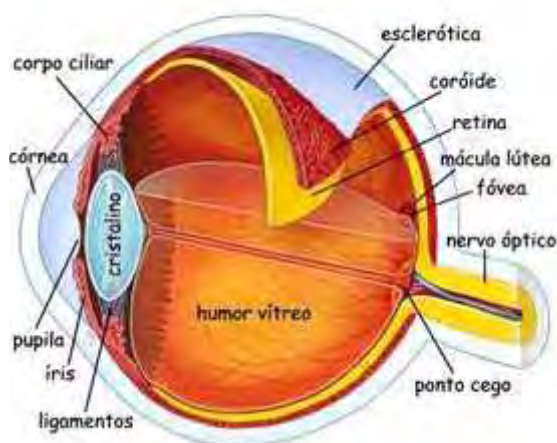


Figura 1- Representação das estruturas do olho humano

A córnea é um tecido avascular constituído por cinco camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Todas estas camadas formam uma barreira contra partículas estranhas, incluindo fármacos (GOODMAN et al, 1996).

Devido à dinâmica do sistema lacrimal, o tempo de retenção de uma solução oftálmica na superfície do olho é curto e a quantidade de fármaco absorvida é apenas uma pequena fração da dose administrada. Isso requer grande frequência de administração, o que é inconveniente para o paciente, provocando a não cooperação do mesmo e ausência de uniformidade dos níveis terapêuticos do fármaco (NADKARNI; YALKOWSKI, 1993; SILVA-JUNIOR, 2005).

A dificuldade em conseguir atingir doses terapêuticas nos tecidos do segmento posterior do olho através de aplicações tópicas de medicamentos dificulta também o tratamento de doenças desses tecidos (MAURICE; MISHIMA, 1984; OGURA, 2001; SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JUNIOR et al, 2008). Mesmo através da administração sistêmica é necessária uma alta concentração de fármaco para atingir concentrações ativas nessa região, o que acarreta aumento dos efeitos colaterais e toxicidade do fármaco (GEROSKI; EDELHAUSER, 2001; OGURA, 2001; SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JUNIOR, 2008). Esse fato é devido a pouca permeação dos fármacos frente à barreira hematoretinal, a qual consiste em um estreito complexo juncional de pigmentos epitélio retinais e de epitélio dos capilares retinais (Del AMO; URTTI, 2008).

Uma alternativa para se conseguir atingir níveis terapêuticos de fármaco no seguimento posterior do olho é o emprego de injeções diretas, normalmente aplicadas por via intravítreal ou subconjuntival (PAGANELLI et al, 2004; BONINI FILHO et al, 2007). Porém, a eliminação rápida do fármaco do seu local de ação leva à necessidade de injeções repetidas para manter concentração adequada durante um período de tempo (OGURA, 2001; SILVA-JUNIOR, 2005).

CETOROLACO DE TROMETAMINA

A ocorrência de inflamações e dores nos olhos é um problema que todos os pacientes pós-operatórios de oftalmologia apresentam. Esse desconforto pode ser aliviado com o uso de colírios contendo antiinflamatórios tanto esteroidais (AIEs) quanto não-esteroidais (AINEs). Na maioria dos casos, os AIEs apresentam um melhor desempenho no tratamento das inflamações, mas a incidência de glaucoma é alta quando se emprega estes fármacos, causando um outro desconforto e em alguns casos acarretando problemas relacionados à cicatrização. Porém, os AINEs têm um efeito maior sobre a dor por serem analgésicos, além de evitar uma série de complicações tais como surgimento de herpes, glaucoma secundário, catarata e retardo na cicatrização (MEIRELES-TEIXEIRA et al, 2003).

O cetorolaco de trometamina (CETO) (Figura 2) é um AINE, inibidor da biossíntese de prostaglandinas, com atividade analgésica, antipirética e principalmente antiinflamatória (GOODMAN et al, 1996). Foi aprovado pelo FDA em 1989, podendo ser administrado por via oral, oftálmica, parenteral ou retal (ANTHONY; JASINSKI, 2002).

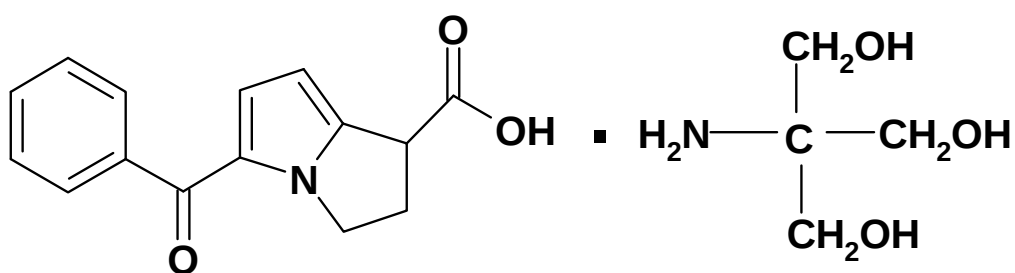


Figura 2. Estrutura química do cetorolaco de trometamina.

Na forma de um sal da trometamina o CETO apresenta-se como um pó branco brilhante ou opaco, cristalino e muito higroscópico. É muito solúvel em água e metanol

(1g/15mL), parcialmente solúvel em etanol e tetrahidrofurano e praticamente insolúvel em acetona, acetonitrila, butanol, diclorometano, acetato de etila e hexano. Tem ponto de fusão entre 176-180°C e deve ser armazenado protegido da luz (USP, 2006; MARTINDALE, 2007).

Apesar de não ser um agonista opióide, possui propriedades analgésicas semelhantes às conseguidas com o uso de opióides. Além disso, não é causador dos efeitos adversos característicos dos mesmos, tais como náusea, vômito e depressão respiratória. Sua aplicação terapêutica se estende as inflamações e dores pós-operatórias, tratamento de dores crônicas, uma vez que não causa tolerância, e é um dos poucos AINEs aprovados para administração parenteral (GOODMAN et al, 1996).

Estudos também demonstram que pacientes pediátricos de urologia, tratados com CETO tem o tempo de internação pós-operatória reduzido, devido à recuperação mais rápida. (CHAUHAN; IDOM; NOE, 2001).

Estudos em oftalmologia mostram uma menor incidência de glaucoma quando se utiliza o CETO como tratamento pós-operatório preventivo de inflamações e dores, mantendo uma eficácia semelhante a dos AIES (MEIRELES-TEIXEIRA et al, 2003).

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

Assim como os demais antiinflamatórios, o CETO apresenta dificuldade em manter a biodisponibilidade necessária à sua eficácia, tanto pela dificuldade de permear as

barreiras oculares, quanto pela rápida eliminação que ocorre no olho (GOODMAN et al, 1996). Desta forma, o desenvolvimento de um sistema que promova a liberação do CETO diretamente no interior do olho durante o período necessário e reduza o número de aplicações representa um avanço no tratamento pós-operatório.

SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Alternativas que tornem os fármacos mais disponíveis para um determinado sítio de absorção têm sido amplamente estudadas e visa direcionar o fármaco para sítios específicos, promover liberação controlada e aumentar o efeito terapêutico (LIMA, 2006).

Diversos sistemas têm sido desenvolvidos para conferir a liberação de doses seguras e eficazes de fármacos para o segmento posterior do olho. Alguns exemplos são sistemas de liberação transescléricos (HASHIZOE et al., 1994; YASUKAWA et al 2000); sistemas coloidais de liberação, tais como lipossomas (AKULA et al., 1994; JORGE et al., 2004; WANCZINSKI, 2005), micropartículas (MORITERA et al., 1991; 1992; VELOSO et al., 1997, KOMPELLA; BANDI; AYALASOMAYAJULA, 2003; SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JUNIOR et al, 2008), nanopartículas (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997; CAMPOS; SANCHEZ; ALONSO, 2001; PIGNATELLO et al., 2002; KOMPELLA; BANDI; AYALASOMAYAJULA, 2003) e implantes poliméricos biodegradáveis (KIMURA et al., 1994, OKABE et. al, 2003; SILVA, 2004; CARDILLO et al., 2004).

A pesquisa de sistemas de liberação prolongada de fármacos intra-oculares representa um avanço significativo na terapêutica (YASUKAWA et al., 2001; OGURA, 2001; SILVA-JUNIOR, 2005). Entre estes dispositivos, as micropartículas biodegradáveis têm sido bastante investigadas objetivando a liberação de fármacos no vítreo por tempo prolongado, através da administração via intravitreal e subconjuntival (GIUNCHEDI et al.,

1999; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; KOMPELLA; BANDI; AYALASOMAYAJULA, 2003; SILVA-JUNIOR, 2005; SILVA-JUNIOR et al, 2008).

MICROPARTÍCULAS

As micropartículas são partículas sólidas, geralmente esféricas, com dimensões da ordem de 1 a 1000 µm até alguns milímetros. Podem ser constituídas por matrizes poliméricas (microesferas) onde o fármaco pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à rede tridimensional formada pelo polímero ou por sistemas reservatórios (microcápsulas) onde o fármaco encontra-se encapsulado na forma sólida, líquida ou gasosa, separado do meio externo por uma membrana polimérica (FINCH, 1990; OLIVEIRA et al. 1992; ANDREO-FILHO; OLIVEIRA, 1999; SILVA-JUNIOR, 2005).

Existem aspectos muito importantes das micropartículas que as tornam aplicáveis no tratamento de patologias oculares, entre as quais podemos citar a biodegradação, a bioadesão, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, o tipo de polímero utilizado determina o mecanismo de liberação do fármaco envolvido. Em matrizes biodegradáveis, a velocidade de erosão é um fator importante na exposição do fármaco ao meio de dissolução. Canais porosos podem estar presentes na rede polimérica permitindo a penetração do solvente com eventual dissolução e difusão do fármaco para o meio de liberação (OLIVEIRA et al, 1992; ANDREO FILHO e OLIVEIRA, 1999).

Vários polímeros podem ser utilizados na produção de micropartículas, como exemplo o ácido poli-lático co-glicólico (PLGA) (COLTHURST et al., 2000; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; OGURA, 2001; SILVA-JUNIOR, 2005).

As micropartículas de polímeros biodegradáveis como o PLGA tem mostrado eficiência na liberação de fármacos no vítreo e podem ser tolerados pelo tecido óptico (MORITERA et al, 1991,1992; AKULA et al, 1994; VELOSO et al., 1997; DING, 1998;

YASUKAWA et al 2000; OGURA, 2001; HERRERO-VANRELL; REFOJO, 2001; KOMPELLA; BANDI; AYALASOMAYAJULA, 2003).

PLGA

O PLGA é um copolímero sintético biodegradável que pertence ao grupo dos poliésteres alifáticos. Pode ser obtido pela co-polimerização do ácido lático e do ácido glicólico (UHRICH et al., 1998).

No organismo, o PLGA sofre hidrólise química decompondo-se em ácido glicólico e ácido lático que é eliminado via ciclo de Krebs em gás carbônico e água (JAIN et al., 1998; KUNOU et al., 2000).

A figura 3 representa as estruturas químicas do PLGA e dos seus produtos de decomposição, ácido lático e ácido glicólico.

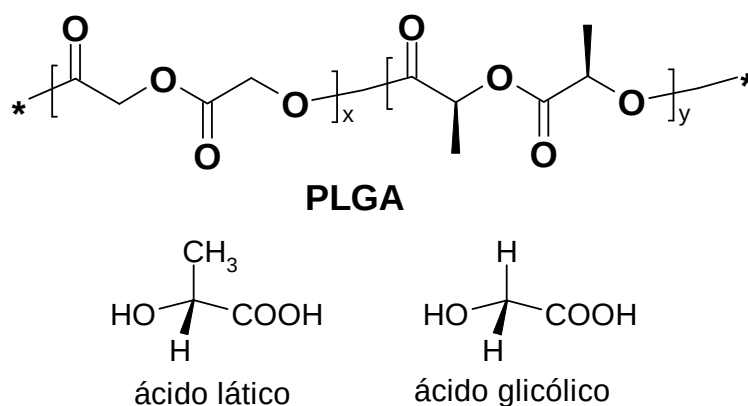


Figura 3. Estruturas químicas do PLGA, ácido lático e ácido glicólico.

O PLGA tem sido usado na liberação prolongada de fármacos, pelo fato de ser biocompatível, biodegradável, atóxico e não necessitar intervenção cirúrgica depois de esgotado o fármaco (JAIN et al., 1998; KUNOU et al., 2000). Vários sistemas de liberação controlada têm sido preparados usando polímeros biodegradáveis como carreadores para

liberação de vários tipos de fármacos, incluindo antibióticos (WEBBER et al., 1998), agentes antineoplásicos, antiinflamatórios esteróides (McCARRON; WOOLFSON; KEATING, 2000; ZHOU et al., 1998), peptídeos (ROTHENWEINHOLD et al., 1999) e proteínas (SINGH et al., 2001) entre outros.

Várias metodologias têm sido propostas para a obtenção de micropartículas, entre as quais a atomização com secagem “Spray drying” vem se destacando devido à eficiência de encapsulação, rapidez, número de etapas de produção reduzida, possibilidade de uso em escala industrial, possibilidade de encapsular fármacos e polímeros com diversos graus de hidrofilia-lipofilia (MASTERS, 1985; FU et al, 2002; SILVA-JUNIOR, 2005).

SPRAY DRYER

O método de obtenção de micropartículas por “spray drying” tem sido vastamente aplicado na produção de alimentos, produtos farmacêuticos, polímeros e também na indústria química. Na indústria farmacêutica é usada para produzir pós para aplicação parenteral, nasal e pulmonar e são administrados na forma de suspensões, soluções e aerossóis (MASTERS, 1985; BENITA, 2006; VEHRING; FOSS; LECHUCA-BALLESTEROS, 2007).

A técnica consiste em dissolver, dispersar ou emulsionar um polímero e o fármaco e atomizar, originando gotículas que são secas rapidamente. A secagem ocorre quando as microgotas passam juntamente com o ar através de uma câmara de secagem (figura 4) a uma temperatura superior à temperatura do ponto de ebulição do solvente utilizado, fazendo com que este evapore formando as micropartículas (FU et al., 2002; BENITA, 2006). Entre as demais vantagens da técnica de atomização com secagem também está à obtenção de micropartículas esféricas e com tamanho uniforme na ordem de micrometros, características extremamente importantes para a liberação homogênea e reprodutível do

fármaco (SILVA-JÚNIOR; MATOS; OLIVEIRA, 2004a; 2004b) e facilitar sua administração evitando o entupimento da agulha no momento da administração parenteral (DING, 1998).

