

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

DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CONTENDO
VANCOMICINA VEICULADOS EM COPOLÍMERO
TERMOSENSÍVEL (PLURONIC® F127) PARA APLICAÇÃO
INTRAOCULAR

BRUNA JULIANA WANCZINSKI

ARARAQUARA – SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CONTENDO VANCOMICINA
VEICULADOS EM COPOLÍMERO TERMOSENSÍVEL (PLURONIC[®] F127) PARA
APLICAÇÃO INTRAOCULAR

BRUNA JULIANA WANCZINSKI

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

2005

Ficha Catalográfica

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

W244d Wanczinski, Bruna Juliana
Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina veiculados em
copolímero termosensível (Pluronic® F127) para aplicação intraocular /
Bruna Juliana Wanczinski – Araraquara, 2005.
106 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. Lipossomas. 2. Vancomicina. 3. Copolímero termosensível. I. Oliveira,
Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

CDD: 615.1

CAPES: 40300005

Candidata: Bruna Juliana Wanczinski

Título da Dissertação: Desenvolvimento de lipossomas contendo vancomicina veiculados em copolímero termosensível (Pluronic® F127) para aplicação intraocular.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28/02/2005, consideraram a candidata:

REPROVADA

APROVADA _____

1) *Prof. Dr. Acácio Alves de Souza Lima Filho* _____

2) *Prof. Dr. Raul César Evangelista* _____

3) *Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira* _____

***“Fui eu quem fez a areia, como limite do mar
uma fronteira terna que ele não ultrapassa;
suas ondas se agitam, mas nada conseguem:
elas estrondam, mas não conseguem
ultrapassar ”. (Jeremias 5:22)***

*A nossa alienação chega a tal ponto,
que achamos tudo normal.
Nem percebemos que até o invencível mar obedece
a um comando.
Ele tem seus limites na areia
e Deus é mais invencível que ele...*

*Senhor, meu Deus, tu és invencível.
Não há Deus maior, nem no céu, nem na Terra,
nem no universo.*

*Nada sou sem o amor que propagas na tua palavra.
Graças a esse amor, tenho direito
e confio na tua justiça de PAI.*

*Sei que essa justiça não pode chegar a mim gratuitamente,
que devo fazer a minha parte.*

*Não quero isentar-me, Senhor... mas preciso demais
da tua ajuda para ser capaz...*

Esse cantinho é minha forma singela de agradecimento...

*Porque meu grito nunca ecoa sem resposta,
sinto tua presença e no perigo,
estendes tua mão e socorres não só a mim,
mas a minha casa, minha família, meus amigos...*

*Tua generosidade infinita se
estende por todos a quem amo...*

*Obrigada, Pai,
porque me ouves,
embora nem sempre eu te ouça...*

*Perdoe às vezes em que ouço
e não dou importância...
Ajuda-me a ser melhor...*

*Dedico a realização deste trabalho aos meus pais, **Clair e Solange**, que foram o alicerce para a construção dos meus sonhos e não pouparam esforços para a realização da minha formação pessoal e profissional...*

“Como rosas que florescem... dois corações batem mais forte por simples que sejam, a eles destinou-se a sorte. Que sejam bem-aventurados os frutos dos dois corações. Aos que do amor nasceram... o amor seja legado.

E os que o amor concederam... da sorte sejam agrado.”

Neste momento, o meu sincero muito obrigado, pelo legado de amor a mim dedicado. Pelo projeto de sucesso a mim desejado. Por todo o incentivo, compreensão e força. Sorte a minha em ser sua filha!

Pai, mãe, essa conquista é nossa! Talvez à parte dos cumprimentos que diz “boa sorte” seja exclusivamente minha, mas com certeza os parabéns também são seus!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira por ter me conduzido na ciência com toda sua sabedoria, confiança, incentivo e amizade.

Minha gratidão àquele que repartiu comigo seus conhecimentos com dedicação e amizade, no cumprimento de seu dever. Meu carinho àquele que, indo mais longe, me deu afeto e me fez crescer.

Feliz do professor que faz honrar a profissão destacando-se pelo respeito, dedicação e compromisso com os alunos. Estes mestres, como você, mais especiais, deixou sua marca em mim, pois deixou claro que mais importante que o salário ou a situação política atual, é a paixão pela profissão.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti pela confiança, incentivo, apoio e amizade.

“Mestre não é somente quem ensina, mas quem também aprende!” (Guimarães Rosa)

A Profa. Dra. Selma Lucy Franco, Mara Lane Carvalho Cardoso e ao Prof. Marcos Luciano Bruschi pelo apoio, amizade e confiança.

Aos Professores do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela formação acadêmica e intelectual.

Ao Prof. Dr. Celso Santilli do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela colaboração na realização das análises de espalhamento de luz.

Aos Professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos da UNESP, em especial as Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, Maria Palmira Daflon Gremião, Maria Virgínia Scarpa, Chung Man Chin e ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista por ter sanado minhas dúvidas durante o curso e acima de tudo pela amizade e entendimento.

Ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista pela supervisão e orientação no estágio de docência na disciplina de Farmacotécnica.

A vocês mestres queridos, meu MUITO OBRIGADA!

Bruna Juliana Wanczinski

Agradecimentos

Aos médicos e farmacêuticos do grupo de Pesquisa em Oftalmologia (Brazilian Ocular Pharmacology and Pharmaceutical Technology Research Group - BOPP), Luciana Quirino, Rodrigo Jorge, Acácio Alves de Souza Lima Filho e em especial ao Dr. José Augusto Cardillo pela imensa colaboração, apoio, carinho e incentivo.

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente.” (Henfil)

As minhas irmãs, Ana Elisa e Mariana, pelo amor, paciência e amizade.

Aos meus avós, Francisco e Aíde, pelo imenso amor, carinho, confiança a mim dedicado.

Aos meus demais familiares que sempre acreditaram no meu potencial e sempre me acolheram com amor e serenidade.

Aos que foram presença mesmo em nossas ausências... A vocês peço desculpas pela falta de tempo, pelos esquecimentos. A vocês agradeço pelo amor dedicado, pelo incentivo a cada tropeço, por me fazer acreditar no difícil começo. A conquista de hoje também é de vocês, pois ao longo do tempo vocês só me fizeram crescer.

Amo vocês!

A Maicon Elias Silvestre Oliveira pelo amor e carinho a mim dedicado.

As minhas amigas e amigos, Thalita P. Formariz, Beatriz S. Ferreira Cury, Luigina J. Spera, Daniele F. Felipe, Marta R. Santin, Janaína T. Giacobbo, Janaína L. da Silva, Cassiana Mazzer, Denise D. Pelegrini, Juliana V. C. Martins, Arnóbio A. S. Júnior, Nelson Pereira, Marlus Chorilli e Antônio Távora.

Como poderia chegar ao fim dos desafios, se não estivessem ao meu lado?

Como poderia ser uma pessoa melhor, se não houvesse alguém a me ajudar a todo instante? A certeza de poder chorar, sabendo que alguém enxugará minhas lágrimas e não irá rir, tendo a certeza de que compartilhará este momento comigo. Sem dúvida sei que são alguns de meus alicerces nesta árdua jornada. A amizade é o alimento da alma, pois é o amor que não avassala, não destrói, não perturba, somente engrandece. É um sentimento puro e nobre que não cede mesmo ao mais forte dos abalos. E neste momento, gostaria de compartilhar com vocês, MEUS AMIGOS, a alegria que sinto em saber que são as coisas simples que me enchem o espírito com infinita

Bruna Juliana Wanczinski

Agradecimentos

vontade de viver e ser cada dia melhor, da forma como vocês me mostram a cada oportunidade em que estamos juntos.

Aos técnicos do Departamento de Fármacos e Medicamentos, em especial a Margareth Modolo pela amizade verdadeira e singela, pelos momentos de alegria e por fazer parte da minha vida.

“Muitas pessoas irão entrar e sair da sua vida, mas somente verdadeiros amigos deixarão pegadas no seu coração.”

As minhas estagiárias, Kelly e Vanessa pela colaboração e amizade.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Tiana, Olívia, Antonio Lazareto e Euclides pelo apoio a mim concedido.

À Seção de Pós-Graduação, em especial a Laura, Cláudia e Sônia pela amizade e trabalhos prestados.

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências Farmacêuticas da UNESP, em especial a Moacir, Irani, Queila e Ana pelo carinho e serviços prestados.

A todos os colegas da UNESP que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	III
ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	XI
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

RESUMO

As patologias vítreo retinianas são uma das principais causas de perda de visão no mundo. Os olhos representam um desafio no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada ou prolongada de fármacos, em razão de sua sensibilidade e mecanismos fisiológicos de defesa, os quais ocasionam a rápida remoção da substância ativa após a administração tópica. O tratamento sistêmico requer elevadas concentrações de fármaco para se obter um nível terapêutico eficaz nos tecidos intraoculares, além disto, está associado a severos efeitos colaterais e toxicidade. Várias pesquisas visando à liberação de fármacos no segmento posterior dos olhos têm sido desenvolvidas nas últimas décadas. Estes estudos incluem microesferas, nanoesferas, implantes na cavidade vítrea usando polímeros e lipossomas. Lipossomas são sistemas carreadores que compartimentalizam os fármacos e tem sido estudado associado a copolímeros termosensíveis para melhorar a atividade biológica e obter efeito farmacológico prolongado. O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um sistema capaz de oferecer um efeito farmacológico prolongado do fármaco no corpo vítreo visando o tratamento de infecções do segmento posterior dos olhos. Neste trabalho estudou-se a encapsulação do cloridrato de vancomicina (VC) em lipossomas unilamelares pequenos (SUVs) veiculados em copolímero termosensível (Pluronic[®] F127) (PLU). SUVs estruturados com 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH) contendo ou não VC e/ou copolímero termosensível foram obtidos por sonicação. A análise físico-química através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) demonstrou que os lipossomas vazios tiveram o diâmetro reduzido na presença de PLU, entretanto para os lipossomas contendo VC os diâmetros médios aumentaram de 88 a 113 nm, quando a concentração de PLU variou de 5 a 10% (p/p). A separação do fármaco não encapsulado nos lipossomas foi realizada por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-50. A eficiência de encapsulação do

fármaco foi maior nas formulações com lipossomas e copolímero termosensível. Para a formulação contendo diferentes concentrações de fármaco encapsulado em lipossomas e veiculados em PLU 10%, verificou-se que quanto maior a quantidade de fármaco adicionado menor é a eficiência de encapsulação (%). A análise clínica e microbiológica em olhos de coelhos demonstrou que a infecção reduziu com a fórmula lipossomal quando comparada à solução do fármaco livre. Os ensaios de liberação *in vitro* mostraram que o perfil de liberação dos lipossomas contendo VC é mais lento em relação ao fármaco livre. Para os lipossomas contendo VC a liberação é dependente da presença de PLU no sistema, diminuindo com o aumento da concentração de copolímero. O perfil de liberação *in vivo* através da formulação contendo fármaco encapsulado em lipossomas e veiculado em PLU 10% (p/p) mostrou que a encapsulação do fármaco no sistema proposto aumentou a meia-vida de eliminação do antibiótico na cavidade vítrea quando comparada à administração intravítrea do fármaco livre. Estes resultados demonstram o potencial de associação de copolímeros em bloco com lipossomas como um sistema de liberação de fármacos para a VC.