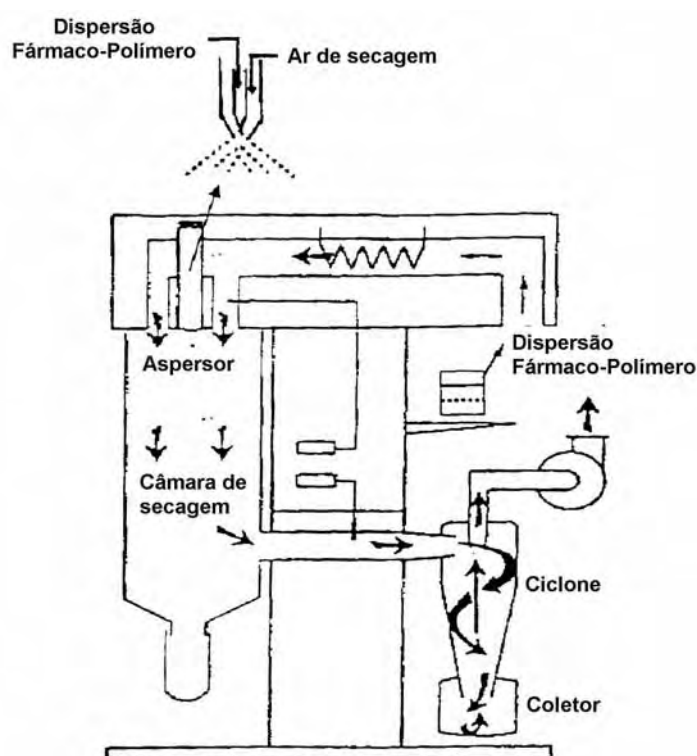


Figura 4 – Representação do aparelho de *Spray Dryer*.

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

Alguns estudos revelam que a radiação gama pode alterar certos parâmetros das micropartículas como tamanho, forma e velocidade de degradação (HERRERO-VANRREL et al, 2000; CALIS et al, 2002; MONTANARI et al, 2003; SILVA-JUNIOR et

al, 2004b). Para tanto, as caracterizações destes sistemas devem ser realizadas antes e depois da exposição à radiação gama como método esterilizante (SILVA-JUNIOR et al, 2008).

II- Objetivos

II – OBJETIVOS

- Desenvolver micropartículas de PLGA contendo CETO em diferentes proporções de fármaco-polímero (m/m), utilizando a técnica de “spray drying”;
- Validar o método de análise quantitativa do fármaco nas micropartículas;
- Caracterizar físico-quimicamente as micropartículas obtidas por “spray drying”;
- Obter o perfil de liberação “*in vitro*” das micropartículas de PLGA contendo CETO.

III- Material

e

Métodos

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

3.1.1. Matérias Primas e Reagentes

- PLGA 50/50 obtidos da Birmingham polymers Inc. EUA
- Cetorolaco de trometamina obtido de Deg- Ativando princípios
- Acetona LABSYNT
- Acetonitrila grau HPLC obtido da J.T Baker.
- Ácido acético glacial LABSYNT
- Água deionizada Milli-Q

3.1.2. Equipamentos e Acessórios

- *Spray dryer* de laboratório marca BUCHI® modelo B191.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters® Alliance mod 2695.
- Coluna Cromatográfica Symetry Waters® C-18 4,6x150mm (5µm)
- Liofilizador modelo EDWARDS MODULYO®.
- Espectrofotômetro UV-Vis HEWLETT PACKARD®
- Microscópio eletrônico de varredura - JEOL® modelo JSM T330A
- Analisador de partículas *Light Scattering* – Brookhaven, mod. EMI 9863 – fonte de laser He-Ne 10mW, 514 e 532nm – HUGHES;
- Vidrarias e outros acessórios

3.2- Métodos

3.2.1. Obtenção das micropartículas de PLGA contendo CETO.

O CETO foi dissolvido em 10 mL de ácido acético glacial e adicionado à solução de PLGA previamente dissolvida em acetona sob agitação a fim de obter soluções finais de proporção fármaco-polímero 15:85, 25:75 e 35:65 (m/m). Todas as soluções foram acrescidas de 2 mg de glicose a fim de obter partículas menos aglomeradas. Por fim as soluções foram atomizadas em aparelho de “Spray dryer” de laboratório, utilizando aspersor padrão de 0,7 mm sob as seguintes condições:

- ✓ temperatura de entrada de ar 75 °C;
- ✓ temperatura de saída de ar 48-52 °C;
- ✓ fluxo do ar de atomização de 450 L/h;
- ✓ fluxo da bomba de alimentação de 20%;
- ✓ eficiência do aspirador de 80%.

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

3.2.2 Validação do método de análise quantitativa do CETO nas micropartículas

3.2.2.1. Seleção do comprimento de onda representante da região monomérica do CETO por espectrofotometria UV-Vis.

Foi preparada uma solução de CETO em acetonitrila/tampão acetato-pH 4,3 (3:7 v/v) na concentração de 25µg/mL e foi realizada a varredura para obtenção do espectro de

UV-Vis desta solução na região de 200 a 400nm utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro com detector *diode array*.

3.2.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas

O sistema CLAE utilizado constitui em cromatógrafo Waters Alliance[®] modelo 2695 equipado com detector Waters Photodiode Array modelo 2996. A fase estacionária constituiu-se em coluna Symetry C-18 (4,6 x 150 mm, 5µm). A fase móvel foi preparada através da mistura de acetonitrila/tampão acetato pH= 4,3 (30:70 v/v) previamente filtrados através de membrana de acetato de celulose 0,45µm x 47mm, sendo degaseificada em banho de ultrasson por 20 minutos. Durante o ensaio foi utilizado fluxo isocrático de 1mL/min.

3.2.2.3. Linearidade e Alcance

Uma solução estoque de CETO foi preparada em acetonitrila na concentração 100µg/mL. Diferentes alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10mL e o volume foi completado com fase móvel, a fim de obter soluções com concentrações entre 0,5 e 30,0 µg/mL. A equação da reta foi obtida através da regressão linear do gráfico feito entre a área da curva e a concentração do fármaco em µg/mL. Também o coeficiente de correlação foi obtido representando a linearidade do método, e a faixa de concentração abrangida pela curva padrão representa o alcance.

3.2.2.4. Especificidade e Seletividade

A capacidade de o método quantificar exatamente o fármaco em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, foi

verificada analisando um cromatograma de uma amostra contendo CETO e cloridrato de ciprofloxacino.

3.2.2.5. Precisão e Exatidão

A precisão foi determinada analisando-se o coeficiente de variação de 5 amostras com concentrações conhecidas de CETO, preparadas em 3 dias diferentes.

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação, que foi realizado contaminando a solução mãe com uma quantidade de PLGA, e prosseguindo com as diluições para obter 5 concentrações presentes na curva padrão. Os resultados deste estudo foram aplicados para obter a % de recuperação de CETO:

$$RECUPERAÇÃO = \frac{CONC \text{ MÉDIA EXPERIMENTAL}}{CONC. TEÓRICA} \times 100$$

3.2.3- Caracterização físico-química das micropartículas

3.2.3.1. Morfologia

A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (SEM).

3.2.3.2. Determinação do tamanho das micropartículas por espalhamento de luz

A análise do tamanho das micropartículas foi realizada através da técnica de espalhamento de luz (*Dinamic Ligth Scattering*), também denominada espectroscopia de correlação de prótons (PCS).

Esta técnica fornece intervalos de diâmetro de partículas presentes nas amostras, bem como o número de partículas contidas em cada intervalo.

A técnica consiste em preparar uma suspensão pouco concentrada com as micropartículas, coloca-la em banho de ultrasson por alguns minutos e atravessar a amostra com um feixe de laser, geralmente He-Ne 532 nm, de modo que as partículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada por um sinal que é enviado ao correlator, no qual se dá o processamento dos dados. Estes são enviados para um software que realiza os cálculos fornecendo os valores de tamanho médio e índice de polidispersidade, entre outros.

3.2.3.3. Espectroscopia na região do infravermelho

A fim de estudar a ocorrência de possíveis interações fármaco-polímero ou possíveis alterações químicas dos componentes das micropartículas após o processo de produção foram obtidos os espectros de infravermelho do fármaco, do PLGA, das micropartículas contendo o fármaco e da mistura física de fármaco-polímero em quantidades iguais. Para isso 3 mg de amostra foram misturadas a 325 mg de brometo de potássio utilizando gral com pistilo para obtenção das pastilhas utilizando prensa hidráulica (FU et al., 2002; SILVA-JUNIOR, 2005).

3.2.3.4. Análise térmica

Para análise térmica das amostras foram utilizadas as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria / termogravimetria derivada (TG/DTG) e derivada de análise térmica (DTA).

3.2.3.4.1 Termogravimetria/ termogravimetria derivada (TG/DTG).

A fim de verificar possíveis alterações na estabilidade térmica dos componentes após o processo de obtenção das micropartículas, as curvas TG/DTG foram obtidas na

faixa de 25 e 500 °C, sob atmosfera de N₂ (50mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, utilizando cadinho de platina contendo em torno de 5mg de amostra.

3.2.3.4.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A fim de verificar possíveis alterações na temperatura de transição vítrea do PLGA após o processo de obtenção das micropartículas, foram obtidas as curvas DSC do fármaco puro, do PLGA, das micropartículas de PLGA contendo o fármaco e das respectivas misturas físicas de mesmas proporções fármaco-polímero, na faixa de 25-500°C, sob atmosfera de N₂ (100mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, utilizando cadinhos de alumínio fechados contendo aproximadamente 1mg de amostra. A célula de DSC foi calibrada antes dos experimentos utilizando padrão de Índio.

3.2.3.5. Análise quantitativa do fármaco nas micropartículas

Foram dissolvidos 5 mg de micropartículas contendo CETO em balão volumétrico de 10mL com ácido acético glacial. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado com ácido acético 0,1M. Foi obtido um espectro desta amostra em 317nm utilizando espectrofotometria na região do UV-Vis. O teor de fármaco encapsulado foi calculado utilizando a equação da curva padrão obtida nas mesmas condições de análise e as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4. Liberação “*in vitro*” do fármaco a partir das micropartículas

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado utilizando o modelo estático, onde as micropartículas contendo o equivalente à 4mg de fármaco foram colocadas em tubos com 3mL de solução tampão Tris 0,01M pH 7,2 e mantidas em banho termostatzado a 37°C ± 0,2 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados os tubos foram centrifugados a 12000

rpm e o sobrenadante retirado e analisado por espectrofotometria em 323nm. Novos volumes de solução tampão serão adicionados aos tubos, os quais serão incubados até o próximo tempo de coleta (SILVA-JÚNIOR, 2005). Todas as análises foram realizadas em quadruplicata.

IV- Resultados

e

Discussão

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção das micropartículas de PLGA contendo CETO

Através do método de obtenção descrito foi possível produzir micropartículas contendo 15%, 25% e 35% de CETO. As micropartículas obtidas apresentam-se como um pó fino, homogêneo e com pequena umidade. O excesso de umidade foi eliminado sob vácuo.

4.2-Validação do método de análise quantitativa do CETO nas micropartículas

4.2.1.Seleção do comprimento de onda representante da região monomérica do CETO

A figura 5 mostra o espectro de UV-Vis do CETO.

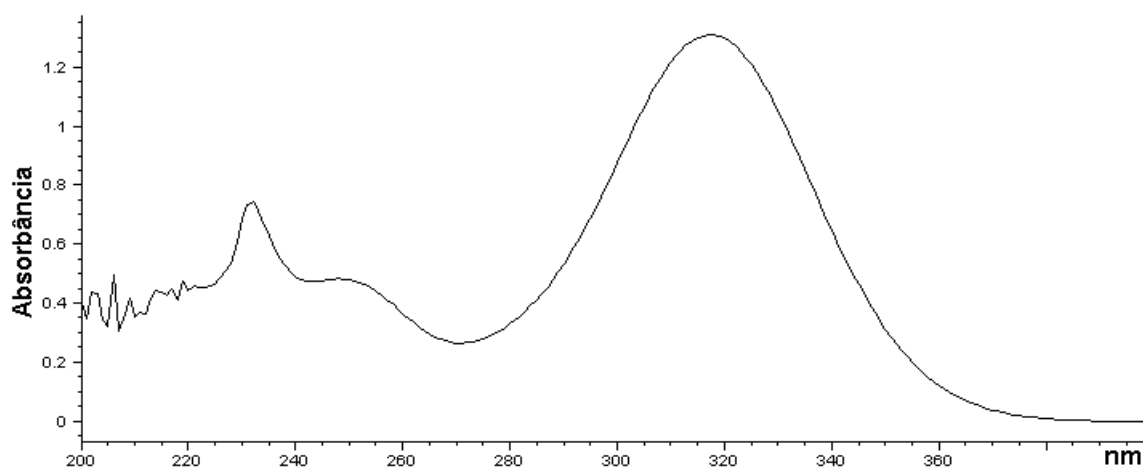


Figura 5 – Espectro de UV-Vis do CETO em acetonitrila: tampão acetato pH-4,3 (3:7)

O espectro do CETO apresentou λ_{max} em 318nm e coeficiente de extinção molar bastante alto para este sistema solvente ($\epsilon = 19844$).

4.2.3. Linearidade e Alcance

Uma solução estoque de CETO foi preparada em acetonitrila na concentração 100µg/mL. Diferentes alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10mL e o volume foi completado com fase móvel a fim de obter soluções com concentrações entre 0,5 e 30,0µg/mL, que foram analisadas por CLAE em triplicata.

Com estes dados foi construída uma curva padrão da área sob o pico em função da concentração do fármaco em µg/mL (figura 5). Através destes pontos foi realizada uma regressão linear onde se obteve a equação da reta. Também o coeficiente de correlação foi obtido representando a linearidade do método, e a faixa de concentração abrangida pela curva padrão representa o alcance.

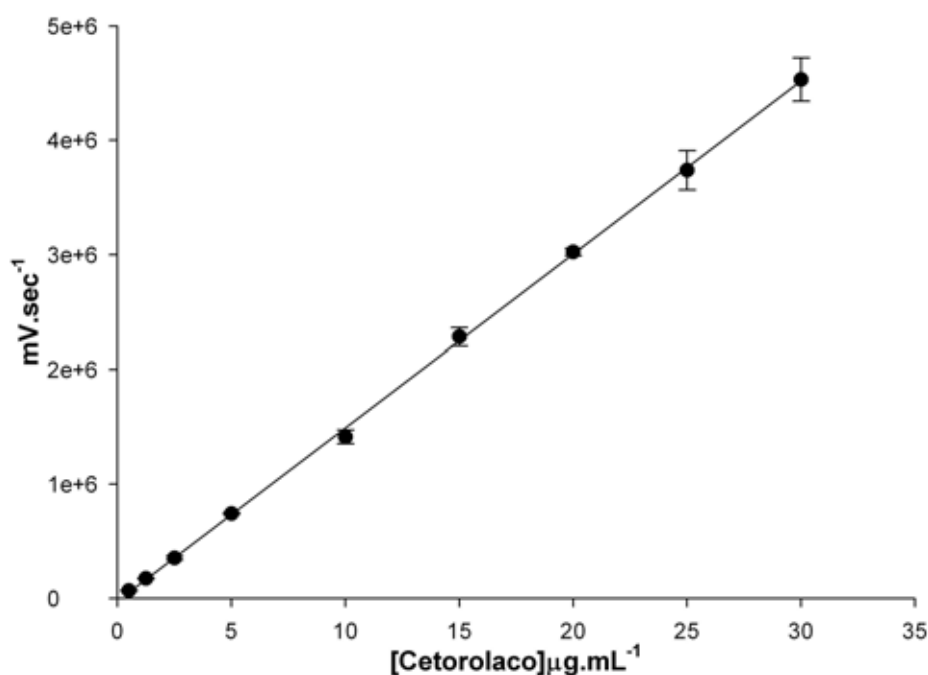


Figura 6- Curva padrão do CETO em acetonitrila: tampão acetato (3:7), com λ_{max} 318nm.

$$y = 152595,36.x - 30069,50$$

$$r^2=0,999$$

O método de quantificação proposto mostrou linearidade na faixa de concentração entre 0,5 e 30 $\mu\text{g/mL}$, apresentando o coeficiente de correlação $r = 0,999$, valor este que se encontra dentro dos limites estabelecidos (ANVISA, 2003).

4.2.3. Especificidade e Seletividade

A capacidade do método de quantificar exatamente o fármaco em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, foi verificada analisando-se o cromatograma de uma amostra contendo CETO e ciprofloxacino e PLGA como padrão interno (figura 6). Esses padrões internos foram escolhidos por se tratarem de um fármaco utilizado na terapêutica junto ao CETO além de ser produzido no mesmo equipamento, e o PLGA é o polímero presente nas micropartículas.

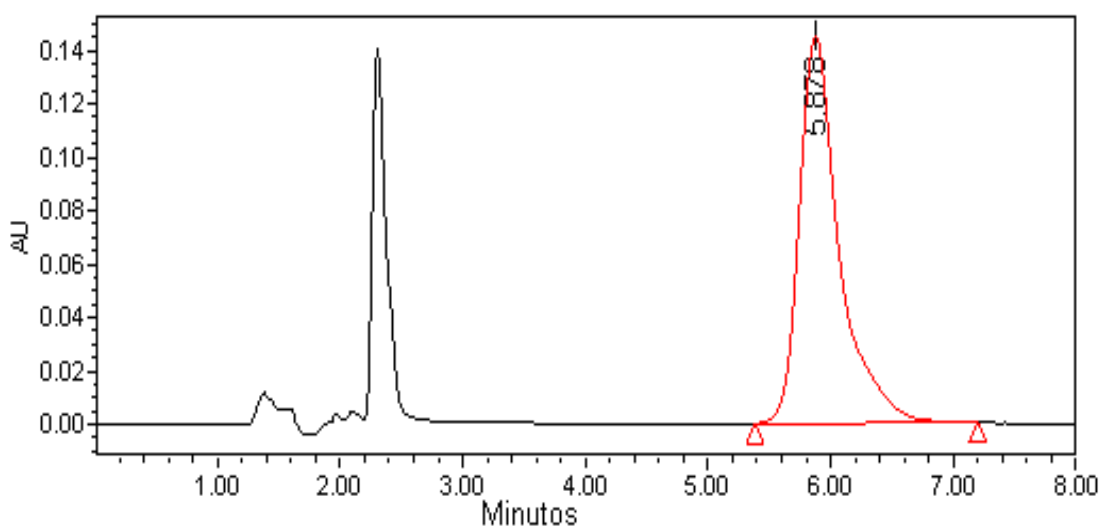


Figura 7 – Cromatograma de uma solução de CETO $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ contendo ciprofloxacino como padrão interno com detecção em λ_{max} 318nm.

O cromatograma mostra o pico do ciprofloxacino próximo há 2 minutos e o pico do CETO bem separado na região de 6 minutos. O pico do PLGA aparece em média no tempo

de 15 minutos e não interfere de forma alguma no pico do fármaco. Desta maneira os contaminantes testados não interferem na quantificação do CETO.

4.2.4. Precisão e Exatidão

A precisão foi determinada analisando-se o coeficiente de variação (CV) de cinco amostras com concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL de CETO, preparadas em três dias diferentes. O método se mostrou preciso uma vez que todas as amostras tiveram CV menor que 5 (Tabela 1).

Tabela 1-Dados de precisão e exatidão *interday* da validação da metodologia de análise quantitativa do CETO

Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração analítica (µg.mL ⁻¹) ± DP	CV(%)
5	4,35 ± 0,06	1,59
10	8,83 ± 0,23	2,61
15	13,61 ± 0,60	4,44
20	18,79 ± 0,87	4,80
25	22,05 ± 0,40	1,77

4.2.5. Recuperação

O estudo de recuperação CETO foi realizado contaminando-se a solução mãe (100 µg.mL⁻¹) com 5mg de PLGA, e prosseguindo-se com as diluições para obter cinco concentrações presentes na curva padrão. Os resultados deste estudo foram aplicados para obter a porcentagem de recuperação de CETO. Nos resultados da tabela 2 pode-se verificar que todos os pontos testados apresentam percentual de recuperação entre 80 e 110%. O

coeficiente de variação também apresenta-se abaixo de 5 de acordo com as especificações da ANVISA.

$$RECUPERAÇÃO = \frac{CONC \text{ MÉDIA EXPERIMENTAL}}{CONC. TEÓRICA} \times 100$$

Tabela 2- Dados de recuperação da validação da metodologia de análise quantitativa do CETO

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração analítica (µg/mL) ± DP	Recuperação (%) ± DP	CV (%)
5	4,22 ± 0,10	84,44 ± 2,05	2,43
10	8,66 ± 0,40	86,65 ± 3,99	4,60
15	13,98 ± 0,63	93,26 ± 4,96	4,96
20	18,46 ± 0,92	92,32 ± 4,60	4,98
25	23,25 ± 0,90	93,03 ± 3,60	3,88

4.3- Caracterização físico-química das micropartículas

4.3.1. Morfologia

As micropartículas com proporção de fármaco-polímero 15:85 e 25:75, foram fotografadas com aumento de 2000X, 7500X e 15000X, dependendo da amostra, a fim de avaliar a forma e tipo de superfície que apresentam.

O CETO (Figura 8) apresentou-se como cristais com dimensões da ordem de 2 a 3 µm bastante aglomerados, o que era já esperado, uma vez que ao ar livre ele tende a aglomerar em pouco tempo.

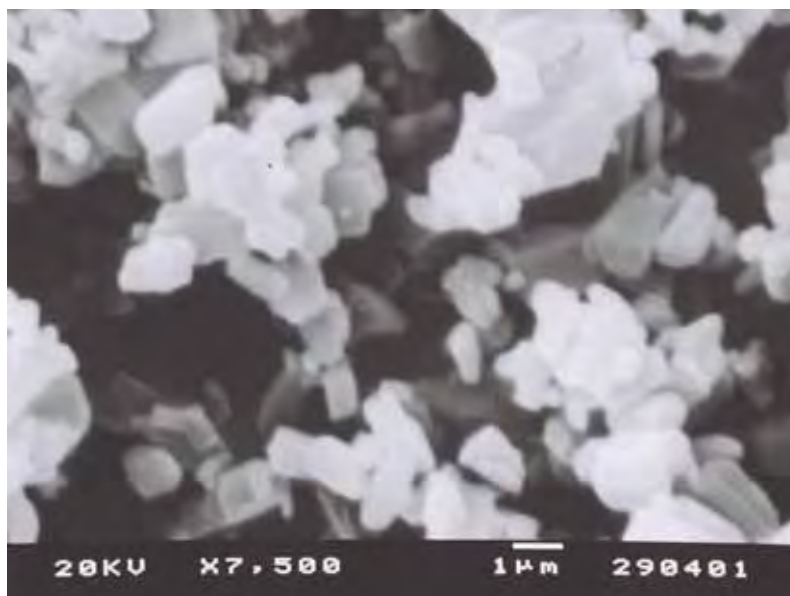


Figura 8 – MEV do pó do CETO sob aumento de 7500X.

As micropartículas partículas contendo 15% de fármaco apresentaram formas ovaladas e esféricas, com tamanho variando entre 1 e 3 μm aproximadamente (figura 9).

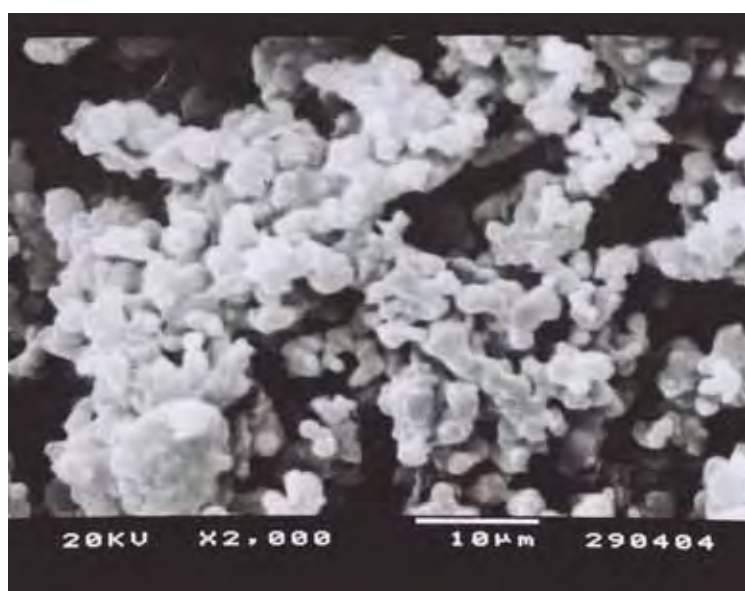


Figura 9 – MEV das micropartículas contendo 15% de CETO, sob aumento de 2000X.

Nos aumentos de 7500 e 15000X observa-se a superfície lisa das micropartículas, em geral esféricas e ovaladas, e temos melhor percepção do tamanho (Figuras 10 e 11).

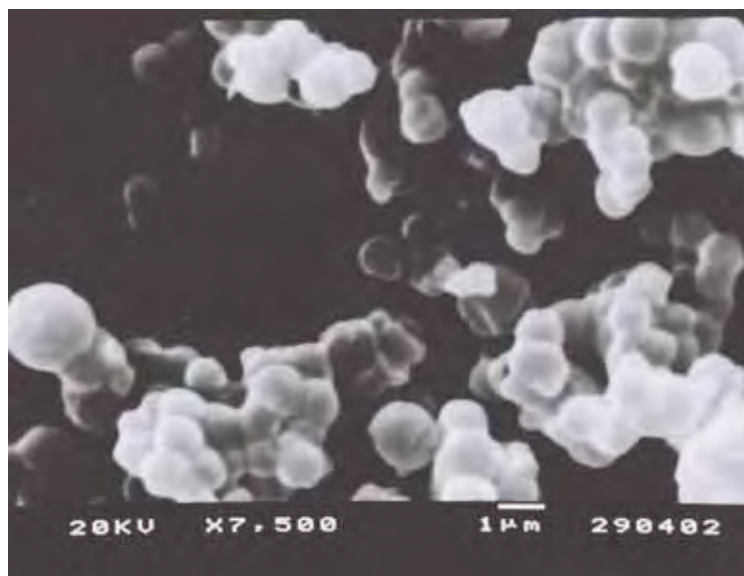


Figura 10 – MEV das micropartículas contendo 15% de CETO, sob aumento de 7500X.

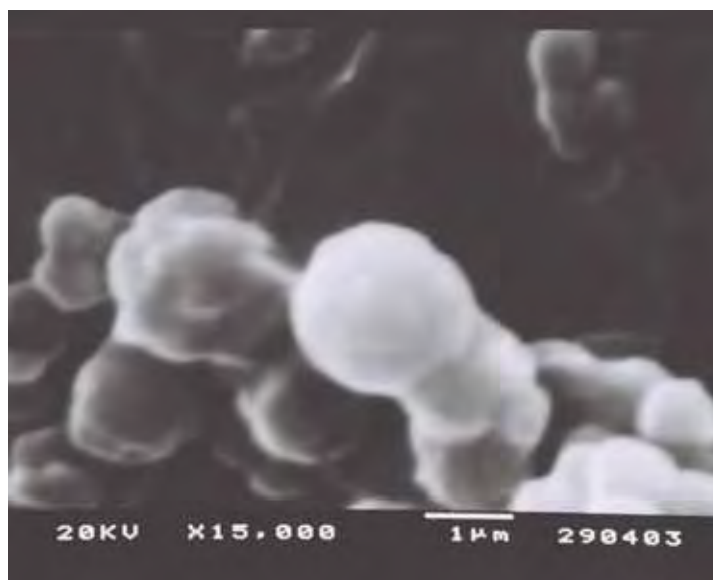


Figura 11 – MEV das micropartículas contendo 15% de CETO, sob aumento de 15000X.

A amostra contendo 25% de fármaco mostrou uma variação na forma, com esferas de tamanho aproximado de 2 μ m e micropartículas aglomeradas (figura 12), assim como o CETO que se aglomera facilmente mesmo quando armazenado em dessecador.

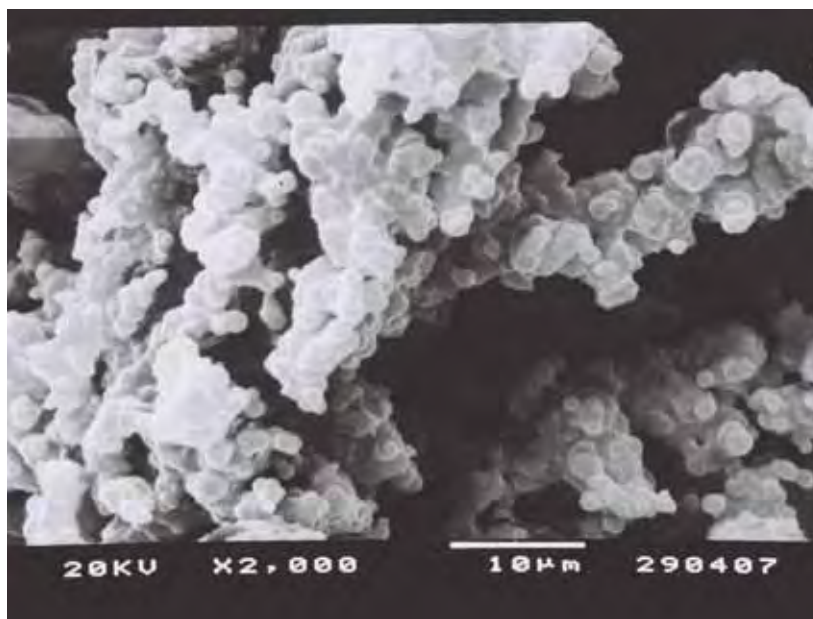


Figura 12 - MEV das micropartículas contendo 25% de CETO, sob aumento de 2000X.