ABSTRACT

The vitreoretinal diseases are one of the main cause of blindness in the world. The eyes represent a challenge in the development of ocular drug delivery systems due to sensitivity and physiological constraints which lead a fast turnover of the drug after topical administration. The systemic route requests high drug concentrations in order to promote efficient therapeutic levels into intraocular tissues. Moreover, this route is associated with side-effects and toxicity. Several of approaches for the drug delivery to the posterior segments of the eye have been developed in the last decades. These novel approaches include microspheres, nanospheres, vitreal implants using polymers and liposomes. Liposomes are a widely used carrier to compartmentalize drugs and have been studied associated with thermosensitive copolymers to improve biological activity and to cause prolonged pharmacological effects. The main purpose of this work was to develop a system which can offer a drug prolonged pharmacological effect in the vitreous cavity to treat infections of posterior part of the eyes. In this work we have studied the encapsulation of vancomycin chloride (VC) in small unilamellar liposomes (SUVs) incorporated in the thermosensitive block copolymer (Pluronic[®] F127) (PLU). SUVs containing 50 mM of hydrogenated soya phosphatidylcholine (PCH) with and without VC and copolymer were prepared by sonication. The physicochemical analysis was carried out through photon correlation spectroscopy (PCS) and the results showed that for empty liposomes the diameter of the structures decreased in the presence of PLU. However, for liposome encapsulated VC the diameter increased from 88 to 113 nm when the concentration of PLU was changed in the range from 5 to 10% (w/w). The separation of the non encapsulated drug was performed by gel exclusion chromatography using Sephadex G-50. The encapsulation efficiency of vancomycin in liposomes vehiculated in block copolymer was higher than without copolymer. For the formulation with different

amounts of the encapsulated drug in liposomes and propagated in PLU 10% (w/w) we observed that when higher amounts of drug are added the encapsulation efficiency is smaller. The eye's rabbits clinical and microbiological analysis showed that the infection decreased with the liposomal preparation when compared with the solution of free drug. The *in vitro* assays showed that the release of liposomal encapsulated VC was slower than the free drug. For the liposomal encapsulated VC the release was dependent on the presence of PLU, decreasing with copolymer amounts. The *in vivo* assay through liposomal encapsulated VC and vehiculated in 10% (w/w) of PLU showed that the liposomal encapsulated VC increased the half-life of elimination of the antibiotic in the vitreous cavity when compared with the intravitreal administration of the free drug. These results demonstrate the potencial of the association of block copolymer with liposomes as a drug delivery system for VC.

ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
ATCC	American Type Culture Collection
C	Controle
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CV	Coefficiente de Variação
D.O₆₀₀	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
EIV	Vesícula obtida por Injeção de Éter
FPV	Vesícula obtida por Extrusão
G	Gauge
IR	Índice de Refração
LUV	Vesícula Unilamelar Grande
MD	Diâmetro Médio
MLV	Vesícula Multilamelar
PC	Fosfatidilcolina de soja
PCH	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
PCS	Espectroscopia de Correlação de Fótons
PLU	Pluronic [®] F127
REV	Vesícula obtida por Evaporação de Fase Reversa
SUV	Vesícula Unilamelar Pequena
<i>t_R</i>	Tempo de Retenção

t₀	Tempo Zero
t_{1/2}	Tempo de Meia-Vida de Eliminação
t_{1/4}	2º Tempo de Meia-Vida de Eliminação
TMC	Temperatura Micelar Crítica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
ULV	Vesícula Unilamelar
VA	Solução aquosa de VC
VC	Cloridrato de vancomicina
VL	Lipossomas de VC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia ocular.....	4
Figura 2. Aspecto estrutural dos lipossomas.....	8
Figura 3. Métodos de obtenção de lipossomas.....	9
Figura 4. Fórmula estrutural dos PLURONICS.....	19
Figura 5. Fórmula estrutural da vancomicina.....	21
Figura 6. Representação esquemática do sistema de liberação in vitro adaptado a cubeta do espectrofotômetro.....	39
Figura 7. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.....	43
Figura 8. Curva padrão do VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2, obtida por espectrofotometria em 280 nm.....	45
Figura 9. Curva padrão do VC em metanol obtida por espectrofotometria em 280 nm.....	47
Figura 10. Cromatograma típico do VC obtido na análise por CLAE em 280 nm.....	48
Figura 11. Curva padrão do VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 obtida por CLAE em 280 nm.....	50
Figura 12. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 5% (p/p).....	52
Figura 13. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 7,5% (p/p).....	52
Figura 14. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 10% (p/p).....	52
Figura 15. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 15% (p/p).....	52
Figura 16. Monitoramento espectrofotométrico de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo solução de VC a 10 mg/mL por espalhamento de luz em 410 nm.....	54
Figura 17. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo VC 10 mg/mL associado a PLU 5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.....	54
Figura 18. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo VC 10 mg/mL associado a PLU 7,5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.....	55

Figura 19. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo VC 10 mg/mL associado a PLU 10% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.....	55
Figura 20. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 por espalhamento de luz em 410 nm	56
Figura 21. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo dispersão de PLU 5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.....	56
Figura 22. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo dispersão de PLU 7,5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.....	57
Figura 23. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de PCH contendo dispersão de PLU 10,0% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.....	57
Figura 24. Influência da variação das concentrações de copolímero termosensível sobre o perfil de formação dos lipossomas.....	58
Figura 25. Influência da variação das concentrações de copolímero termosensível com a adição de VC sobre o perfil de formação dos lipossomas.....	59
Figura 26. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco. SUVs compostos de 50mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e 10 mg/mL de VC. Monitorização da eluição em 410 e 280 nm.....	60
Figura 27. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco contendo PLU 5% (p/p). SUVs compostos de 50mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e 10 mg/mL de VC associado a PLU 5% (p/p). Monitorização da eluição em 410 e 280 nm.....	61

Figura 28. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco contendo PLU 7,5% (p/p). SUVs compostos de 50mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e 10 mg/mL de VC associado a PLU 7,5% (p/p). Monitorização da eluição em 410 e 280 nm.....	61
Figura 29. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco contendo PLU 10,0% (p/p). SUVs compostos de 50mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e 10 mg/mL de VC associado a PLU 10.0% (p/p). Monitorização da eluição em 410 e 280 nm.....	62
Figura 30. Perfil de separação do VC e SUVs compostos de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e quantidades variáveis do fármaco em PLU 10% (p/p), utilizando coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão tris HCl 10 mM pH 7,2 e saturada com vesículas contendo PLU 10% (p/p) isentas de fármaco. Monitorização da eluição em 280 nm.....	65
Figura 31. Encapsulação de diferentes concentrações de cloridrato de vancomicina em PLU 10% (p/p) adicionado ao filme lipídico contendo 50 mM de PCH.....	66
Figura 32. Distribuição de tamanho de lipossomas vazios.....	70
Figura 33. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo PLU 5% (p/p).....	70
Figura 34. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo PLU 7,5% (p/p).....	70
Figura 35. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo PLU10% (p/p).....	70
Figura 36. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo VC	71
Figura 37. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo VC e PLU 5% (p/p).....	71
Figura 38. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo VC e PLU 5% (p/p).....	71
Figura 39. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo VC e PLU 5% (p/p).....	71
Figura 40. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco livre.....	73

Figura 41. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da VC a partir de SUVs.....	73
Figura 42. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da VC em PLU 5% (p/p).....	74
Figura 43. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da VC em PLU 5% (p/p) a partir de SUVs.....	74
Figura 44. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da VC em PLU 7,5% (p/p).....	75
Figura 45. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da VC em PLU 7,5% (p/p) a partir de SUVs.....	75
Figura 46. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da VC em PLU 10,0% (p/p).....	75
Figura 47. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da VC em PLU 10,0% (p/p) a partir de SUVs.....	75
Figura 48. Representação esquemática do processo de liberação <i>in vitro</i>	76
Figura 49. Olho infectado pela administração intravítreal de cepa de <i>S. epidermidis</i>	79
Figura 50. Tratamento com administração intravítreal de VC 10 mg/mL.....	79
Figura 51. Olho infectado pela administração intravítreal de cepa de <i>S. epidermidis</i>	79
Figura 52. Tratamento com administração intravítreal de lipossomas contendo VC 10 mg/mL e PLU 10% (p/p).....	79
Figura 53. Número médio de colônias resultantes de semeadura de vítreo puro dos olhos de coelhos pertencentes ao grupo injetados com lipossomas (VL), tratados com solução aquosa de VC (VA) e controle (C). Pode-se notar a variação do número de colônias 24 horas (Dia 1), 48 horas (Dia 2) e 72 horas (Dia 3) após a injeção intravítrea de antibiótico ou salina.....	80
Figura 54. Cromatograma de amostra de humor vítreo (branco) (a) e amostra de humor vítreo contendo fármaco (b) obtido na análise por CLAE.....	82
Figura 55. Cromatograma de amostra de humor aquoso (branco) (a) e amostra de humor aquoso contendo fármaco (b) obtido na análise por CLAE.....	83
Figura 56. Variação dos níveis de concentração de cloridrato de vancomicina no humor vítreo em função do tempo (dias) com o fármaco livre (a) e encapsulado (b).....	84
Figura 57. Variação dos níveis de concentração de cloridrato de vancomicina no humor aquoso em função do tempo (dias) com o fármaco livre (a) e encapsulado (b).....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação da Absorbância com a concentração de VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.....	44
Tabela 2. Variação da Absorbância com a concentração de VC em metanol.....	46
Tabela 3. Valores de área do pico das soluções de VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.....	49
Tabela 4. Encapsulação média de VC nos lipossomas.....	64
Tabela 5. Valores do índice de refração das amostras.....	67
Tabela 6. Resultados da análise de espalhamento de luz realizada com as amostras.....	69

INTRODUÇÃO

As patologias que acometem o segmento posterior do olho: vitreoretinopatias, endoftalmite, uveíte crônica, necrose retinal aguda e retinite por Citomegalovírus são uma das principais causas de perda de visão no mundo e para as quais não há ainda tratamento adequado e efetivo (VANRELL e REFOJO, 2001).

A endoftalmite é definida como uma inflamação dos tecidos intraoculares em resposta a alguma injúria originada de infecção, trauma, reação imune, mudanças físicas ou químicas, vasculite ou neoplasma (HOMER et al., 1975; KRESLOFF et al., 1998), sendo caracterizada por dor e sinais inflamatórios do segmento anterior e/ou posterior (KRESLOFF et al., 1998).