As figuras (13 e 14) mostram micropartículas da ordem de $2\mu\text{m}$ com superfícies lisas e bastante aglomeradas.

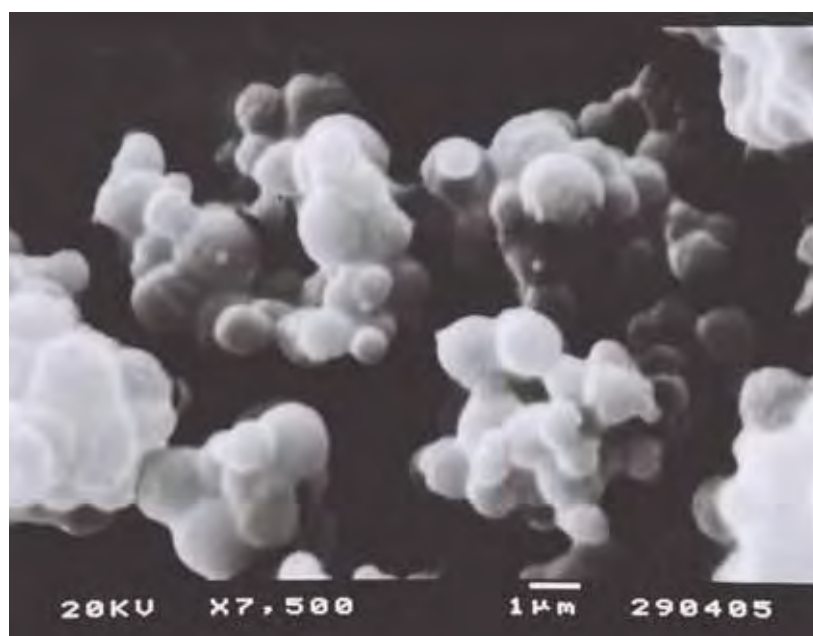


Figura 13- MEV das micropartículas contendo 25% de CETO, sob aumento de 7500X



Figura 14- MEV das micropartículas contendo 25% de CETO, sob aumento de 15000X

Comparando as duas formulações observa-se que à medida que se aumenta o teor de fármaco, as micropartículas tendem a uma maior aglomeração e tornam-se mais amorfas. No entanto, em formulações com mais de 25% de CETO não foi possível obter micropartículas esféricas ou ovaladas, mas sim uma massa de polímero com fármaco a qual provavelmente não oferece liberação uniforme (figura 15).

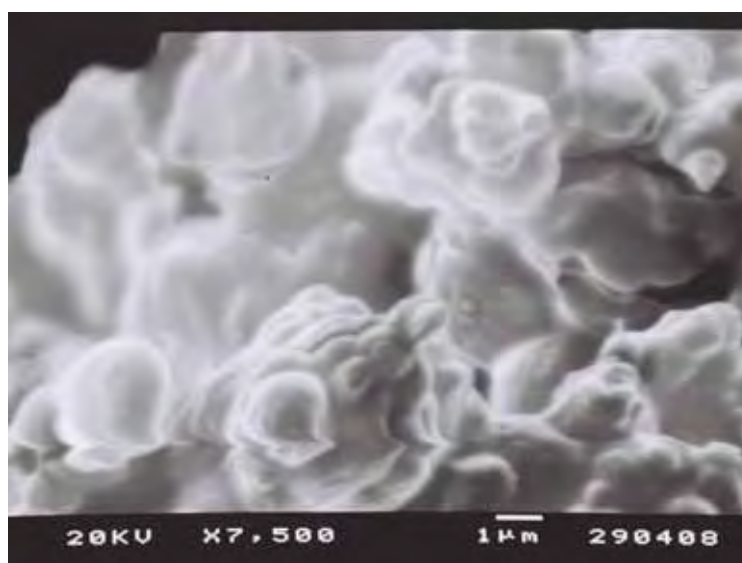


Figura 15- - MEV das micropartículas contendo 35% de CETO, sob aumento de 7500X.

4.3.2. Determinação de tamanho das micropartículas por espalhamento de luz.

Para a determinação do tamanho das micropartículas foram preparadas suspensões com cerca de 5mg de micropartículas contendo CETO em uma solução diluente preparada com tampão fosfato 50 mM, solução de NaOH e NaCl. Esta suspensão foi colocada em banho de ultrasson e em seguida procedeu-se a análise.

A análise foi realizada para as micropartículas contendo 15 e 25% de CETO. Como a amostra contendo 35% de CETO não apresentou micropartículas esféricas, mas sim uma massa amorfa, não foi realizada a análise de tamanho das micropartículas para essa amostra.

As micropartículas contendo 15% de CETO apresentaram um tamanho uniforme, com cerca de 90% das micropartículas com diâmetro entre 1,5 e 3,0 μm . O restante concentrou-se na faixa de 100 a 250 nm e são atribuídas a fragmentos provenientes do choque entre as micropartículas no ultrasson (figura 16).

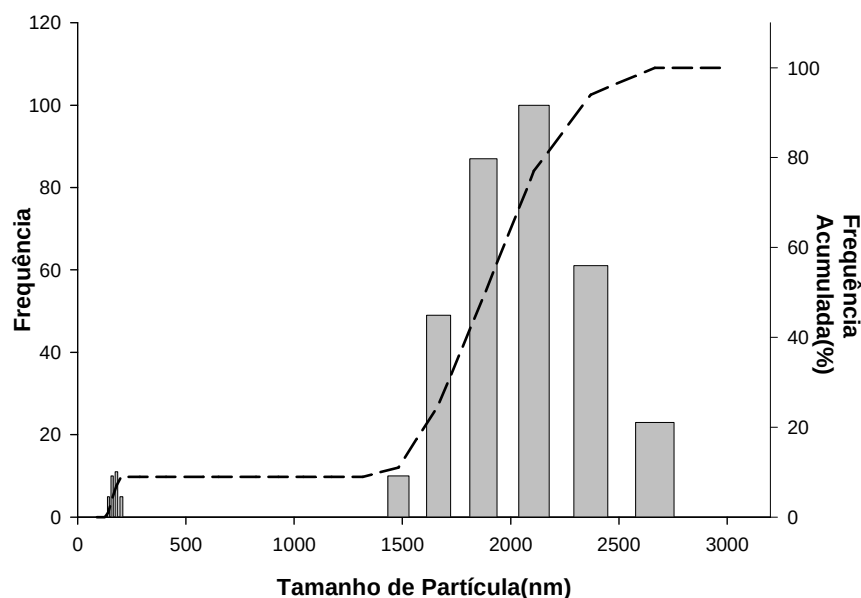


Figura 16-Frequência e frequência acumulada do tamanho das micropartículas contendo 15% de CETO.

As micropartículas contendo 25% de CETO apresentaram tamanho uniforme, porém um pouco maiores, variando entre 3,0 e 4,5 μm . O restante da amostra com diâmetro próximo à 500nm, e atribuída a fragmentos de micropartículas (figura 17).

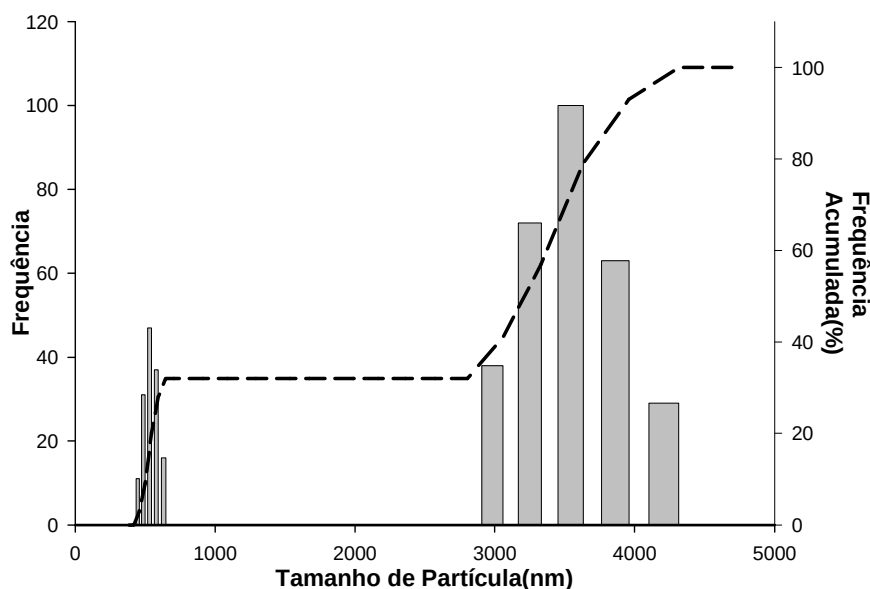


Figura 17-Frequência e frequência acumulada do tamanho das micropartículas contendo 25% de CETO

4.3.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Aproximadamente 3mg de micropartículas com proporções de fármaco-polímero 15:85, 25:75 e 35:65 foram misturadas a 325mg de KBr com auxílio de gral e pistilo e transformados em pastilhas utilizando uma prensa hidráulica. Da mesma maneira, foram preparadas amostras para controle com CETO e micropartículas inertes (mistura física). Todas as amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho de 4000 a 400 cm^{-1} em relação à porcentagem de transmitância, a fim de avaliar a integridade dos componentes após o processo de obtenção das micropartículas.

A figura 18 representa o espectro de infravermelho do CETO: bandas na região de 3000 a 3400 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento do grupo O-H, ao estiramento de carbonos sp^3 e deformação axial de carbonos sp^2 e a deformação do grupo NH_2 no plano, de 1500 a 1600

cm^{-1} , ao estiramento da ligação N-H do grupo amina e a C=O conjugada, de 1210 a 1320 cm^{-1} , atribuídas a estiramento C-O da carboxila, de 1350 a 1420 cm^{-1} , a amina aromática terciária e de 700 a 780 cm^{-1} , atribuídas à monosubstituição no anel aromático (SILVERSTEIN, 1979).

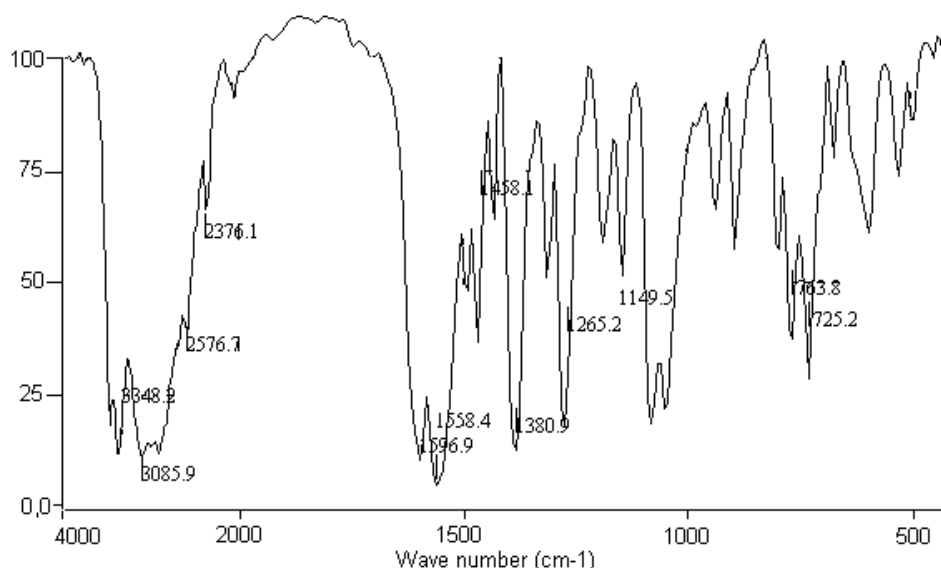


Figura 18- Espectro de infravermelho do CETO.

A figura 19 representa o espectro de infravermelho do PLGA: a banda próxima a 3000 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de carbono sp^3 alifático, de 1760 a 1735, ao estiramento grupo C=O, de 1460 a 1000, correspondem ao estiramento de ligações C-O e O-H.

Pode-se observar através da figura 18 um pico na região de aproximadamente 1600 cm^{-1} , referente a C=O conjugada, e na figura 19 um pico distinto na região de 1750 cm^{-1} , atribuído a C=O não conjugada. Estes dois picos servirão como base para avaliação da presença dos componentes na mistura física e micropartículas, pois se apresentam isolados e sem interferência.

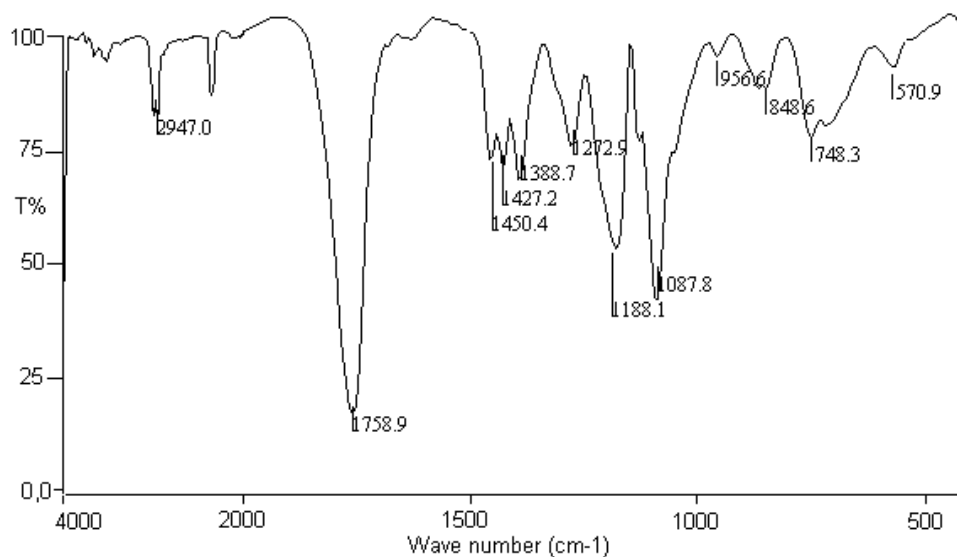


Figura 19- Espectro de infravermelho do PLGA.

A figura 20 representa o espectro de infravermelho da mistura física contendo CETO: PLGA na proporção 50:50. Como podemos observar na figura, não houve diferença nas posições das bandas na mistura física, principalmente as bandas de absorção a 1600 e 1750 cm^{-1} que caracterizam a carbonila conjugada do CETO e a carbonila não conjugada do PLGA, respectivamente. Estes resultados confirmam que somente a mistura física não promove interações químicas entre o fármaco e o polímero.

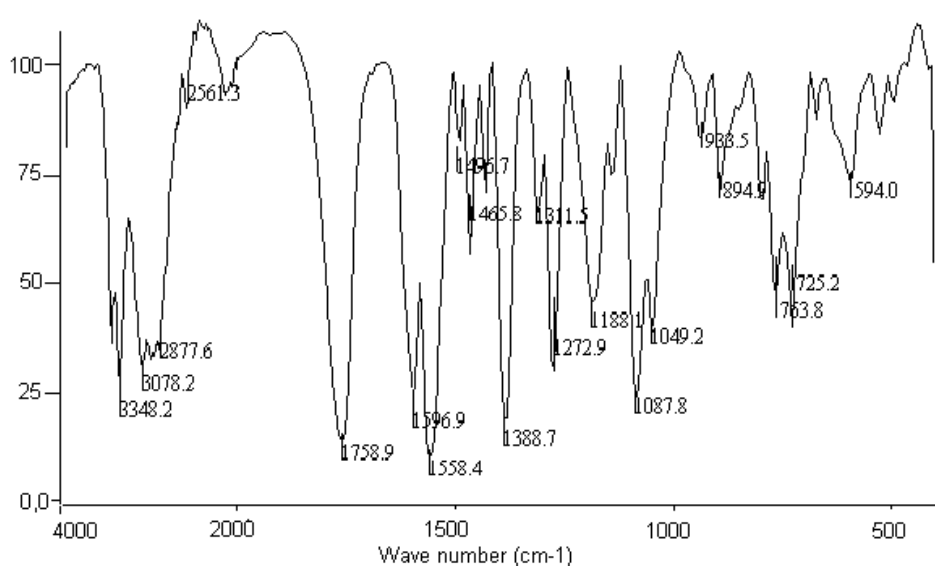


Figura 20 - Espectro de infravermelho da mistura física de CETO com micropartículas inertes de PLGA.

A figura 21 representa o espectro de infravermelho das micropartículas contendo CETO: PLGA nas proporções 15:85 (azul), 25:75 (preto) e 35:65 (vermelho). A partir da figura, podemos observar que os espectros das micropartículas e da mistura física (figura 20) são bastante semelhantes. Entretanto, os picos característicos do CETO na região em 1000 e 1500 cm^{-1} apresentaram, respectivamente, aumento da intensidade e alargamento com o aumento da concentração do fármaco. Estes resultados sugerem possíveis interações entre os grupos NH_2 do CETO e COOH do PLGA para maiores concentrações de CETO (região de 1500 e 1000 cm^{-1} respectivamente), mas de que maneira geral, o processo de obtenção das micropartículas preservou a estrutura química dos componentes.

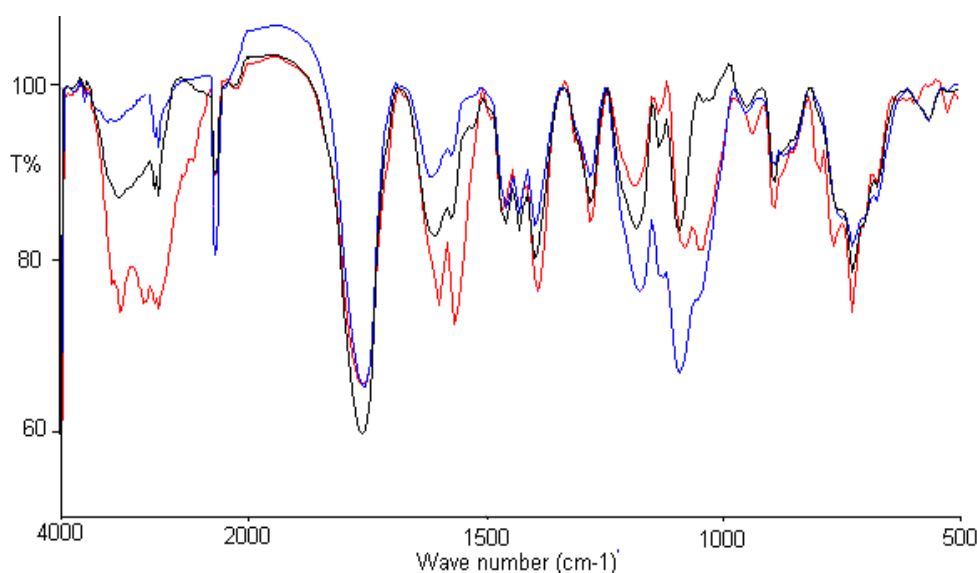


Figura 21- Espectros de infravermelho das micropartículas contendo 15% (azul), 25% (preto) e 35% (vermelho) de CETO.

4.3.4 - Análise Térmica

A análise térmica foi realizada de acordo com os parâmetros descritos, utilizando como amostras CETO, PLGA, glicose, micropartículas contendo 15%, 25% e 35% de CETO e as misturas físicas correspondentes.

A figura 22 mostra as curvas de TG, DTG e DTA do CETO. Pode-se observar através da DTA um pequeno evento próximo a 100 °C (1), resultante da absorção de água de superfície. No intervalo de 160 e 180 °C (2) aparece um evento endotérmico, seguido de outro menos intenso (3), juntamente com o início da perda de massa. O evento 2 coincide com o ponto de fusão do CETO, indicando que o fármaco começa a degradar logo após a sua fusão e continua degradando até acima de 500 °C. Aproximadamente em 300 °C (4) ocorre um pico de degradação exotérmica, onde se observa um aumento na velocidade de degradação. Com exceção do evento (1), todos os demais podem ser bem visualizados na curva de DTG.

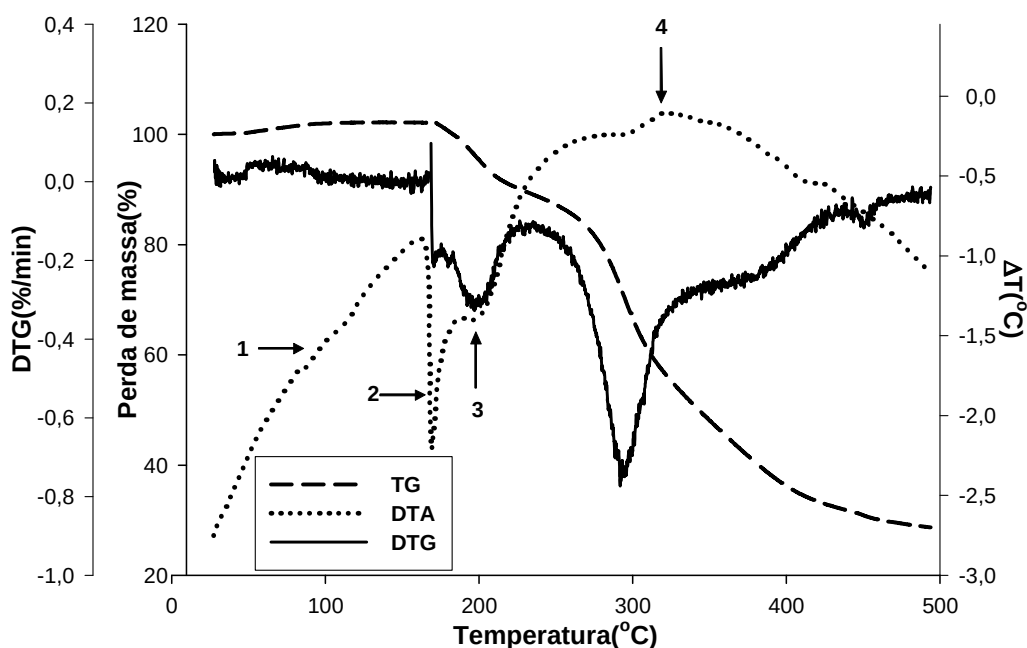


Figura 22 – Curvas de TG, DTG e DTA do CETO obtida em atmosfera de nitrogênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

A curva de DSC do CETO (figura 23) mostra um evento próximo a 80 °C resultante da absorção da água de superfície. Na região entre 160 e 170 °C ocorre o evento de fusão

do fármaco na mesma faixa de temperatura descrita na literatura. Próximo a 200 °C ocorre o evento endotérmico de degradação.

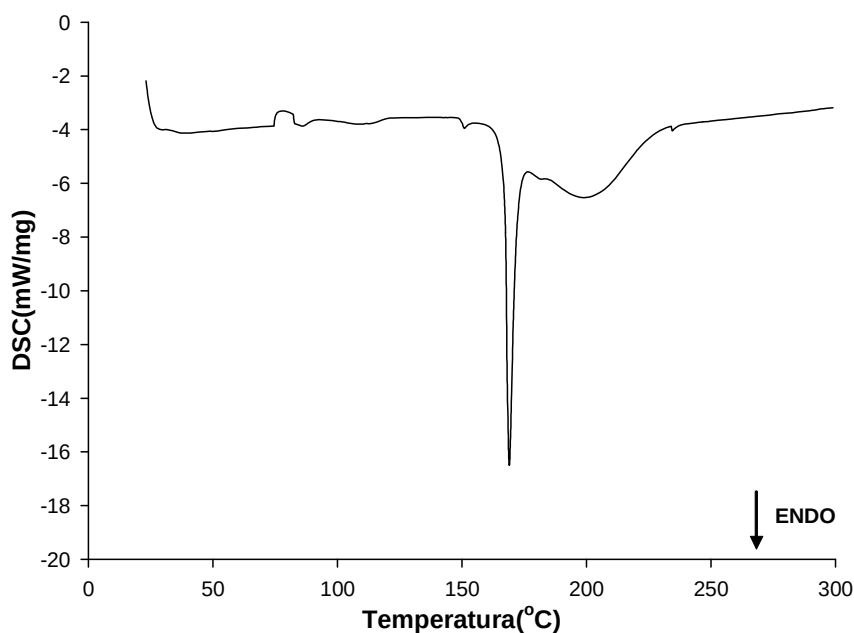


Figura 23 – Curva de DSC do CETO obtida em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

A figura 24 representa as curvas de TG, DTG e DSC do PLGA.

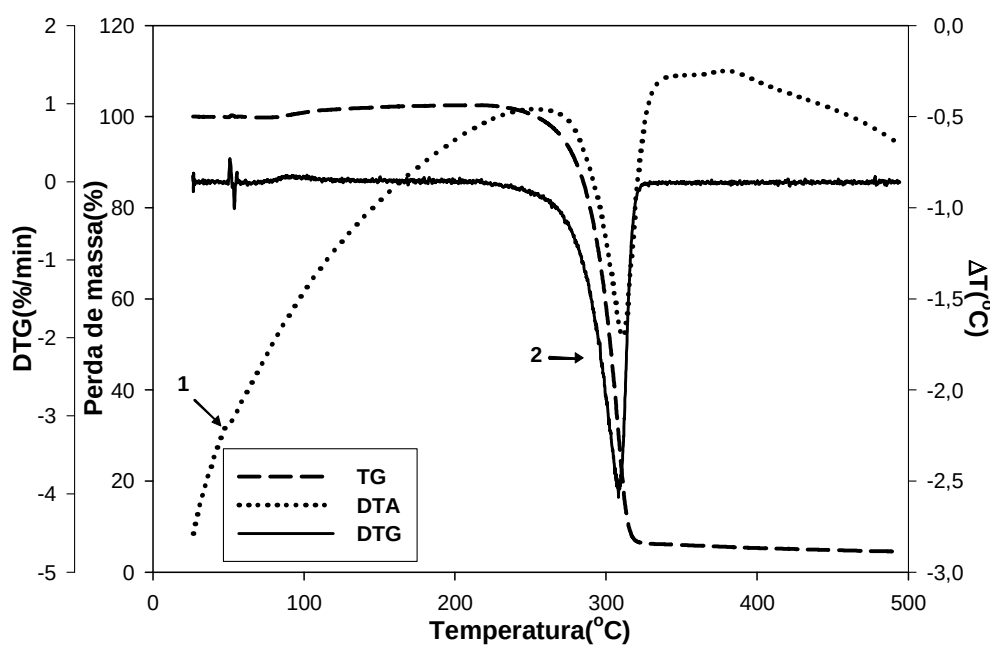


Figura 24 - Curvas de TG, DTG e DTA do PLGA obtida em atmosfera de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) e taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

Através da observação da curva de DTA do PLGA foi possível identificar dois eventos distintos. O primeiro é a transição vítrea do polímero próximo a 50 °C (1) e o segundo, um evento endotérmico, referente à degradação do polímero na região de 270 a 320 °C (2). Estes eventos foram confirmados pelas curvas de TG e DTG.

A figura 25 apresenta a curva de DSC do PLGA. Esta curva mostra um evento entre 45 e 55 °C correspondente à transição vítrea do polímero. O evento de degradação não aparece, pois ocorre acima de 300°C como mostrou a curva de DTG.

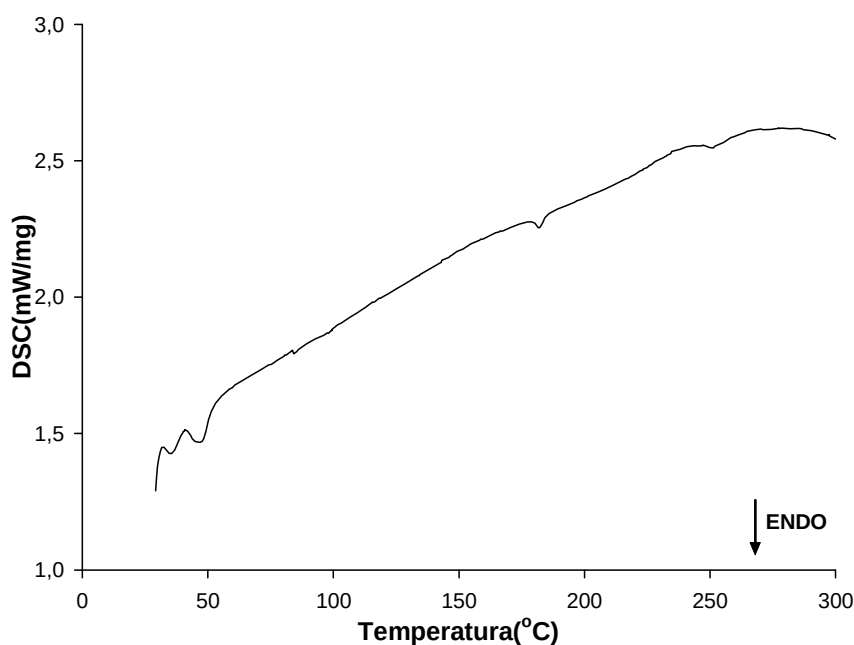


Figura 25 – Curva de DSC do PLGA obtida em atmosfera dinâmica de N₂ a 50mL/min e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹

A figura 26 apresenta as curvas de TG, DTG e DTA da glicose. Neste gráfico é possível visualizar três eventos bem separados. O primeiro (1) na região de 180°C, representa a fusão da glicose, pois não ocorre perda de massa. O segundo (2) e o terceiro (3) são eventos de degradação, estão nas regiões de 250°C e 315°C respectivamente, coincidindo com o início da perda de massa no evento 2 e uma perda acentuada de massa no evento 3, confirmadas pela DTG.