O tratamento convencional da endoftalmite bacteriana reside na administração de antibióticos, como o cloridrato de vancomicina (VC) ou associações, por via sistêmica, tópica e intravítreal. Entretanto, os maiores problemas relacionados a estes tratamentos são a baixa biodisponibilidade intraocular, altos picos de concentração após a administração tópica, absorção sistêmica do fármaco através do ducto-nasolacrimal, o que pode levar a efeitos colaterais severos e à falta de eficiência no tratamento (LEE et al, 1985; MEISNER e MEZEI, 1995; GEROSKI e EDELHAUSER, 2001; KAUR et al., 2002; 2004; WEI et al., 2002). A administração de antibióticos através de injeção no compartimento vítreo é altamente desconfortável para o paciente, fato relevante quando são necessárias administrações repetidas do fármaco para que o tratamento seja efetivo (ZENG et al., 1993; BOCHOT et al., 2000).

A evolução tecnológica na área farmacêutica proporcionou um grande avanço na oftalmologia com os sistemas de liberação controlada de fármacos (lipossomas, nanopartículas, implantes oculares, entre outros), permitindo o surgimento de novas alternativas para o tratamento das patologias oculares (LE BOURLAIS et al., 1995; OGURA, 2001). Estes dispositivos podem ser administrados por via tópica ou diretamente na cavidade

vítrea permitindo a redução da frequência de administração, maior eficiência e comodidade ao paciente (DING, 1998; LE BOURLAIS et al., 1995; 1998).

Os lipossomas são vesículas formadas por bicamadas lipídicas separadas por fases aquosas e contendo um compartimento aquoso central (GREGORIADIS e POSTE, 1988). São estruturas biocompatíveis e podem proporcionar redução da toxicidade inerente à substância ativa, tornando os fármacos já existentes mais eficientes em relação ao efeito terapêutico e muito mais seletivo em termos de concentração no local de ação, reduzindo desta forma efeitos colaterais e aumentando a duração do efeito farmacológico (VEMURI e RHODES, 1995; OLIVEIRA et al., 1997).

Uma das estratégias que tem sido explorada é a melhoria da adesão nos tecidos do globo ocular, o que pode ser facilitado pela associação de lipossomas com copolímeros termosensíveis, os quais aumentam a viscosidade do meio dispersante proporcionando maior adesão e, conseqüentemente, maior tempo de contato das estruturas com a superfície dos tecidos (LEE, 1985; DURRANI et al., 1992; KENO et al., 1999; CHANDAROY et al., 2001).

Uma classe de polímeros que vem sendo extensivamente estudada é a dos Poloxâm^{er}os, conhecidos comercialmente por Pluronic[®] (PLU), os quais são copolímeros em bloco contendo unidade central de polioxipropileno (hidrofóbica) e duas unidades idênticas de polioxietileno (hidrofílicas), arrançados em uma estrutura básica (MILLER e DONOVAN, 1982; VEYRIES et al., 1999; CHANDAROY et al., 2001; KABANOV et al., 2002; DESNOYER e MCHUGH, 2003). São solúveis em água, não iônicos e apresentam alta biocompatibilidade e solubilidade (VEYRIES et al., 1999; MORISHITA et al., 2001). A estabilidade e atoxicidade das soluções aquosas de PLU o tornam adequado como veículo para injetáveis (JOHNSTON e MILLER, 1985; GARCIA SAGRADO et al., 1994; VEYRIES et al., 1999).

Na temperatura ambiente, as dispersões de PLU apresentam-se em solução. Entretanto, quando esta é instilada na superfície do olho ou injetada no vítreo, a elevação da temperatura proporciona a transição sol-gel, prolongando o tempo de contato do fármaco com os tecidos locais (LE BOURLAIS et al., 1995; WEI et al., 2002).

A biocompatibilidade, biodegradabilidade e inocuidade dos constituintes estruturais dos lipossomas e do copolímero fazem dos lipossomas um sistema atraente para a administração intravítreal de fármacos. A literatura mostra que em várias situações foram observadas diferenças significativas na distribuição e velocidade de eliminação de fármacos veiculados em lipossomas em relação ao fármaco em solução ou suspensão, como também uma diminuição da toxicidade do fármaco (BARZA et al., 1984; TREMBLAY et al., 1985; WIECHENS et al., 1998; ZANGH e KE, 2003).

A administração intravítreal de fármacos apresenta inconvenientes, como o desconforto e a baixa aceitabilidade do paciente. Entretanto, estes são mais evidentes quando terapias que envolvam esta via forem repetidas e prolongadas. Assim sendo, faz-se necessário estudar artificios capazes de prolongar o tempo de liberação da substância ativa no globo ocular e que possivelmente minimizem os efeitos colaterais oriundos da administração sistêmica de fármacos e proporcionem menor frequência na administração do medicamento.

Um dos principais objetivos da farmacoterapia oftálmica consiste em atingir e manter níveis de concentração adequados da substância ativa nos tecidos intraoculares que sejam terapeuticamente efetivos e não tóxicos, por um período de tempo prolongado (NAGASENKER et al., 1999; MONEM et al., 2000).

O olho humano (Figura 1) pode ser dividido em dois compartimentos principais: segmento anterior e posterior. O segmento anterior é formado pela córnea, câmara anterior, íris, lente cristalino e corpo ciliar. O segmento posterior inclui o corpo vítreo, retina e coróide (COLTHURST et al., 2000; OGURA, 2001).

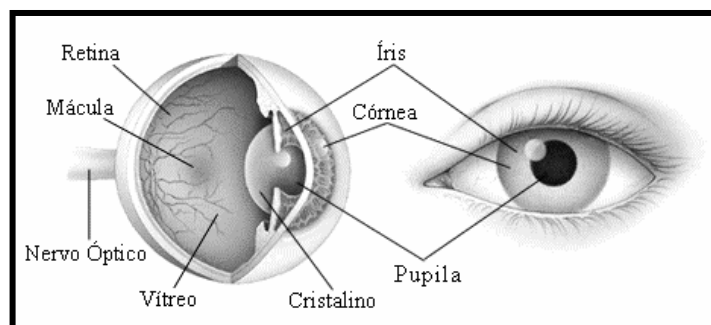


Figura 1. Anatomia ocular (<http://atlas.ucpel.tche.br/nicolau/anato.htm>). Acesso em: 20 fev. 2004.

As patologias vítreo-retinianas: vitreoretinopatias, endoftalmite, uveíte crônica, necrose retinal aguda e retinite por Citomegalovírus são uma das principais causas de perda de visão no mundo e ainda não possuem um tratamento adequado e efetivo (VANRELL e REFOJO, 2001).

Durante séculos, a maioria das preparações oftálmicas destinadas ao tratamento destas patologias consistiam em soluções de aplicação tópica, suspensões e semi-sólidos (MEISNER e MEZEI, 1995). Estas formas farmacêuticas convencionais possuem várias limitações, especialmente quando as estruturas internas dos olhos são acometidas. Estima-se que somente cerca de 5% da dose administrada das preparações oftálmicas convencionais alcancem o

segmento anterior do sistema ocular e conseqüentemente, apenas uma pequena fração sofre partição para a porção posterior dos olhos. Mesmo se a penetração ocorre o tempo de residência do fármaco nos olhos é muito curto, resultando numa pequena duração do efeito (HANNA, 1980; LEE e ROBINSON, 1986; LE BOURLAIS et al., 1995).

A baixa penetração de fármaco nos tecidos oculares é resultado da estrutura anatômica e mecanismos fisiológicos; os quais incluem a relativa permeabilidade seletiva da córnea aos fármacos, a dinâmica lacrimal, a remoção nasolacrimal de fármacos e a existência de uma eficiente barreira hemato-retinal (LEE et al, 1985; MEISNER e MEZEI, 1995; GEROSKI e EDELHAUSER, 2001; KAUR et al., 2002; 2004; WEI et al., 2002). A remoção nasolacrimal de fármacos é uma das vias de introdução de fármacos na circulação sistêmica a partir de formulações tópicas. Para fármacos potentes esta exposição sistêmica através da rota nasolacrimal é suficiente para dar origem a sérios efeitos colaterais. Em virtude da existência da barreira hemato-retinal, a administração sistêmica de fármacos implica na necessidade de elevadas concentrações da substância ativa a fim de atingir concentrações terapêuticas adequadas no segmento posterior dos olhos. Devido à necessidade de altas concentrações de fármaco, a via sistêmica está associada a severos efeitos colaterais (DING, 1998; LI et al., 1987; GEROSKI e EDELHAUSER, 2001).

O curto tempo de permanência do fármaco na córnea leva a necessidade de administrações freqüentes por períodos de tempo prolongados a fim de compensar a diminuição da concentração do fármaco no tecido ocular (MEISNER e MEZEI, 1995; WEI et al., 2002; KAUR et al., 2004), fato este desconfortável ao paciente, provocando sua não adesão ao tratamento e, conseqüentemente, variações nos níveis terapêuticos do fármaco (ANSEL et al., 1995). Administrações repetidas de fármacos podem aumentar a toxicidade, bem como os efeitos colaterais. Além do que, o paciente pode vir a apresentar alguma irritação ou desconforto devido à presença de determinado conservante ou ao pH da

preparação. Dessa forma, o tratamento de doenças localizadas na seção posterior dos olhos através de formas farmacêuticas convencionais, geralmente é ineficiente em razão da baixa concentração de fármaco que penetra nesta região (LANG, 1995; OGURA, 2001; VANRELL e REFOJO, 2001).

Como observado em outras terapias, muitos sistemas de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos, o que pode ser avaliado pelo surgimento de publicações especializadas e pesquisas sendo desenvolvidas. Embora, colírios e suspensões, ainda sejam formas farmacêuticas utilizadas com maior frequência, vários sistemas de liberação ocular de fármacos têm sido introduzidos na terapêutica a fim de regular tanto o acesso quanto à disponibilidade da substância ativa no seu ambiente alvo minimizando os efeitos colaterais e mantendo uma concentração adequada e eficaz por um período de tempo prolongado. Estes sistemas incluem soluções poliméricas, implantes oculares, filmes hidrofílicos e sistemas coloidais, como nanopartículas e lipossomas (LE BOURLAIS et al., 1995; OGURA, 2001), os quais podem ser administrados por via tópica ou diretamente na cavidade vítrea e permitem a redução da frequência de administração trazendo comodidade ao paciente e maior eficiência (OGURA, 2001; DING, 1998; LE BOURLAIS et al., 1995).

Os sistemas coloidais de veiculação de fármacos, tais como lipossomas têm sido empregados na área farmacêutica desde que podem compartimentalizar os fármacos, modificando sua velocidade de liberação no meio biológico (OLIVEIRA et al., 1997).

LIPOSSOMAS

Lipossomas são vesículas microscópicas formadas por bicamadas lipídicas alternadas por compartimentos aquosos (GREGORIADIS, 1988).