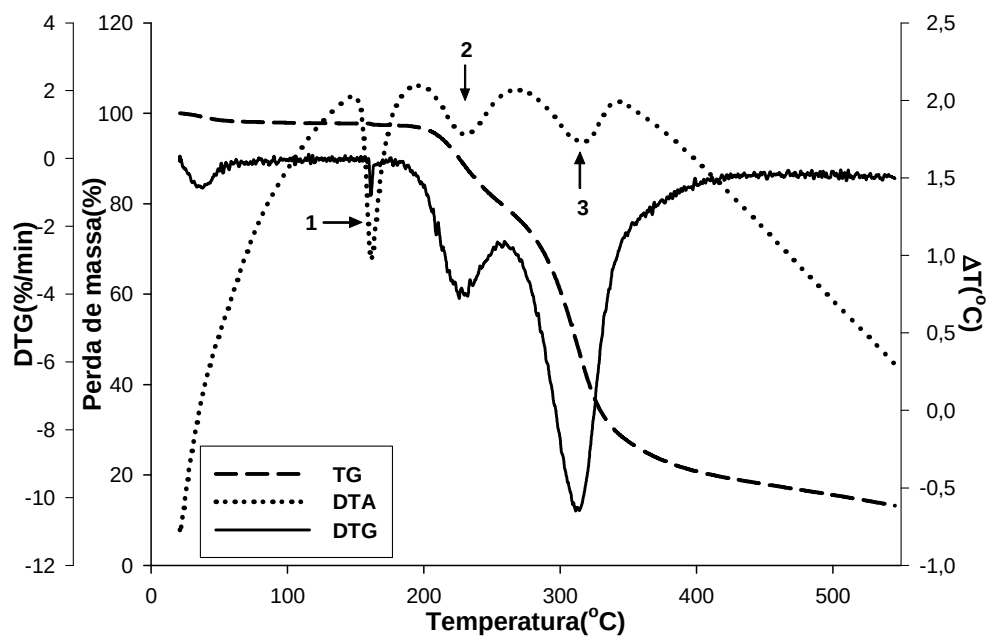


Figura 26- Curvas de TG, DTG e DTA da glicose obtida em atmosfera de nitrogênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

A figura 27 apresenta a curva de DSC da glicose.

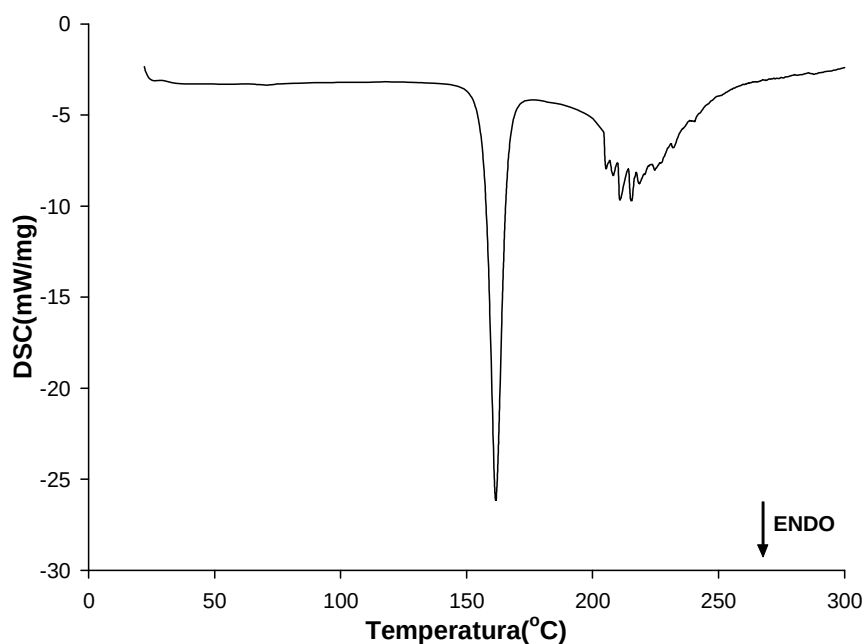


Figura 27 – Curva de DSC da glicose obtida em atmosfera dinâmica de N_2 a 50 mL/min e razão de aquecimento $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

Nesta curva aparecem os eventos de fusão na região de 160°C, bem como o evento endotérmico de degradação iniciando em 200°C, confirmando os eventos já mostrados pela figura 26.

A figura 28 apresenta as curvas de TG, DTG, DTA e DSC das misturas físicas contendo 15, 25 e 35% de CETO.

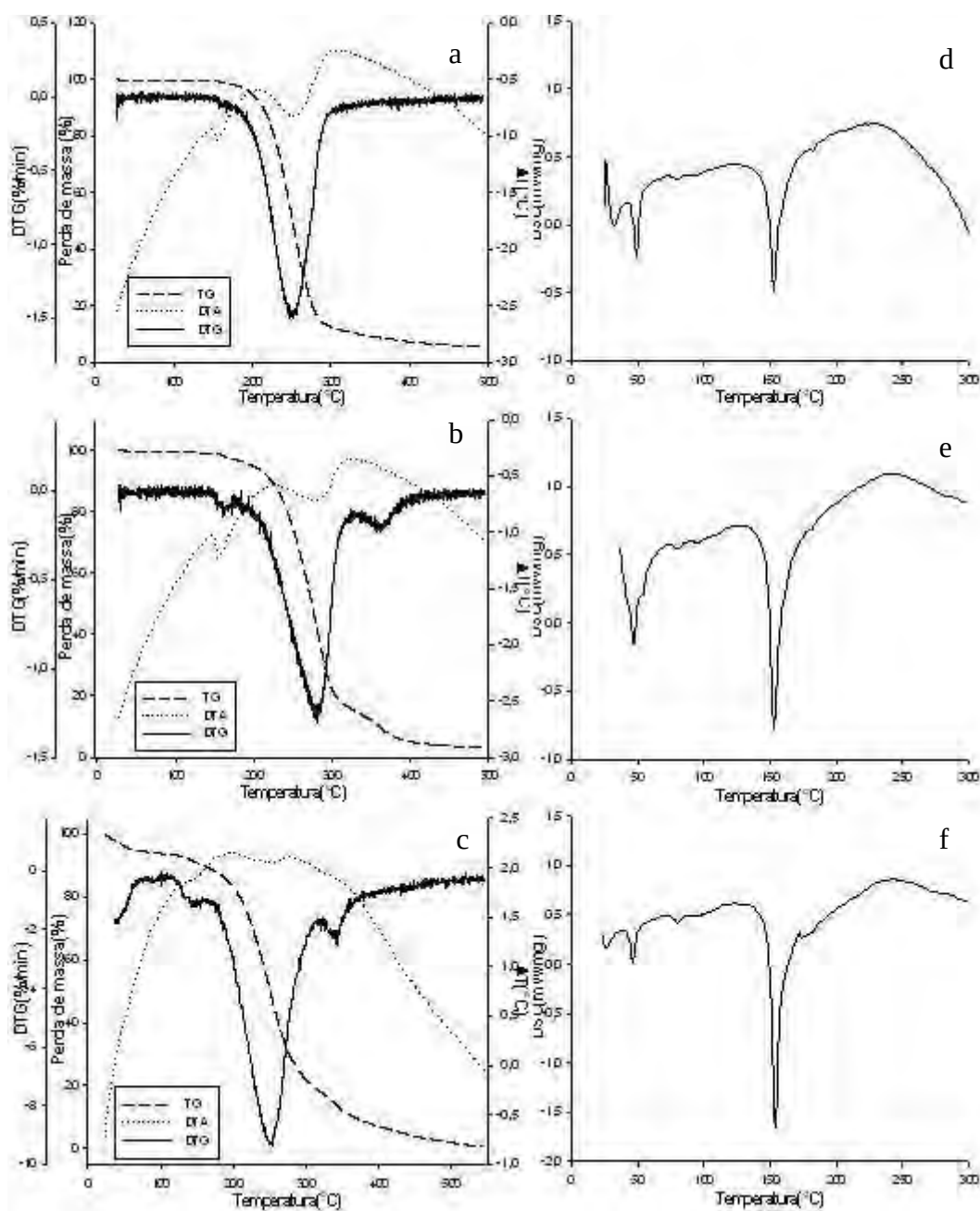


Figura 28- Curvas de TG, DTG e DTA das misturas físicas contendo 15% (a), 25% (b) e 35% (c) de CETO e curvas de DSC das misturas físicas contendo 15%(d), 25% (e) e 35%(f).

As curvas de DTA das misturas físicas (figura 28-a; b; c) reúnem o evento de fusão descrito na curva do CETO, e os eventos de transição vítrea e degradação presentes na curva do PLGA. A primeira etapa do evento de degradação do CETO, provavelmente está integrada à do polímero, pois a curva de DTG apresenta um pico largo e deslocado para as temperaturas entre 200 e 300°C, seguido de outro com menor intensidade aproximadamente em 350°C correspondente à segunda etapa de degradação do fármaco. Porém, as curvas de DTA apresentam dois eventos de degradação, o primeiro endotérmico e o segundo exotérmico, característico do fármaco.

O deslocamento de alguns picos na direção de temperaturas menores indica a ocorrência de interações físico-químicas entre o fármaco e o polímero, quando submetidos ao processo de aquecimento.

Comparando as curvas das diferentes misturas físicas podemos observar uma homogeneidade nos resultados. É notável um aumento na intensidade dos picos referentes à fusão do CETO, tanto na DTA quanto na DTG, onde este evento aparece separado da degradação do polímero. Tal diferença nas intensidades é resultante da quantidade de fármaco de cada amostra.

As curvas de DSC (figura 28-d; e; f) apresentam os eventos descritos nas curvas do CETO e do PLGA: a transição vítrea na região de 50 °C, a fusão do CETO próximo a 150 °C, pouco diferente do apresentado pelo CETO puro. Ocorre também um evento discreto próximo a 190 °C, provavelmente resultante da primeira etapa de degradação do fármaco. Novamente a aparição dos picos de fusão do CETO em temperaturas menores indica que ocorre alguma interação entre fármaco e polímero em altas temperaturas.

As amostras tiveram comportamentos semelhantes entre si, mostrando apenas diferentes intensidades nos picos de fusão do CETO e transição vítrea do PLGA, devido às diferentes proporções.

A fim de verificar se o processo de obtenção promove interação fármaco-polímero, foram realizados estudos de análise térmica das micropartículas.

A figura 29 apresenta as curvas de TG, DTG, DTA e DSC das micropartículas contendo 15, 25 e 35% de CETO.

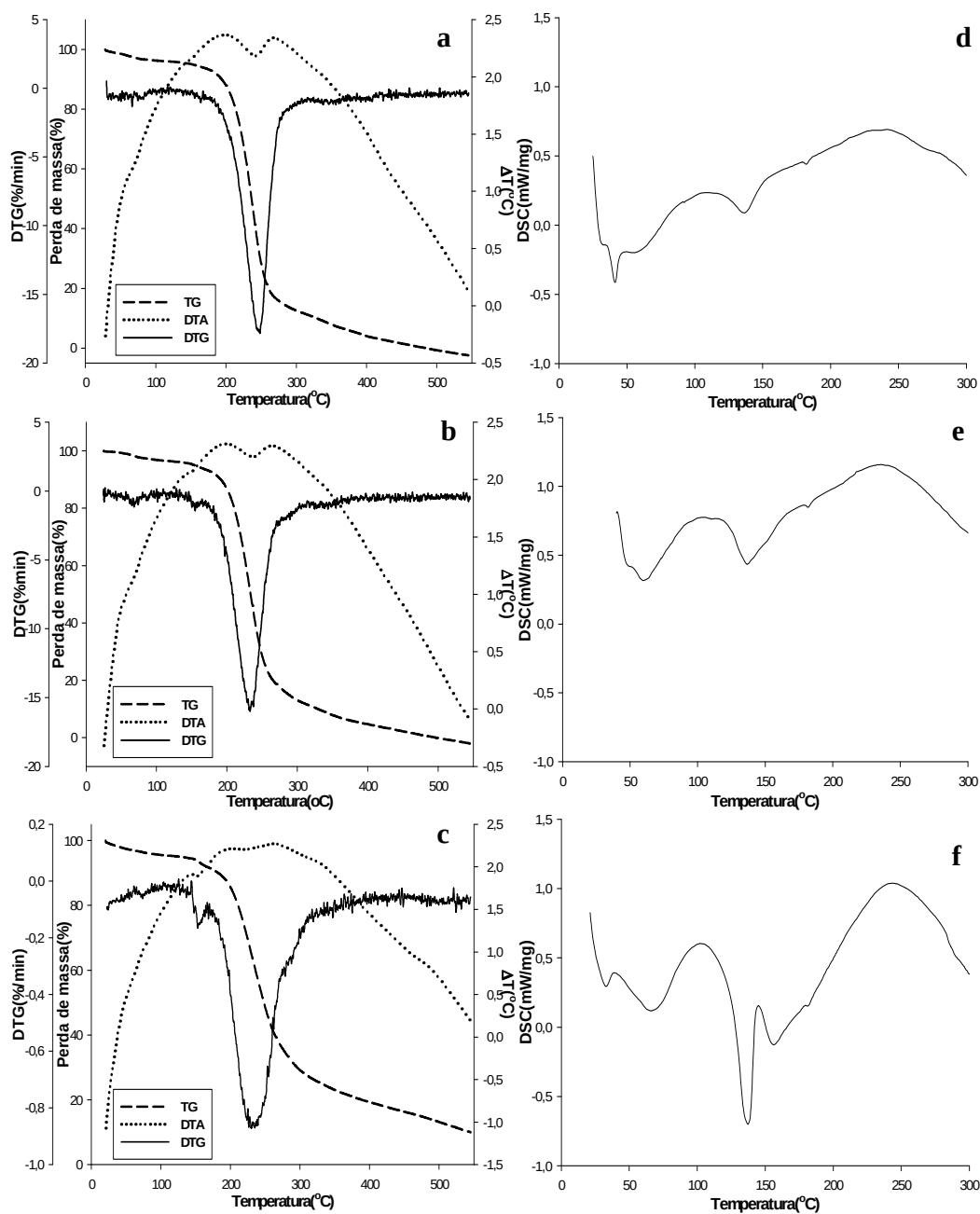


Figura 29- Curvas de TG, DTG e DTA das micropartículas contendo 15% (a), 25% (b) e 35% (c) de CETO e curvas de DSC das micropartículas contendo 15%(d), 25% (e) e 35%(f) de CETO.

As curvas de TG, DTG e DTA (figura 29-a; b; c) das micropartículas apresentaram perfis semelhantes aos das misturas físicas correspondentes, também mostrando deslocamento dos eventos de degradação e fusão para regiões de menores temperaturas (figura 28-a; b; c). Na curva de DTG o a primeira etapa do evento de degradação do CETO provavelmente está integrado ao do polímero, e a segunda etapa aparece mais discreta que nas misturas. Os picos correspondentes à fusão do CETO e transição vítrea variam de intensidade de acordo com a composição.

Todas as micropartículas tiveram comportamento semelhante tendo como única diferença a intensidade de seus picos devido a diferentes composições.

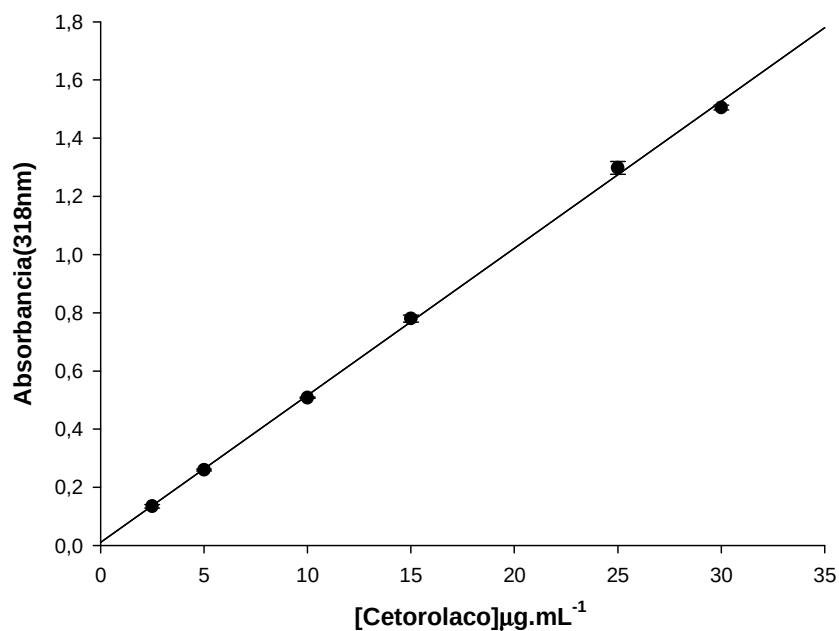
As curvas de DSC (figura 29-d; e; f) apresentaram dois eventos esperados, a transição vítrea do PLGA na região de 50°C e a fusão do CETO na região de 150°C, ambos variando de acordo com a concentração de cada amostra. Da mesma forma que nas misturas físicas (figura 28-d; e; f) ocorre um pequeno evento na faixa de 190°C, que é atribuído à primeira etapa de degradação do CETO.

Deslocamentos de picos e diferenças na sua intensidade e formato indicam que ocorre algum tipo de interação físico-química entre o CETO e o PLGA. Essas interações são necessárias para que ocorra algum tipo de retenção do fármaco nas micropartículas e conseqüentemente um aumento no tempo de liberação do mesmo.

4.3.5 - Análise quantitativa do fármaco nas micropartículas

Para a análise quantitativa das micropartículas de CETO foi construída uma curva padrão a partir dos dados obtidos na espectroscopia na região do UV-Vis. Soluções de CETO em ácido acético 0,1M nas concentrações de 2.5 , 5.0 ,10.0 , 15.0 , 25.0 e 30.0 µg/mL foram preparadas em triplicata.

A curva foi obtida a partir da absorbância em 318 nm em função da concentração (figura 30) para a qual foram calculados a equação da reta e o coeficiente de correlação:



$$y = 0,05055 \cdot x + 0,01024 \quad r = 0,999$$

Figura 30- Curva padrão do CETO em ácido acético 0,1M.

Para a análise quantitativa, foram pesados 5 mg de micropartículas contendo 0,75, 1,25 e 1,75 mg de CETO dependendo da amostra, e transferidos para balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado com ácido acético glacial. Uma alíquota de 1 mL da solução foi transferida para outro balão de 10 mL e diluída com ácido acético 0,1M, e foram procedidas as análises no espectro no comprimento de onda de 318 nm, em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado para todas as formulações.

Os dados foram aplicados na curva padrão e os resultados foram relacionados na tabela 3. De acordo com os dados obtidos, todas as micropartículas tiveram uma eficiência de encapsulação satisfatória e bastante semelhante.

Tabela 3- Dados do doseamento das micropartículas de CETO.

Proporção Fármaco:polímero	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração analítica ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ DP	Eficiência de Encapsulação (%)
15:85	7,5	$6,55 \pm 0,13$	$87,33 \pm 1,74$
25:75	12,5	$11,02 \pm 0,13$	$88,16 \pm 1,08$
35:65	17,5	$15,11 \pm 0,13$	$86,34 \pm 0,73$

. 4.3.6. Liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas

Para realizar o doseamento durante a liberação do CETO através da espectroscopia, foi construída uma curva padrão de CETO em tampão Tris 10 Mm Ph-7,2, na região do UV-Vis. Soluções com concentrações entre 2,5 e 30 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas em triplicatas e as leituras foram realizadas em 323nm. Com base nos resultados foi possível obter a equação correspondente à curva padrão, assim como o coeficiente de correlação. A curva padrão está representada na figura 31.

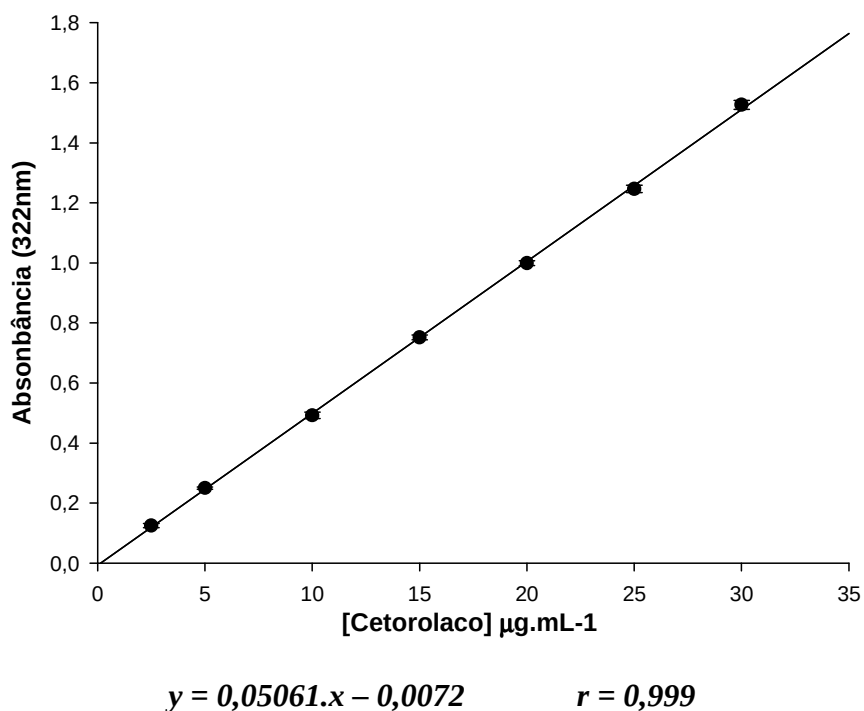


Figura 31-Curva padrão do CETO em Tampão Tris 10 mM pH-7,4.

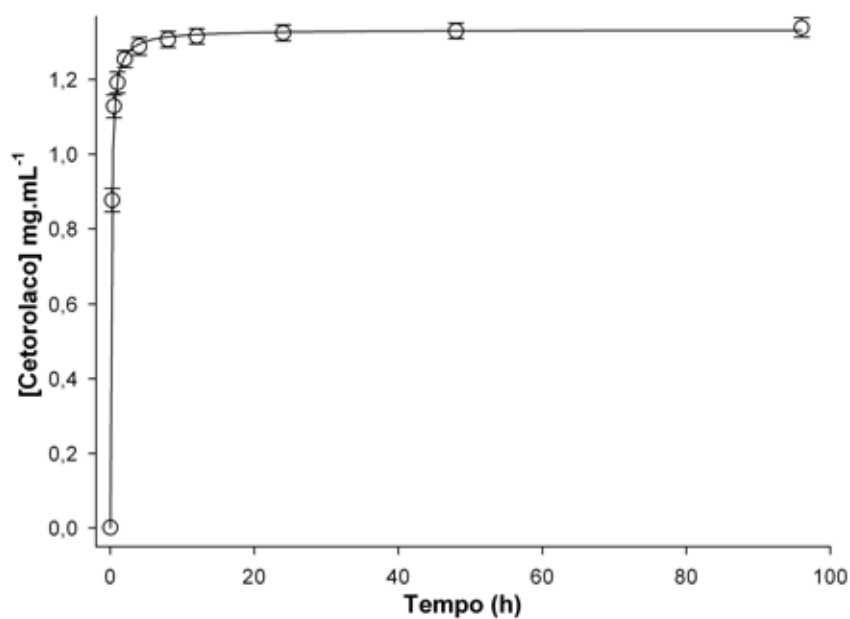
A liberação de fármacos a partir de micropartículas de polímeros biodegradáveis ocorre pela difusão do fármaco através de poros formados na matriz polimérica ou pela degradação do polímero, sendo que a difusão ocorre no início da liberação e a erosão numa fase mais tardia, com a liberação do fármaco disperso na matriz (BENITA, 2006).

De acordo com o método utilizado, micropartículas contendo o equivalente a 4 mg de CETO foram adicionadas a tubos com 3 mL de meio receptor, ou seja a concentração teórica máxima que o meio receptor pode atingir é de 1,33 mg.mL⁻¹. Os valores obtidos com as liberações do CETO a partir das micropartículas se adequam as curvas resultantes da equação de Hipérbole, característica do modelo de saturação (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001).

A equação de Hipérbole é expressa por $y = A.x / (B+x)$, onde A representa o patamar da curva, neste caso a concentração máxima de CETO no meio receptor (mg.mL⁻¹), e B representa a constante de liberação (k) de cada sistema. Dessa forma a equação que representa a liberação do CETO a partir das micropartículas pode ser expressa como:

$$[CETO] = \frac{[CETO]_{max} . t}{k + t}$$

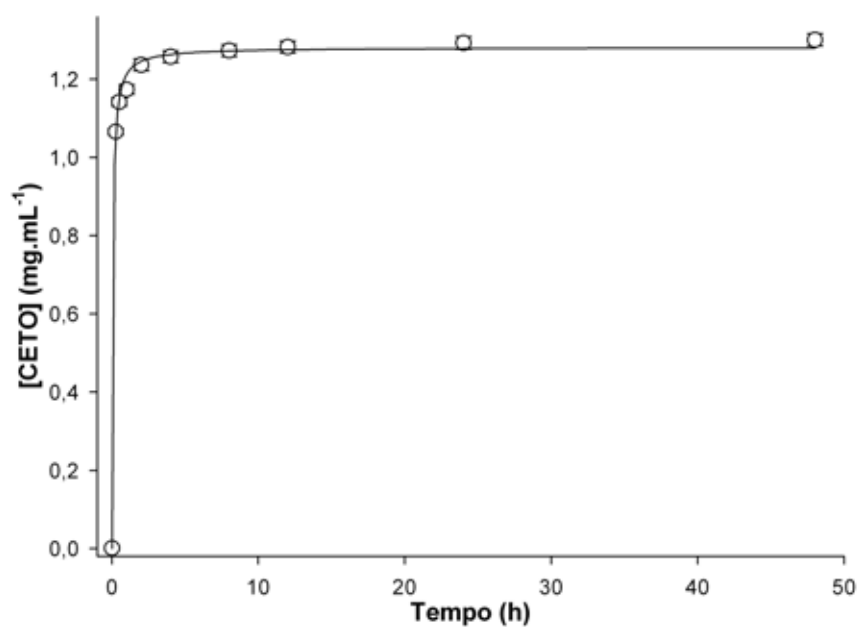
Os resultados da curva de liberação do CETO 15% microencapsulado (figura 32) mostram que a concentração do meio receptor chega a aproximadamente 0,9 mg.mL⁻¹ nos primeiros 15 minutos, ou seja cerca de 70% do fármaco, porem o restante foi liberado durante 96 horas.



$$[CETO] = \frac{1,334 \cdot t}{0,117 + t} \quad r = 0,999$$

Figura 32-Liberação do CETO 15% microencapsulado.

A figura 33 apresenta a curva de liberação do CETO 25% microencapsulado.



$$[CETO] = \frac{1,281 \cdot t}{0,056 + t} \quad r = 0,999$$

Figura 33- Liberação do CETO 25% microencapsulado.

No caso do CETO 25% microencapsulado, o tempo de liberação foi reduzido, com cerca de 80% do CETO sendo liberado nos 15 primeiros minutos, e o restante liberado durante 48 horas (figura 33).

O tempo de liberação reduzido desta amostra era esperado, uma vez que a formulação apresenta uma menor proporção de polímero, diminuindo a matriz polimérica a ser degradada, assim como uma maior concentração de CETO nas micropartículas, facilitando a sua difusão através dos poros, pois a velocidade de difusão é proporcional à concentração de fármaco na micropartícula. A combinação desses dois fatores resulta num tempo de liberação menor.

Ambas as formulações apresentaram curvas que combinam com o modelo descrito, isso pode ser confirmado pelo coeficiente de correlação maior que 0,99.

Observando os dados dos gráficos de liberação concluímos que as micropartículas aumentam o tempo de liberação em relação ao CETO livre quando mantidas as condições *Sink*. Os perfis de liberação obtidos com as micropartículas foram bastante diferentes do perfil do CETO livre, que se apresentou como uma reta, ou seja, com velocidade de liberação maior e constante. O perfil de liberação obtido com as micropartículas apresentou variação na velocidade durante a liberação, com grande porcentagem do CETO nos primeiros quinze minutos e o restante sendo liberado durante horas.

Esse fenômeno é conhecido como efeito *burst*, característico de formulações associando fármacos muito hidrofílicos e polímeros lipofílicos, formando misturas heterogêneas, onde a maior parte do fármaco migra para a superfície das micropartículas e somente uma pequena fração fica retida no interior da rede polimérica (BENITA, 2006). Isso explica porque aproximadamente 90% do CETO é liberado na primeira hora e apenas o restante apresenta o comportamento de liberação pretendido.

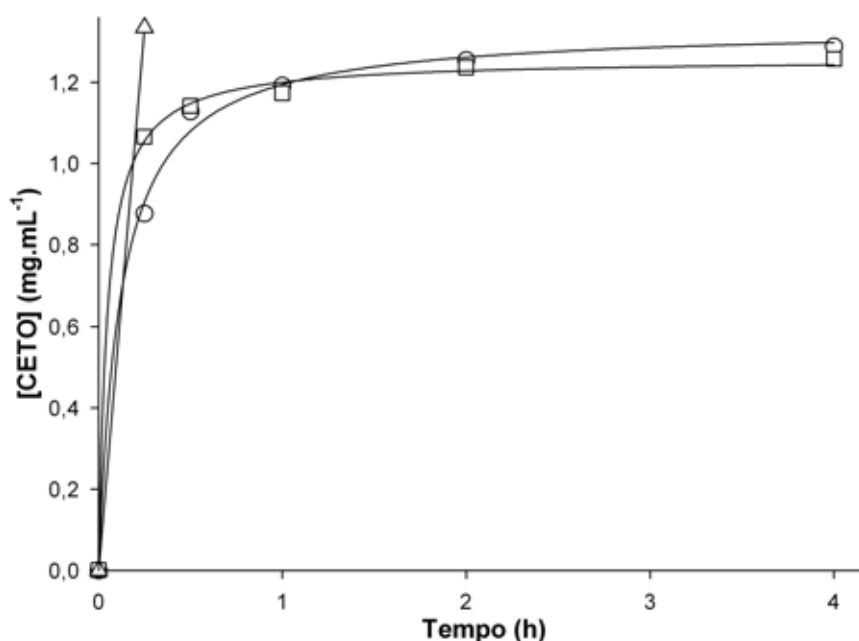


Figura 34-CETO livre (Δ), liberação do CETO 15% microencapsulado (○) e do CETO 25% microencapsulado (□).