O termo lipossoma foi utilizado por Bangham durante a década de 60 para descrever as estruturas de bicamadas multilamelares formadas pela adição de excesso de água a fosfolipídeos secos (BANGHAM et al., 1972).

Segundo New (1990), os fosfolipídeos mais utilizados na construção de modelos de membranas são as moléculas de fosfatidilcolina ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), provavelmente em razão de sua carga neutra, inércia química e similaridade com as membranas biológicas. A fosfatidilcolina, conhecida também como lecitina, pode ser derivada de fontes naturais e sintéticas, podendo ser obtida a partir da gema dos ovos e grãos de soja.

Estudos de biocompatibilidade demonstraram melhores resultados com o uso de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FOONG et al., 1989). Este fosfolipídeo é obtido a partir da fosfatidilcolina de soja através de um processo de hidrogenação catalítica (LANG et al., 1990).

A fosfatidilcolina de soja hidrogenada apresenta alta estabilidade frente à oxidação quando comparada a fosfatidilcolina de soja devido à ausência parcial ou total de ácidos graxos poliinsaturados (LANG et al., 1990), os quais possuem um papel fundamental no processo de peroxidação lipídica caracterizado por reações em cadeia induzida por diferentes fontes de radicais livres tais como reações enzimáticas, irradiação ionizante e luz ultravioleta (STOJANOVIC et al., 2001) que levam a desestabilização do sistema.

Devido à natureza dos componentes usados em sua preparação, lipossomas são considerados vesículas biocompatíveis. Podem proporcionar redução da toxicidade inerente ao fármaco, como também aumento da eficácia da substância ativa (VEMURI e RHODES, 1995; OLIVEIRA et al., 1997).

Em razão de sua estrutura versátil (Figura 2) em termos de tamanho, composição, carga superficial, fluidez da bicamada, podem encapsular compostos polares e apolares. Substâncias hidrofílicas podem ser encapsuladas no compartimento aquoso, enquanto que

substâncias lipofílicas podem ser incorporadas na bicamada lipídica (LOPES e OLIVEIRA, 2000).

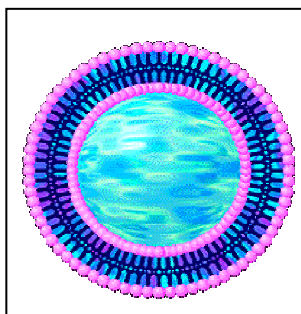


Figura 2. Aspecto estrutural dos lipossomas (Engelhard Personal Care Materials, 2004).

- **Preparação de lipossomas**

Numerosos procedimentos experimentais têm sido desenvolvidos para a preparação de lipossomas, entretanto somente poucos deles são capazes de encapsular grandes quantidades de fármacos solúveis em água. As moléculas de fármaco podem ser encapsuladas em lipossomas através da técnica de evaporação de fase-reversa (SZOKA e PAPAHADJOPOULOS, 1978), injeção de solvente (DEAMER e BANGHAM, 1976; SCHIEREN et al., 1978), liofilização (PICK, 1981), extrusão (HAMILTON et al., 1980), sonicação (HAUNG, 1969), métodos mais recentes como a técnica de evaporação de fase-reversa com fluido supercrítico (IMURA et al., 2002) e filtração (KATAYAMA et al., 2002) têm sido estudados. Em geral, todos os métodos de preparação envolvem três ou quatro estágios básicos: solubilização dos lipídios em solvente orgânico, remoção do solvente orgânico da solução de lipídios, dispersão dos lipídios em meio aquoso e purificação dos lipossomas (NEW, 1990).

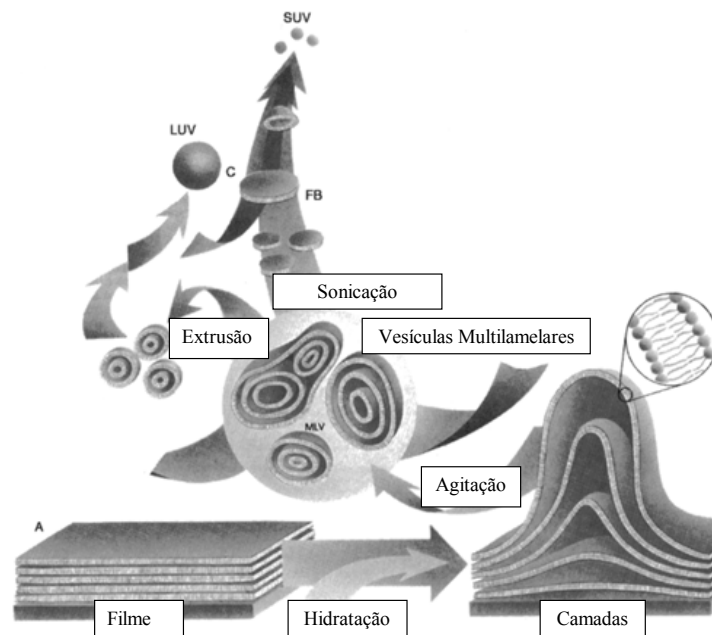


Figura 3. Métodos de obtenção de lipossomas (LASIC, 1997).

Estes métodos podem levar a obtenção de vesículas unilamelares pequenas ou grandes (SUVs e LUVs, respectivamente) ou multilamelares (MLV) (Figura 3). MLVs são formados pela hidratação do filme lipídico seguida por agitação vigorosa em vórtex, enquanto que os LUVs em sua maioria são produzidos por evaporação de fase reversa. SUVs podem ser preparados submetendo as suspensões de MLVs ou LUVs a sonicação, procedimento no qual a preparação de MLV é submetida à radiação de ondas de ultra-som, as quais quebram as vesículas multilamelares em vesículas de tamanho reduzido assegurando a obtenção de uma população homogênea de vesículas (VEMURI e RHODES, 1995; MEISNER e MEZEI, 1995; BOCHOT et al., 2000).

A grande variedade de métodos usados na obtenção desses agregados tem permitido dimensionar lipossomas de diferentes tipos, tamanho e estabilidade, o que tem gerado diferentes possibilidades de aplicações como sistemas transportadores de fármacos (OLIVEIRA et al., 1997). A simplicidade da preparação e sua versatilidade em termos de

incorporação de substâncias de diferentes graus de hidro/lipofilia habilitam os lipossomas como sistemas de liberação de fármacos pela via ocular (LE BOURLAIS et al., 1995).

- **Classificação de lipossomas**

Os lipossomas podem ser classificados pelo método de preparação, número de bicamadas presentes na vesícula, ou pelo tamanho. Quando lipossomas são descritos baseando-se no número de bicamadas eles são classificados em vesículas unilamelares (ULV) ou vesículas multilamelares (MLV). Quanto ao método de preparação “REV” são vesículas obtidas através de evaporação de fase-reversa; “FPV” são vesículas obtidas por extrusão ou “French Pressure Vesicle”; “EIV” vesículas obtidas por injeção de éter. Em relação ao tamanho dos lipossomas estes são classificados em vesículas unilamelares grandes (LUVs) e vesículas unilamelares pequenas (SUVs). A descrição mais comumente utilizada é aquela baseada no tamanho e lamelaridade da vesícula (VEMURI e RHODES, 1995).

Lipossomas preparados e descritos segundo Bangham (1974) são misturas de MLV e ULV. As vesículas multilamelares (MLVs), possuem um tamanho médio de 100 a 1000 nm, na qual cada vesícula geralmente consiste de cinco ou mais lamelas concêntricas (NEW, 1990). As MLVs se formam espontaneamente quando um excesso de volume de solução aquosa é adicionada aos lipídios previamente secos por meio de evaporação em balão de fundo redondo sob vácuo. O tempo seguido de hidratação da camada de lipídio com solução de fármaco em tampão aquoso determina a quantidade de fármaco a ser encapsulado dentro das vesículas, como também influencia o tamanho das MLV (OLSON et al., 1979).

Bangham (1977) demonstrou que a eficiência de encapsulação pode ser aumentada pelo tempo de hidratação do filme seco. Assim, o método de preparação, o tempo de hidratação e a espessura do filme lipídico podem influenciar as características das MLV que são preparadas a partir de lipídios com composição similares (VEMURI e RHODES, 1995).

De acordo com New (1990), vesículas unilamelares pequenas (SUVs) são definidas como lipossomas de tamanho médio entre 15 a 25 nm. Podem ser preparadas por técnicas comumente empregadas como sonicação (HAUNG, 1969) e extrusão (HAMILTON et al., 1980), injeção de solvente (DEAMER e BANGHAM, 1976) ou por um método alternativo através da injeção de etanol descrito por Batzri e Korn (1973).

Vesículas unilamelares grandes (LUVs) consistem de lipossomas com diâmetros na ordem de 1000 nm (NEW, 1990). O tamanho de LUV é um tópico muito debatido, pois segundo Vemuri e Rhodes (1995) o termo “large” refere-se a estruturas vesiculares grandes, e maiores que 100 nm. São capazes de aprisionar grandes volumes de soluções em sua cavidade e possuem alta eficiência de encapsulação quando comparadas as MLV. Outras vantagens de LUVs resultam da maior quantidade de fármaco encapsulado numa menor quantidade de lipídio utilizada e reprodutibilidade da taxa de liberação do fármaco (TIRREL et al., 1976). LUVs podem ser produzidos através do método de evaporação de fase-reversa (VEMURI e RHODES, 1995).

- **Caracterização de lipossomas**

A caracterização detalhada da estrutura dos lipossomas, incluindo distribuição de tamanho, número de bicamadas e volume de encapsulação é importante, uma vez que ela fornece informações importantes sobre diferenças na estrutura causadas por mudanças no método de preparação e na composição lipídica. Estas diferenças na estrutura afetam o comportamento das vesículas *in vitro*, assim como *in vivo*. Assim, uma definição apropriada da estrutura é essencial para obtenção de resultados reprodutíveis, um pré-requisito fundamental para o emprego satisfatório dos lipossomas na terapêutica (JOUSMA et al., 1987; VIDAL, 1993; LIMA, 1998).

Dentre as características que mais refletem as variações entre os distintos tipos de lipossomas estão àquelas relacionadas a encapsulação de fármacos pelas vesículas. A eficiência de encapsulação pode ser expressa de várias maneiras:

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

Várias técnicas podem ser utilizadas para caracterizar preparações de lipossomas, entre as quais: espalhamento de luz (*Dynamic Light Scattering*), cromatografia, centrifugação, diálise, eletroforese, ressonância magnética nuclear e a microscopia eletrônica por criofratura (LESIEUR et al., 1991; LIMA, 1998).

Um dos meios mais utilizados para caracterizar as partículas coloidais é através da técnica de espalhamento de luz, também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS), esta fornece dados sobre o movimento translacional das vesículas, permitindo o cálculo do tamanho dos lipossomas através de relações empíricas adequadas (NEW, 1990).

- **Esterilização de Lipossomas**

Pirogênios podem causar febre e choque. Fontes comuns de pirogênios são microrganismos, em particular os que produzem endotoxinas. É extremamente difícil remover todos os pirogênios das dispersões de lipossomas (VAN WINDEN, 1998).

Os seguintes procedimentos podem ser utilizados na esterilização de lipossomas: autoclavagem, utilização de óxido de etileno, uso de radiação gama e filtração.

O calor úmido sob pressão (121°C/5min) é o método de esterilização preferido por várias razões. Primeiramente, por ser um procedimento simples e extensivamente validado podendo ser empregado no produto final. Entretanto, esta técnica é restrita em razão da eficácia limitada contra os esporos de *Bacillus stearothermophilus*, além disso, somente lipossomas de composição adequada e com fármacos estáveis ao calor podem ser submetidos a este processo (VAN WINDEN, 1998). A literatura descreve que produtos de degradação podem ser formados durante o aquecimento inviabilizando a técnica (KIKUCHI et al., 1991). Estudos indicam que uma baixa dose de radiação gama combinada com filtração proporciona uma esterilização eficiente dos lipossomas que não podem ser esterilizados por autoclavagem (VAN WINDEN, 1998).

A esterilização de fármacos labéis pode ser realizada através do tratamento com óxido de etileno nos lipossomas liofilizados. O óxido de etileno atua como um agente alquilante exercendo efeito letal sobre os microrganismos por alquilação de proteínas, DNA e RNA. Entretanto, este procedimento não é muito utilizado devido à possibilidade da existência de resíduos tóxicos que podem prejudicar o paciente (FRANK e HUANG, 1996; VAN WINDEN, 1998).

A esterilização por meio da radiação gama é um método caracterizado pela utilização de baixas temperaturas, permitindo aplicação em materiais termosensíveis. Contudo, o uso desta técnica de esterilização merece ainda mais estudos, em razão da degradação de fosfolípídeos nos lipossomas (KONINGS, 1984; VAN WINDEN, 1998).

Um dos procedimentos mais utilizados na preparação de lipossomas estéreis é a filtração (FREISE, 1984; NEW, 1990; VAN WINDEN, 1998). A filtração difere dos demais procedimentos de esterilização pela característica de remover fisicamente os microrganismos ao invés de inativá-los. Esta remoção de partículas, inclusive de endotoxinas envolve tanto um efeito de exclusão por tamanho quanto à adsorção que é responsável pela retenção de

partículas menores que os poros da membrana. A maior vantagem desta técnica é o fato de ser um procedimento não destrutivo. Porém, este método é aplicado a lipossomas de tamanhos suficientemente pequenos que devem passar através dos poros de uma membrana de aproximadamente 0,20 μm (FREISE, 1984). Para vesículas maiores, todos os estágios de produção devem ser realizados em condições assépticas (salas limpas). Recomenda-se a passagem das soluções orgânicas de lipídeos através de filtros de membrana de celulose com poros de aproximadamente 0,45 μm com a finalidade de se remover microrganismos, esporos e materiais pirogênicos (NEW, 1990; VAN WINDEN, 1998).

A esterilização da dispersão de lipossomas com mais de uma técnica em condições relativamente brandas pode resultar em um limite de contaminação aceitável e pequena destruição dos lipossomas.

- **Aplicações clínicas – Liberação Ocular de Fármacos**

A encapsulação de fármacos em lipossomas pode proporcionar maiores concentrações da substância ativa nos tecidos intraoculares, como também promover a liberação prolongada da substância ativa na córnea e direcionar fármacos para o segmento posterior dos olhos, como o vítreo (AKULA et al., 1994; BOCHOT et al., 2000).

A terapia intravítreal é limitada por basicamente dois problemas. Primeiramente, muitos fármacos são rapidamente eliminados a partir do humor vítreo, e para se alcançar e manter uma terapia efetiva injeções repetidas são necessárias, o que aumenta a probabilidade de endoftalmite, dano ao cristalino e ataque retinal, sendo, assim, fracamente tolerada pelo paciente. Em segundo lugar, alguns fármacos possuem uma toxicidade inerente em sua dose efetiva induzindo efeitos adversos, como catarata, astigmatismo, hemorragia vítrea, endoftalmite asséptica e, possivelmente toxicidade retinal após injeções intravítreas repetidas (ZENG et al., 1993; BOCHOT et al., 2000).

Segundo Bochet et al. (2000), a liberação prolongada de fármacos no olho é urgentemente necessária para tratar doenças oculares crônicas, especialmente em ocasiões na qual a terapia sistêmica vem acompanhada de efeitos colaterais e injeções intravítreas repetidas de alto risco. Neste contexto, os lipossomas podem ser considerados um sistema de liberação ocular de fármacos para a administração intravitreal, pelos seguintes motivos:

- São biocompatíveis e biodegradáveis;
- São compostos de lipídeos similares aos presentes nas membranas biológicas;
- Podem encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos;
- Podem incorporar quantidades precisas de fármacos;
- Prolongam o tempo de transição do fármaco, resultado da difusão da substância ativa através das numerosas membranas fosfolipídicas;
- Seu tamanho ajuda a garantir que irão permanecer no local da injeção;
- Protegem o fármaco encapsulado de degradação metabólica;
- A preparação pode ser administrada na forma líquida, usando uma agulha de 27 ou 30 Gauge (G);
- Pode proporcionar uma maneira conveniente de se obter liberação lenta do fármaco a partir de um reservatório relativamente inerte sem alterar a propriedade do fármaco encapsulado.

O primeiro estudo utilizando lipossomas na terapia oftálmica foi relatado por Smolin et al. (1981), os quais compararam a eficácia entre uma solução de idoxuridina e sua fórmula lipossomal no tratamento da queratite herpética crônica provocada em olhos de coelhos, e concluíram que a encapsulação do fármaco em lipossomas mostrou ser mais eficaz em relação ao mesmo regime terapêutico do fármaco em solução.

O sucesso inicial obtido por estes pesquisadores levou outros cientistas a explorar o potencial dos lipossomas como um sistema de liberação ocular de fármacos.

Singh e Mezei (1983) observaram um aumento significativo na concentração de triancinolona no humor aquoso, após a administração do fármaco encapsulado em lipossomas.

Pleyer et al. (1994) investigaram a habilidade dos lipossomas em liberar ciclosporina nos olhos. O fármaco foi aplicado topicamente em meio oleoso (controle), na forma lipossomal e em fibras de colágeno aliado aos lipossomas. Ambas as fórmulas teste demonstraram a superioridade dos lipossomas frente ao veículo oleoso, como também a possibilidade de utilizar lipossomas em associação ao colágeno ampliando desta forma a propriedade de liberação lenta.

Zangh e Ke (2003) verificaram que a instilação de lipossomas contendo pilocarpina em olhos de coelhos provocou um aumento da biodisponibilidade ocular e da duração do efeito farmacológico quando comparado à solução de pilocarpina.

Barza et al. (1984) verificaram diferenças significantes na eliminação e distribuição de gentamicina na conjuntiva com a forma lipossomal, acima de 24 horas, após a injeção intravitreal. Entretanto, alguns experimentos com ciclosporina encapsulada em lipossomas não obtiveram vantagens quando comparada ao fármaco livre (ALGHADYAN et al., 1988).

Tremblay et al. (1985) verificaram que a anfotericina B, fármaco de escolha no tratamento de infecções fúngicas oculares, quando encapsulado em lipossomas unilamelares apresentou menor toxicidade em relação ao fármaco livre após a administração intravitreal deste antibiótico em olhos de coelhos.

Peyman et al. (1989) observaram que a administração intravitreal de lipossomas, contendo ganciclovir em coelhos prolonga o tempo de residência do fármaco em até 14 dias após a sua administração, sem evidências de toxicidade.

Kim e Kim (1990) verificaram que a concentração de tobramicina encapsulada em lipossomas no vítreo foi superior a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para *Pseudomonas aeruginosa* ainda após 18 dias da injeção intravítreal deste fármaco em coelhos.

Wiechens et al. (1998) observaram que a incorporação de ciprofloxacino, antibiótico utilizado no tratamento de endoftalmite bacteriana, em lipossomas aumentou a biodisponibilidade do fármaco em 3 dias, após a administração intravítreal deste antibiótico em olhos de coelhos. Observou-se também que os níveis de fármaco ainda permaneciam maiores que a CIM dos microrganismos causadores desta patologia.

Gupta et al. (2000) demonstraram que a encapsulação de fluconazol em lipossomas aumentou de modo significativo à meia-vida do fármaco na cavidade vítrea, após a respectiva administração intravítreal do fármaco em coelhos e análises quantitativas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Shinobara et al. (2003) concluíram que a daunorubicina encapsulada em lipossomas apresenta potencial no tratamento da vitreoretinopatia proliferativa, sem proporcionar danos à retina.

A encapsulação de fármacos em lipossomas é fortemente influenciada pela composição lipídica, carga superficial, propriedades físico-químicas do fármaco e a interação entre o fármaco e as vesículas lipídicas (SCHAEFFER e KROHN, 1982; MEISNER e MEZEI, 1995; KAUR et al., 2004).

Estudos farmacológicos têm demonstrado que vesículas com carga superficial positiva possuem um desempenho melhor quando comparadas às vesículas de carga neutra ou negativa. Estudos *in vitro* evidenciam que a ligação dos lipossomas na área precorneal aumenta na seguinte ordem: carga superficial positiva > negativa > neutra (SHEK e BARBER, 1987; MEISNER e MEZEI, 1995).

A retenção de lipossomas na superfície corneal talvez represente o maior desafio para um sistema de liberação ocular de fármacos efetivo (MEISNER e MEZEI, 1995).

Vários estudos têm demonstrado que a interação de uma carga superficial positiva nas vesículas pode prolongar o tempo de retenção precorneal, melhorando desta forma a biodisponibilidade ocular e aumentando a duração do efeito farmacológico.

Shek e Barber (1987) sugeriram que lipossomas com carga superficial positiva podem formar uma adsorção mais estável devido à carga negativa do muco no epitélio corneal. Entretanto, alguns lipídeos positivos, p.e. estearilamina, parecem possuir toxicidade as células e ser irritante aos olhos.

Outros pesquisadores têm empregado diferentes substâncias para formular vesículas com um maior tempo de retenção, habilidade de direcioná-las ao epitélio corneal ou a outros tecidos oculares.

Embora, o mecanismo de adesão dos lipossomas à córnea ainda não estar totalmente esclarecido, existem algumas teorias, entre estas a ligação entre o muco e a carga superficial positiva das vesículas, formação de ligações químicas entre os análogos e a superfície celular, inibição da drenagem pelos lipossomas (MEISNER e MEZEI, 1995).