Uma proposta de solução para esse comportamento seria o uso de cetorolaco ao invés do cetorolaco de trometamina, pois o sal de trometamina é uma forma mais hidrossolúvel e foi desenvolvido para obter efeito rápido de analgesia. Dessa forma, teoricamente a característica de hidrofília-lipofília do fármaco se aproximaria da característica do PLGA e possivelmente na micropartícula final o cetorolaco poderia estar todo dissolvido na matriz polimérica como uma dispersão molecular estável, e nesta condição a liberação seria mais homogeneia.

V- Conclusões

V. CONCLUSÕES

Foram obtidas micropartículas de CETO nas concentrações de 15%, 25% e 35%, através da técnica de “Spray drying”. Porém com a maior concentração de fármaco não foi possível obter partículas esféricas ou ovaladas, mas sim uma massa amorfa de polímero e fármaco.

A metodologia de análise quantitativa para as micropartículas foi adequadamente validada.

As micropartículas foram caracterizadas e apresentaram-se estáveis e com boa eficiência de encapsulação. O processo de obtenção não alterou a estrutura molecular dos componentes, porém fica evidente através do infravermelho e da análise térmica que a técnica de *Spray drying* promove interação entre eles.

As formulações apresentam diferença quanto à morfologia e tempo de liberação e estas estão relacionadas à proporção fármaco/polímero de cada uma delas.

Com as formulações obtidas foi possível aumentar o tempo de liberação do CETO, porém apenas uma pequena porção do fármaco fica retido no polímero durante esse tempo, atingindo o perfil desejado, a maior parte do CETO é liberada na primeira hora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- AKULA, S.K.; MA, P.E.; PEYMAN, G.A.; RAHIMY, M.H.; HYSLOP, N.E.; JANNEY, A.; ASHTON, P. Treatment of cytomegalovirus retinitis with intravitreal injection liposome encapsulated of ganciclovir in a patient with AIDS. **Brit. J. Ophthalm.**, v. 78, p. 677-680, 1994.
- ANDREO FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, Brasília, v.9, n. 1/5, p.18-21, 1999.
- ANSEL, H. C.; POPHOVICH, N. G; ALLEN JR.;L. V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6^a ed. Tradução Anselmo Gomes de Oliveira et al.. São Paulo: Editora Premier, 2000, p.65.
- ANTHONY, D.; JASINSKI, D.M. Postoperative pain management: Morphine versus ketorolac. **J. Perianest. Nurs.**, v.17, n.1, p. 30-42, 2002.
- BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2nd ed. – Drugs and pharmaceutical sciences; Taylor & Francis group, v.158, p. 1- 122, 2006.
- BONINI-FILHO, M.A.; JORGE,R.; BARBOSA,J.C.; CARDILLO, J.A.; COSTA, R.A. Intravitreal injection versus sub-Tenons infusion of triamcinolone acetonide for refractory diabetic macular edema: a randomized clinical trial. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, p. 3845-3849, 2005
- CALIS, S.; BOSDAG, S.; KAS, H.S.; TUNCAY, M.; HINCAL, A.A. Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glicolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs. **Il Farmaco**, v. 57, p. 55-62, 2002.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer coated nanocapsules as ocular drug carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 153, p. 41-50, 1997.

- CAMPOS, M.A.; SANCHEZ, A.; ALONSO, J.M. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for delivery of drugs to the ocular surface. Application to ciclosporin A. **Int. J. Pharm.**, v. 224, p. 159-168, 2001.
- CARDILLO, J.A.; FARAH, M.E.; MORALES, P.H.; COSTA, R.A.; MELO, L.A.S.; KUPPERMAN, B.; JORGE, R.; ASHTON, P. An intravitreal biodegradable sustained release naproxen and 5-fluorouracil system for treatment of experimental post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. **Brit. J. Ophthalmol.**, v. 95, p. 262-270, 2004.
- CHAUHAN, R.D.; IDOM, C.B.; NOE, H.N. Safety of ketorolac in the pediatric population after ureteroneocystostomy. **J. Urol.**, v.166, p.1873-1875, 2001
- COLTHURST, MJ; WILLIAMS, RL; HISCOTT, PS; GRIERSON. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**, v. 21, i. 7 p.649-665, 2000.
- DALMORA, M.E; DALMORA, S.L; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.**, v.222, p.45-55, 2001.
- Del AMO, E.M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. **Drug Disc. Today**, v.11, p.2, 2008.
- DING, S. Recent development in ophthalmic drug delivery. **PSTT**, v. 1, p. 328-335, 1998.
- DONNENFELD, E.D.; PERRY, H.D.; WITTPENN, J.R.; SOLOMON, R.; NATTIS, A.; CHOU, T. Preoperative ketorolac tromethamine 0,4% in phacoemulsification outcomes. **J. Cat. Ref. Surg.**, v.32, p.1474-1482, 2006.
- DUONG, H.V.Q.; WESTFIELD, K.C.; CHALKLEY, T.H.F. Ketorolac tromethamine LS 0.4% versus nepafenac 0.1% in patients having cataract surgery; prospective randomized double-masked clinical trial. **J. Cat. Ref. Surg.**, v. 33, p.1925–1929, 2007.

- FINCH, C.A. Microencapsulation. In: ELVERS, B.; HAWKINS, S.; SCHULZ, G. **Olmann's encyclopedia of industrial chemistry**. 5th ed. Neinhene: VCH Verlagsgesellschaft, 1990, v.A16, p.575-588.
- FU, Y.J.; SHYU, S.S.; SU, F.H.; YU, P.C. Development of biodegradable co-poly (D,L-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 25, p. 269-279, 2002.
- GEROSKI, H. D.; EDELHAUSER, F.H. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 52, p. 37 – 48, 2001.
- GIUNCHEDI, P.; CONTE, U.; CHETONI, P.; SAETTONE, M.F. Pectin microspheres as ophthalmic carrier for piroxicam evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 9, p. 1-7, 1999.
- GOODMAN & GILMAN, A. **The pharmacological basic of therapeutics**. 9.ed Editora McGraw Hill, 1996.
- HASHIZOE M.; OGURA Y.; KIMURA, H.; MORITERA, T.; HONDA Y.; KYO M.; ION, S.H.; IKADA, Y. Scleral plug of biodegradable polymers for controlled drug release in the vitreous. **Arch. Ophthalmol.**, v. 112, p. 1380-1384, 1994.
- HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, FM. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 52, p.5-16, 2001.
- JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 24, p. 703-727, 1998.
- JORGE R.; QUIRINO, L. S.; CARDILLO, J.A.; OLIVEIRA, A.G.; WANCZINSKI,B.J. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, p. 515-515, 2004.
- KIKUTA, S.H. Campanha nacional de neabilitação : olho no olho. Anexo 1, ed. 2000. Disponível em: <http://www.saudetotal.com>. Acesso em 17 Abr. 2006.

- KIMURA, H.; OGURA, Y.; HASHIZOE, M.; NISHIWAKI, H.; HONDA, Y.; IKADA, Y. A new drug delivery system using an implantable polymer device. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 35, p. 2815-2819, 1994.
- KOMPELLA, B.U.; BANDI, N.; AYALASOMAYAJULA, S.P. Subconjunctival nano and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.**, v. 44, p. 1192-1201, 2003.
- KUNOU, A.; OGURA, Y.; YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; MIYAMOTO, H.; HONDA, Y.; IKADA, Y. Long term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of Cytomegalovirus retinitis. **J. Control. Rel.** v. 68, p. 263-271, 2000.
- LIMA, A.C. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de praziquantel.** 2006. 83f. Dissertação(Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2006.
- MARTINDALE. **The complete drug reference**, 35th ed. London: Pharmaceutical Press, v. 1, 2007, p. 63.
- MASTERS, K. **Spray drying handbook**, 4th ed. London: Longman Scientific and Technical, 1985.
- MAURICE, D.M.; MISHIMA, S. Ocular pharmacokinetics, *in*: SEARS, M.L.(Ed.) **Pharmacology of the Eye**, New York: Spring., 1984, p.19-116.
- McCARRON, P.A.; WOOLFSON, A.D.; KEATING, S.M. Sustained release of 5-fluorouracil from polymeric nanoparticles. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, p. 1451-1459, 2000.
- MEIRELES-TEIXEIRA, J.; MOYA, M.P.; CUPERMAN, J.; MENDONÇA, T.; NAKANAMI, C. Estudo comparativo da eficácia do uso de Prednisolona e Ceterolaco de

Trometamina tópicos após cirurgia de estrabismo. **Arq.Bras.Oftalmol.**, v.66, p.427-429, 2003.

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

-MONTANARI, L.; CILURZO, F.; SELMIN, F.; CONTI, B.; GENTA, I.; POLETTI, G.; ORSINI, F.; VALVO, L. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine: comparison between gamma and beta irradiation effects. **J. Control. Rel.**, v. 90, p. 281-290, 2003.

-MORITERA, T.; OGURA Y.; HONDA, Y.; WADA, R.; HYON, S.H.; IKADA, Y. Microspheres of biodegradable polymer as a drug delivery system in vitreous. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 32, p. 1785-1790, 1991.

-MORITERA, T.; OGURA, Y. ; YOSHIMURA, N.; HONDA, Y.; WADA, R.; HYON, S.H.; ICADA, Y. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 33, p. 3125-3130 , 1992.

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

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

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

- OLIVEIRA, G.A.; SCARPA, V.M.; BUENO, F.H.J.; EVANGELISTA, C.R. Micro e nanocápsulas. Um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 14, p. 37-49, 1992.
- PAGANELLI, F.; CARDILLO, J.A.; MELO JR, L.A.; OLIVEIRA, A.G; SKAF, M.; COSTA,R.A. Brazilian ocular pharmacology and pharmaceutical technology research group. A single intraoperative sub -tenon`s capsule triamcinolone acetone injection for the treatment of post-cataract surgery inflammation. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 111, p. 2102-2108, 2004.
- PIGNATELO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.;PUGLISI, G. Eudragit RS 100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v, 16, p. 53-61, 2002.
- ROTHEN-WEINHOLD, A.; BESSEGHIR, K.; VUARIDEL, E.; SUBLET, E.; OUDRY, N.; GURNY, R. Stability studies of a somatostatin analogue in biodegradable implants. **Int. J. Pharm.**, v.178, p.213-22, 1999.
- SHAH, V.P.; TSONG, Y.; SATHE, P.; LIU, P. **Pham. Res.**, v. 15, p. 889, 1998.
- SILVA, J. E. **Obtenção e caracterização de pellets para liberação prolongada de triancinolona a partir de micropartículas biodegradáveis de ácido poli-lático-co-glicólico.** 2004, 85f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- SILVA-JUNIOR, A.A.; MATOS, J.R; OLIVEIRA, A. G. Evaluation of spray drying process and drug-polymer interactions on the physicochemical stability of biodegradable microspheres containing triamcinolone. In: Polymer Processing Society, 2004 **Am. Reg. Meeting.** Florianópolis-Brazil, cd-room, 2004a.

- SILVA-JUNIOR, A.A.; MATOS, J.R; OLIVEIRA, A. G. Thermal analysis of biodegradable microspheres containing ciprofloxacin. In: Polymer Processing Society, 2004 **Am. Reg. Meeting**. Florianópolis-Brazil, cd-room, 2004b.
- SILVA-JUNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; PESTANA, K.C.; MERCURI, L.P.; MATOS, J.R.; OLIVEIRA, A.G. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. **Thermochim. Acta.**, v.467, p. 91-98, 2008.
- SILVA-JUNIOR, A.A.; WANCZINSKI, B.J.; FORMARIZ, T.P.; OLIVEIRA, A. G. Obtention and characterization of biodegradable microspheres containing triamcinolone. In: Polymer Processing Society, 2004 **Am. Reg. Meeting**. Florianópolis-Brazil, cd-room, 2004a.
- SILVA-JUNIOR, A.A.; WANCZINSKI, B.J.; FORMARIZ, T.P.; OLIVEIRA, A. G. Obtention and characterization of ciprofloxacin loaded biodegradable microspheres by spray drying . In: Polymer Processing Society, 2004 **Am. Reg. Meeting**. Florianópolis-Brazil, cd-room, 2004b.
- SILVA-JUNIOR, A.A. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos**. 2005, 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- SINGH, M.; SHIRLEY, B.; BAJWA, K.; SAMARA, E.; HORA, M.; O'HAGAN. Controlled release of recombinantinsulin like growth factor from a novel formulation of polyactide-co-glycolide microparticles. **J. Control. Rel.**, v. 70, p.21-28, 2001.
- .UHRICH, E.K.; CANIZZARO, MS.; LANGER, S.R.; SHAKESHEFF, M.K. Polymeric system for controlled drug release. **Am. Chem. Soc.**, v. 99, p. 3181-3198, 1998.
- USP. The UNITED STATES pharmacopeia: The official compendia of standards, 29th, 2006, p.1218-1219.

- VEHRING, R.; FOSS, W.R.; LECHUCA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. **J. Aeros. Sci.**, v.38, p.728-746, 2007.
- VELLOSO, A.A.; ZHU Q.; HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, M.F. Ganciclovir loaded polymer microhpheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.38, p. 665-675, 1997.
- WANCZINSKI, B.J. **Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina veiculados em copolímero termosensível (Pluronic F127) para aplicação intraocular**, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- WEBBER, W.H.; LAGO F.; THANOS, C.; MATHIOWITZ, E. Characterization of soluble, salted loaded degradable PLGA films and their of release of tetracycline. **J. Biomed. Res.**, v.41, p. 18-29, 1998.
- YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; TABATA,Y.; OGURA Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Adv. Drug Deliv.**, v. 52, p. 25-36, 2001.
- YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; KUNOU N.; MIYAMOTO H.; HONDA Y.; OGURA Y.; IKADA Y. Biodegradable scleral implant for intravitreal implant controlled release of ganciclovir. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 238, p. 186-190, 2000.
- ZHOU, T.; LEWIS, H.; FOSTER, R.E; SCHWENDEMAN, S.P. Development of a multiple drug delivery implant for intraocular management of proliferative vitreo retinopathy. **J.Control. Rel.**, v. 55, p.281-295, 1998.