A baixa viscosidade das soluções coloidais tende a não permitir um tempo de retenção suficiente do fármaco na córnea (BOCHOT et al., 1998). Com base nisto, várias estratégias têm sido exploradas a fim de facilitar a adesão de lipossomas no globo ocular, levando ao prolongamento do tempo de retenção dos lipossomas na córnea e favorecendo a uma penetração mais ativa do fármaco no tecido ocular. Um dos métodos mais efetivos de modificação é a utilização de lipossomas com polímeros (KENO et al., 1999; CHANDAROY et al., 2001), os quais aumentam a viscosidade do meio dispersante proporcionando melhor adesão e, por extensão, maior tempo de contato das estruturas com a superfície dos tecidos (LEE, 1985; DURRANI et al., 1992; KENO et al., 1999; CHANDAROY et al., 2001).

Uma classe de polímeros que vem sendo extensivamente estudada é a dos Poloxâmeros, conhecidos comercialmente por PLU (Figura 4), os quais são copolímeros em blocos contendo unidade central de polioxipropileno (hidrofóbica) e duas unidades idênticas de polioxietileno (hidrofilicas), arranjados em uma estrutura básica (MILLER e DONOVAN, 1982; VEYRIES et al., 1999; CHANDAROY et al., 2001; KABANOV et al., 2002; DESNOYER e MCHUGH, 2003). São solúveis em água, não iônicos e apresentam alta biocompatibilidade e solubilidade (VEYRIES et al., 1999; MORISHITA et al., 2001). A estabilidade e atoxicidade das soluções aquosas de PLU o tornam adequado como veículo para injetáveis (JOHNSTON e MILLER, 1985; GARCIA SAGRADO et al., 1994; VEYRIES et al., 1999).

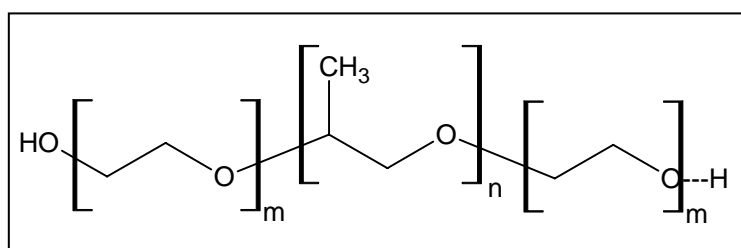


Figura 4. Fórmula estrutural dos PLURONICS.

Dispersões de PLU apresentam características reológicas de termosensibilidade (SCHMOLKA, 1972), de forma que com o aumento da temperatura, ocorre a formação de micelas, de modo que a porção de polioxipropileno forma uma coroa circundada pela porção de polioxietileno dando origem a um sistema gel biodegradável (WANKA et al., 1990; WANKA et al., 1994; ANDERSON et al., 2001). A existência de uma fase aquosa e uma microfase micelar permite que fármacos lipofílicos sejam dissolvidos em concentrações maiores quando comparado a soluções aquosas (SAETTONE et al., 1988; JAFERT et al., 1994; LEE et al., 1997). No organismo, o gel atrai água e se dissolve causando a liberação do

fármaco, a qual é dependente da dissolução do gel (ANDERSON et al., 2001). Segundo Jeong et al. (2002) esta dependência da temperatura na formação de micelas é muito importante na liberação de fármacos sob vários aspectos, pois abaixo da temperatura micelar crítica (TMC) o equilíbrio é deslocado para a formação de monômeros de PLU e fármaco livre, enquanto que em temperaturas mais altas o equilíbrio favorece a formação de micelas esféricas contendo o fármaco livre e, reduzindo, desta forma, o número de monômeros não associados em solução. A fase líquida-fase gel, também é extremamente dependente da concentração de PLU (EDSMAN et al., 1998; JEONG et al., 2002) e pode ser alterada por sais (PANDIT e KISAKA, 1996).

Na temperatura ambiente, as dispersões de PLU apresentam-se em solução, entretanto, quando esta é instilada na superfície do olho ou injetada no vítreo, a elevação da temperatura proporciona a transição sol-gel, prolongando o tempo de contato do fármaco com os tecidos locais (LE BOURLAIS et al., 1995; WEI et al., 2002).

A associação de lipossomas contendo o fármaco com o copolímero termosensível PLU, pode promover desta forma a liberação prolongada da substância ativa no local da infecção (JAMSHOID et al., 1988; WOODLE et al., 1992; CHANDAROY et al., 2001), além de favorecer a retenção de lipossomas na superfície ocular e uma melhora da atividade do fármaco no vítreo.

FÁRMACO - VC

A vancomicina (Figura 5) é um antibiótico glicopeptídico tricíclico e com peso molecular de aproximadamente 1500 Daltons (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2001; THE MERCK INDEX, 2001; MARTINDALE, 2002; USP, 2002).

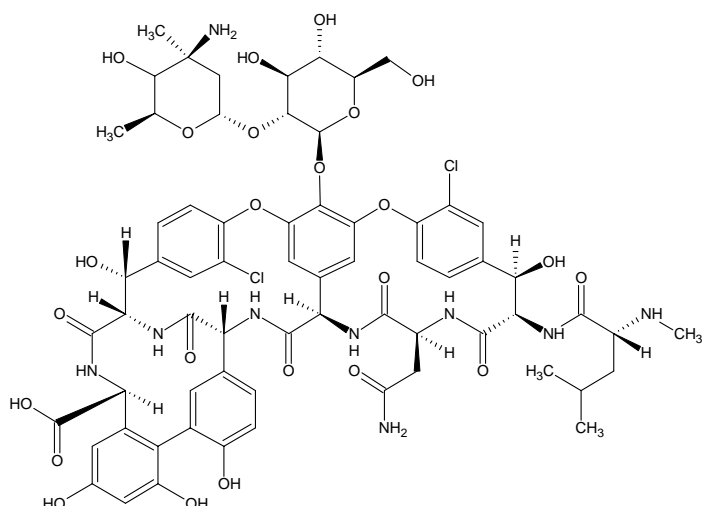


Figura 5. Fórmula estrutural da vancomicina.

Suas características organolépticas e físico-químicas incluem: cor castanha clara, pouco odor, pó higroscópico. Possui 3 grupos de fenóis ionizáveis ($pK_a=7,2$; $8,6$ e $9,6$), um grupo ácido carboxílico ($pK_a=2,9$) e 2 grupos amina ($pK_a=10,4$ e $11,7$) (BERTHOLD et al., 1996). Na forma de cloridrato é altamente solúvel em água e insolúvel em éter e em clorofórmio. Apresenta pH de $2,5-4,5$ em solução aquosa a 5%. As soluções são mais estáveis em pH $3,0-5,0$ (USP, 2002).

A vancomicina é ativa primariamente contra cocos gram-positivos, sendo altamente eficaz contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (ROTH e FLYNN, 1997; CHAMBERS, 2001; MARTINDALE, 2002). A maioria dos estafilococos patogênicos, incluindo os produtores de beta-lactamase e os resistentes a nafcilina são destruídos em

concentrações de 10 µg/mL ou menos. Os mutantes resistentes são muito raros em populações susceptíveis, e a resistência clínica desenvolve-se muito lentamente (JAWETZ, 1995). Segundo Chambers (2001) a vancomicina é um dos únicos antibióticos, o qual o *Staphylococcus sp.* é altamente sensível. A vancomicina atua também contra *Streptococcus sp.* (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. viridans* e *S. bovis*), *Enterococcus sp.* (*Enterococcus faecalis*), *Clostridium difficile* e *Corynebacterium sp.* Entretanto, não exerce atividade contra bacilos gram-negativos e micobactérias (CUNHA e RISTUCCIA, 1983; KOROLKOVAS, 1999). Agente bactericida para a maioria dos microrganismos gram-positivos e bacteriostáticos para *Enterococcus sp* (KOROLKOVAS, 1999).

O mecanismo de ação deste antibiótico consiste em inibir a síntese da parede celular de bactérias sensíveis ligando-se com alta afinidade ao terminal D-alanil-D- alanina, precursor da parede celular bacteriana, provocando assim a destruição da célula por lise (CHAMBERS, 2001), também exerce efeito atuando na destruição da membrana citoplasmática do protoplasma e inibindo a síntese do RNA bacteriano (ZANINI et al., 1997; MARTINDALE, 2002).

Segundo Chambers (2001), a vancomicina é pouco absorvida após administração oral, e altas concentrações são excretadas nas fezes. A administração intramuscular está associada à dor e necrose tissular, enquanto que a administração intravenosa está associada a severos efeitos colaterais, sendo os mais relevantes a oto e a nefrotoxicidade (BAILU e NEAL, 1988; CHAMBERS, 2001; MARTINDALE, 2002).

Em oftalmologia, este fármaco é um dos antibióticos mais utilizados no tratamento da endoftalmite (ROTH e FLYNN, 1997), inflamação dos tecidos intraoculares em resposta a alguma injúria originada de infecção, trauma, reação imune, mudanças físicas ou químicas, vasculite ou neoplasma (HOMER et al., 1975; KRESLOFF et al., 1998), sendo caracterizada por dor e sinais inflamatórios do segmento anterior e/ou posterior (KRESLOFF et al., 1998).

Quando a causa desta enfermidade é bacteriana, o agente etiológico mais comum é o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus epidermidis* (HOMER et al., 1975; ROTH e FLYNN, 1997), a infecção progride rapidamente podendo resultar em perda completa da visão ou até mesmo do olho. Apesar do tratamento com antibióticos e corticoesteróides o prognóstico é ruim devido à baixa penetração destes fármacos no compartimento vítreo quando administrados via sistêmica, subconjuntival ou tópica. A administração intravítreal de antibióticos resistentes a cepas de *Staphylococcus* sp., como a vancomicina (WISE, 1973; ROTH e FLYNN, 1997; JACQUIN et al., 2001), parece ser uma opção muito promissora e interessante no tratamento da endoftalmite, haja vista que a maioria dos antibióticos administrados por vias indiretas, como a parenteral, apresenta uma baixa difusão no vítreo quando comparada a altas concentrações adquiridas após a administração intravítreal de fármacos, além do surgimento rápido de cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes aos antibióticos já existentes (HOMER et al., 1975; ROTH e FLYNN, 1997; JACQUIN et al., 2001). O grande problema da administração intravítreal de fármacos está no fato de que, dependendo da patologia, às vezes fazem-se necessárias injeções repetidas para manter a concentração efetiva do fármaco no compartimento vítreo, o que leva a uma certa rejeição por parte do paciente (HOMER et al., 1975; BOCHOT et al., 2000).

Sendo assim, torna-se relevante estudar sistemas capazes de proporcionar uma liberação prolongada do VC no compartimento vítreo colaborando para um tratamento de melhor adesão, reduzindo dose e os efeitos colaterais do fármaco já mencionados anteriormente neste trabalho.

OBJETIVO GERAL:

Desenvolver lipossomas contendo VC veiculados em copolímero termosensível (PLU) como um sistema de liberação prolongada na cavidade vítrea do globo ocular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obter lipossomas contendo VC a partir de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH) e veiculados em PLU;
2. Caracterizar físico-quimicamente o sistema obtido;
3. Estudar o comportamento reológico das dispersões de PLU;
4. Avaliar o perfil de liberação do VC *in vitro*;
5. Avaliar o perfil de liberação do VC *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Substâncias, Reagentes, Matérias-primas e Solventes

- Acetonitrila (Bayer[®], Alemanha)
- Ágar sangue (Merck[®], Alemanha)
- Água deionizada Milli Q
- Álcool etílico absoluto p.a. (Synth[®], Brasil)
- Álcool metílico absoluto p.a. (Synth[®], Brasil)
- Cloridrato de cetamina solução injetável (Cristália[®], Brasil)
- Cloridrato de vancomicina 500 mg na forma de pó liofilizado para solução injetável (União Química[®], Brasil)
- Cloridrato de xilazina solução injetável (Cristália[®], Brasil)
- Clorofórmio p.a (Synth[®], Brasil)
- Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, Epikuron 200 SH[®] (Lucas Meyer, Alemanha)
- Fosfato de amônio monobásico (Merck[®], Alemanha)
- Meio líquido estéril de infusão cérebro-coração (BHI) (Merck[®], Alemanha)
- Pentobarbital solução injetável (Cristália[®], Brasil)
- Pluronic[®] F127 (Sigma Chemical Co[®], Estados Unidos da América)
- Sephadex G-50 (Merck[®], Alemanha)
- Soro fisiológico estéril (Equiplex[®], Brasil)
- Tris (hidroximetil) aminometano p.a. (Sigma Chemical Co[®], Estados Unidos da América)

2. Equipamentos e Acessórios

- Agitador de tubos - Phoenix[®] - mod. AT 56
- Agitador magnético - Fisatom[®] - mod. 713
- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC Star/PDA - Varian[®]), com duas bombas de injeção de solvente (Prostar[®]/Dynamax[®] 2.4), controle automático de fluxo, detector espectrofotométrico com fotodiodo (Prostar[®] 330 UV-VIS PDA), forno controlador de temperatura da coluna, sistema de integração Star[®] e sistema de injeção (Rheodyne[®], VS 7125) com *loop* de 100 µL
- Aparelho para espalhamento dinâmico de luz: Fonte de laser He-Ne 10mW (Hughes[®] - USA); auto correlator 64 canais, software (BrookHaven)
- Areômetros - Incoterm[®]
- Balança analítica standard - Ohaus[®]
- Balança semi-analítica - Gehaka[®]
- Banho criotermostático - Quimis[®]
- Barras de agitação magnética
- Bomba de vácuo - Tecnal[®]
- Centrífuga - Eppendorf[®] - mod. 5415 D
- Centrífuga - Hitachi[®] - mod. CP 80 β
- Coluna para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência RP - 18 (Merck[®] - LiChrospher[®] 5µm), com dimensões de 250 X 4,6 mm e pré-coluna embutida
- Copo de vidro transparente com dupla parede para entrada e saída de água
- Cubetas para espectrofotometria, capacidade de 4mL, caminho óptico de 1cm - Spectrocell[®]

- Dessecador de vidro
- Estufa de secagem - Fanen[®] - mod. 315 SE
- Espectrofotômetro de arranjo de diodo UV - VIS - Hewlett Packard[®] - mod. 8453
- Espectrofotômetro de UV - VIS - Hitachi[®] - mod. U - 2000
- Evaporador rotativo - Marconi[®] - mod. MA 120
- Liofilizador - Edwards[®] - mod. Modulyo
- Membrana de acetato de celulose
- Membrana de policarbonato 0,20 µm - Millipore[®]
- Microseringas - Hamilton[®]
- pHmetro de bancada - Quimis[®] - mod. Q-400 M2
- Pipetas de Pasteur
- Pipetador automático capacidade 10, 100 e 1000 µL - Gilson[®]
- Placas de Petri
- Purificador de água Milli - Q Plus - Millipore[®]
- Refratômetro de Abbé - Atago[®]
- Seringa de 1,0 mL com agulha de 27 e 30 Gauge (G)
- Sonicador (Sonicator - Ultrasonic Liquid Processor, Heat Systems - mod. XL 2020)
- Suporte para filtração - Millipore[®]
- Tubos de centrifuga 10 mL - Sorvall[®]
- Tubos de ensaio
- Tubos de sonicação (7 cm x 2,5 cm, 3 mm de parede interna)
- Tubo de vidro 29 cm x 2,5 cm para coluna cromatográfica

- Vidrarias de uso em laboratório (béquer, pipetas graduada e volumétrica, proveta, kitasato, balão volumétrico, erlenmeyer)
- Viscosímetro Digital Rotativo (Visco Star L-P Select[®] - mod. V 10003)

3. Outros Materiais

- Máquina fotográfica digital Sony[®]
- Oftalmoscópio ri-star[®]
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1755)

4. Animais de Laboratório

- Coelhos albinos (Fêmeas da raça Nova Zelândia)

MÉTODOS

1. Metodologia analítica para a determinação de VC

1.1. Espectrofotometria de UV-VIS

1.1.1. Espectro de máxima absorção do VC

Preparou-se uma solução padrão de VC a 200 µg/mL a partir de uma solução estoque contendo 1000 µg/mL de VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 . Efetuou-se o espectro de varredura no intervalo entre 200 e 600 nm para verificar a região de comprimento de onda que resulta em maior absorção do VC.

1.1.2. Curva padrão do VC

A curva padrão do VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 e em metanol foi construída a partir de uma solução estoque contendo 1000 µg/mL de VC. Alíquotas da solução estoque foram adicionadas a 2,0 mL de tampão e metanol diretamente na cubeta do espectrofotômetro de modo a obter concentrações na faixa de 9 a 450 µg/mL (em tampão Tris-HCl) e de 29 a 197 µg/mL (em metanol). A cada adição, homogeneizava-se a solução na própria cubeta e procedia-se diretamente a leitura da absorbância em comprimento de onda de 280 nm, contra um branco de Tris ou metanol.

As análises foram realizadas em triplicata e a curva padrão foi construída com a média dos valores das absorbâncias lidas para cada concentração. Posteriormente, elaborou-se o gráfico relacionando a absorbância em função da concentração de VC. Com os valores experimentais obtidos a curva padrão foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Abs}_{280} = a [\text{VC}] + b$$

Sendo: Abs = absorbância do fármaco obtida em 280 nm;

a = coeficiente angular da reta;

b = intercepto da curva em relação ao eixo da absorvância do fármaco₂₈₀;

[VC] = concentração de VC.

1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

1.2.1. Condições cromatográficas (DEL NOZAL et al., 1996 adaptado)

- *Coluna:* RP C18 (Merck® - LiChrospher® 5µm), com dimensões de 250 x 4,6 mm e pré-coluna embutida
- *Temperatura da coluna:* 25°C
- *Vazão:* 0,7 mL/min
- *Pressão:* 140 bars
- *Detector UV - VIS com fotodiodo*
- $\lambda = 280$ nm
- *Velocidade do papel:* 0,63 cm/min
- *Eluição:* isocrática
- *Fase móvel:* tampão fosfato 0,05 M com 10% de acetonitrila (pH=4,0), pH final ajustado para o valor de 4,0 com HCl e NaOH 0,01 M
- *Volume de injeção:* 100 µL
- *Tempo de corrida:* 20 min

A fase móvel foi preparada com acetonitrila e água purificada em sistema "Milli-Q". A mistura obtida foi filtrada (membrana de teflon de 0,45 µm) e deaerada sob sonicação por 45 minutos.

1.2.2. Curva padrão do VC por CLAE

A curva padrão do VC foi construída a partir de uma solução estoque contendo 1000 µg/mL de cloridrato de VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2. Foram obtidas diluições do fármaco de modo a se obter concentrações na faixa de 6 a 650 µg/mL. Estas soluções foram filtradas em membrana de policarbonato (0,20 µm) e analisadas por CLAE, utilizando as condições cromatográficas especificadas no item 1.2.1. Para cada concentração foram realizadas três determinações. Os resultados foram utilizados para o cálculo da regressão linear, obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação.

A curva padrão foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Área do pico}_{280} = a [\text{VC}] + b$$

Sendo: Área do pico₂₈₀ = área do pico do fármaco obtida em 280 nm;

a = coeficiente angular da reta;

b = intercepto da curva em relação ao eixo da área do pico₂₈₀;

[VC] = concentração de VC.

2. Obtenção das dispersões de PLU

As dispersões de PLU foram obtidas através do método a frio descrito por Schmolka (1972), usando-se 5; 7,5; 10; 12,5 e 15% (p/p) de copolímero em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2. Quantidades apropriadas de PLU foram adicionadas em solução tampão Tris a 5°C para dispersão. As dispersões foram armazenadas sob refrigeração até completa dissolução do copolímero. Posteriormente, as amostras foram mantidas sob refrigeração para conservação e facilidade de manuseio.

3. Estudo reológico das dispersões de PLU

Amostras de 100 g de cada preparação de PLU foram colocadas em um copo de vidro transparente (4,5 cm x 10 cm) de dupla parede com entrada e saída de água na temperatura de $34,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, controlada pelo banho criotermostático.

O estudo reológico foi conduzido com viscosímetro rotativo (Visco Star-LP Select), o qual permite medir eletronicamente a força de torção necessária para superar a resistência da rotação já convertida em viscosidade na unidade de mPa.s. Para as preparações a 5; 7,5 e 10% (p/p) de PLU utilizou-se um cilindro característico de fluídos mais líquidos (L1), já para a preparação a 15% (p/p) um cilindro característico de fluídos mais viscosos (L4).

Os dados foram obtidos em triplicata e representados na forma de gráficos, no qual o eixo das abcissas representa a velocidade (tensão de cisalhamento) e o eixo das ordenadas a viscosidade.

4. Preparação dos lipossomas

- **Formação do filme lipídico**

Em um tubo de sonicação foram adicionados 150 mg de PCH dissolvida em 1,0 mL de clorofórmio. A evaporação do solvente foi promovida com movimentos rotatórios do tubo sob uma corrente de nitrogênio, ocorrendo a formação do filme lipídico nas paredes do tubo. Colocou-se em seguida o tubo com o filme lipídico em dessecador a vácuo até eliminação do solvente por 12 horas.

- **Hidratação do filme lipídico**

Após ser retirado do dessecador, o tubo contendo o filme lipídico foi hidratado com 4,0 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2. Durante 45 minutos o tubo foi deixado em repouso a

fim de promover a hidratação do filme lipídico. Obteve-se uma dispersão contendo 50 mM de PCH como concentração final.

- **Dispersão do filme lipídico**

Ao término do período de hidratação, o tubo foi levado a um agitador do tipo vórtex até o completo desprendimento do filme lipídico das paredes do tubo. Este procedimento originou uma dispersão turva, leitosa.

- **Obtenção de Vesículas Unilamelares Pequenas (SUVs)**

SUVs foram obtidas através da sonicação da dispersão lipídica formada anteriormente. Para tanto, utilizou-se as seguintes condições experimentais: potência de aproximadamente 200 W e pulsos de sonicação de 1 minuto. O perfil de formação de SUVs foi acompanhado medindo-se a diminuição da turbidez da amostra por espectrofotometria em 410 nm, até valores constantes.

Após a sonicação, a dispersão de SUV obtida foi centrifugada a 3.900 rpm por 15 minutos, a fim de eliminar o resíduo de titânio liberado pela haste do sonicador.

5. Preparação de lipossomas contendo PLU

Para a obtenção de lipossomas contendo PLU a 5; 7,5; 10; 12,5 e 15% (p/p) (GASPAR, 2003) seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 4 entretanto os filmes lipídicos foram hidratados com 4,0 mL de dispersões de PLU a 5; 7,5; 10; 12,5 e 15% (p/p), respectivamente. O perfil de formação das vesículas contendo PLU a 12,5 e 15% (p/p) não pode ser determinado devido à formação de um gel altamente viscoso de difícil manuseio antes e após a sonicação. Assim sendo, optou-se por trabalhar com concentrações de copolímero de 5; 7,5 e 10% (p/p).

6. Preparação de lipossomas contendo VC

Para a obtenção de lipossomas contendo VC seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 4. Entretanto o filme lipídico foi hidratado com 4,0 mL de uma solução de VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 na concentração de 10 mg/mL.

7. Preparação de lipossomas contendo VC e PLU

Pesou-se exatamente 40 mg de VC e dissolveu-se em dispersões de PLU na concentração de 5; 7,5 e 10% (p/p). Cada filme lipídico foi hidratado com 4,0 mL destas soluções, respectivamente.

O método de obtenção de lipossomas foi o mesmo descrito anteriormente (item 4).

8. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

8.1. Separação do fármaco não encapsulado

A separação do VC não encapsulado nos lipossomas foi efetuada através da cromatografia de exclusão (DE NOBILI et al., 1989; MACHADO et al., 2001).

Primeiramente, foi preparada uma coluna de Sephadex com a finalidade de separar o cloridrato de vancomicina não encapsulado obtido na formação de lipossomas com este fármaco. Pesou-se 10,0 g de Sephadex G-50, os quais permaneceram por 12 horas com água purificada, suficiente para a hidratação. Depois de hidratada, a solução de Sephadex foi deaerada durante 30 minutos em um compressor a vácuo, posteriormente foi realizado o empacotamento da coluna. Com um tamanho de 29 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro, a coluna foi empacotada, ou seja, a solução de Sephadex previamente hidratada foi passada para a coluna atingindo uma altura de 29 cm.

Após o empacotamento, lavou-se a coluna com aproximadamente 400 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2. Posteriormente, foram aplicados 2,0 mL de lipossomas isentos de

fármaco sobre a coluna, com a finalidade de saturar todos os sítios de ligação do Sephadex. O meio de eluição foi sempre tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2. O fluxo pela coluna foi de aproximadamente 2,0 mL/min. O experimento foi realizado na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Dois mL da preparação de lipossomas contendo VC foram aplicados sobre a coluna, e a eluição foi promovida pelo tampão Tris. Uma vez aplicada a amostra, teve início a coleta de frações eluídas. Foram coletadas 60 frações de aproximadamente 2,0 mL.

Cada fração foi levada ao espectrofotômetro e sua absorbância lida em 2 comprimentos de onda: 410 e 280 nm. Em 410 nm observa-se o perfil de eluição dos lipossomas e em 280 nm é possível acompanhar o perfil de eluição do fármaco.

O mesmo procedimento foi realizado para lipossomas contendo fármaco (10 mg/mL) e concentrações de copolímero de 5; 7,5 e 10% (p/p) em Tris, entretanto a coluna foi previamente saturada com lipossomas isentos de fármaco, mas adicionados de PLU na respectiva concentração de interesse.

8.2. Determinação da Eficiência de Encapsulação

As frações que apresentaram turbidez em 410 nm correspondem às frações contendo lipossomas. Após esta verificação, todas as frações contendo lipossomas foram reunidas e liofilizadas. O resíduo total foi pesado e uma alíquota de 20 mg das frações liofilizadas, diluída adequadamente em 2,5 mL de metanol (solvente que proporciona a ruptura dos lipossomas para que o fármaco encapsulado seja liberado na solução). Em cubeta de quartzo, adicionou-se 1,5 mL da preparação anterior e diluiu-se com mais 0,5 mL de metanol, sendo a concentração de VC determinada espectrofotometricamente. Utilizou-se um branco de lipossomas vazios liofilizados e submetidos ao mesmo tratamento para cada amostra. A quantidade de VC encapsulado foi determinado utilizando-se a curva padrão do fármaco em metanol em 280 nm.

8.3. Encapsulação do VC no sistema (lipossomas contendo fármaco e PLU)

Com o intuito de se estudar a encapsulação do VC optou-se por trabalhar com o sistema que será utilizado para avaliação *in vivo*, lipossomas contendo fármaco e PLU 10% (p/p). Vesículas contendo VC em diferentes concentrações (2; 5; 7,5; 10; 12,5, 15 e 20 mg/mL) veiculadas em gel de PLU 10% (p/p) foram obtidas sendo a separação do fármaco não encapsulado e a eficiência de encapsulação determinados conforme metodologias propostas nos itens 8.1 e 8.2.

8.4. Índice de Refração dos lipossomas

A determinação do índice de refração dos lipossomas foi realizada conforme a Farmacopéia Brasileira 4ª Ed. (1988). O refratômetro de Abbé foi aferido a 20°C com água bidestilada e tratada em aparelho Millipore (índice de refração 1,3325). O experimento foi realizado a 20°C e as análises foram obtidas em triplicata.

8.4.1. Diâmetro Médio das Partículas dos Lipossomas

A análise do tamanho dos lipossomas foi realizada através da técnica de espalhamento de luz (*Dynamic Light Scattering*), também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS).

Esta técnica fornece o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, o qual pode ser calculado pela equação de Einstein-Stokes através da qual se determina o coeficiente de difusão das gotículas através da variação do espalhamento de luz causado pelo movimento Browniano das gotículas. O cálculo é obtido pela equação de Einstein-Stokes:

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

em que, **K** é a constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-16} \text{ ergK}^{-1}$), **T** a temperatura absoluta (293 K), π (3,141516), η a viscosidade do meio (1,002 cps) e r_h o raio hidrodinâmico. Como o r_h aumenta quando o coeficiente de difusão diminui, é necessário realizar diluições das amostras a fim de que a concentração das gotículas não interfira na difusão. Deve-se ter um cuidado especial com a temperatura e viscosidade uma vez que uma pequena variação desses parâmetros pode causar erro nas determinações de tamanho (NEW, 1990).

A técnica de PCS consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada como sinal que é enviado ao correlator, no qual é feito o processamento dos dados. Estes são enviados para um computador onde um software realiza os cálculos fornecendo os valores de tamanho médio e índice de polidispersidade, entre outros (NEW, 1990).

A análise do diâmetro das vesículas foi realizada no laboratório de físico-química do Instituto de Química de Araraquara/SP, com o auxílio de um analisador de partículas por espalhamento de luz, BROOKHAVEN – fonte de laser He-Ne 10mW, $\lambda=532 \text{ nm}$ -HUGHES; auto correlator de 64 canais.

8.4.2. Preparo das amostras para avaliação por espalhamento de luz

Para este ensaio, 200 μL de cada preparação de lipossomas foram diluídos com 5,0 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 e, posteriormente, filtrados em membrana de policarbonato com poros de 0,20 μm de diâmetro e analisadas em analisador de partículas Brookhaven.

As preparações foram mantidas em frascos de cintilação isentos de poeira. Os frascos foram colocados na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão

em toda a sua extensão. A luz espalhada foi captada por um fotomultiplicador posicionado a 90° do feixe de laser que aumenta o sinal captado e o envia para um sistema correlator onde os cálculos são processados e enviados ao computador. A temperatura do sistema foi mantida a 20°C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração variou de acordo com cada amostra analisada.

Foram realizadas 10 determinações de diâmetro para cada amostra e calculado o desvio padrão e o coeficiente de polidispersibilidade, com duração total de 5 minutos.

9. Ensaio de liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* do VC foi determinado em sistema estático, através da membrana de acetato de celulose. Utilizou-se o esquema proposto pela Farmacopéia Americana (USP XXIII, 1995) modificada para a cubeta do espectrofotômetro com 1 cm de caminho óptico e 3 mL de volume do receptor (Figura 6) (ANDRÉO-FILHO, 1999).

Pipetou-se 100 µL da dispersão de lipossomas (equivalente a 1 mg de VC) para que se estabelecessem as condições *sink* de ensaio. Esta amostra foi distribuída sobre a membrana, evitando a formação de bolhas. O cilindro foi acoplado a célula de difusão com fase receptora a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. O mesmo ensaio foi realizado para o VC livre a fim de se determinar o perfil de dissolução do mesmo. A simulação das condições *sink* normalmente é obtida, usando-se um grande volume de meio de dissolução, ou mecanismos pelos quais o meio de dissolução é constantemente repostado com solvente puro, de modo que a concentração do soluto não alcance mais do que 10 a 15% da sua solubilidade máxima. De acordo com THE MERCK INDEX (2001) a solubilidade do VC em água é maior que 100 mg/mL.

O ensaio também foi realizado com a preparação de lipossomas vazios para verificar a possível interferência da PCH na quantificação do VC por espectrofotometria.

No esquema da figura 6 observa-se um suporte de vidro, colocado na cubeta do espectrofotômetro, de modo que a membrana de acetato de celulose presa na extremidade do suporte fique em contato com o meio receptor contida na cubeta. A membrana de acetato de celulose é presa ao suporte e sobre ela é colocada a amostra a ser analisada. Sobre a parte superior da cubeta o sistema é fechado por meio de uma tampa envolta por parafilme.

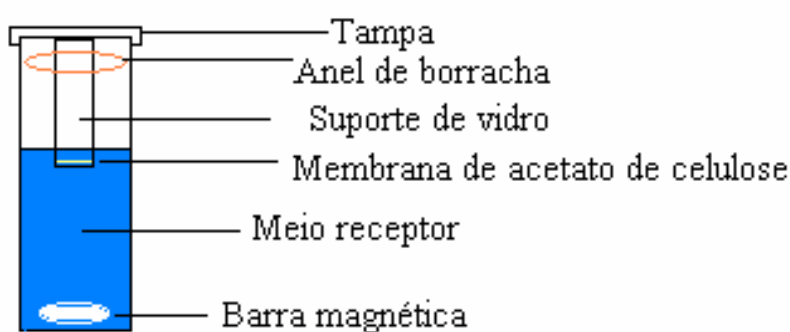


Figura 6. Representação esquemática do sistema de liberação *in vitro* adaptado à cubeta do espectrofotômetro (ANDRÉO-FILHO, 1999).

As condições experimentais foram: temperatura de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, membrana de acetato de celulose ($A=0,28 \text{ cm}^2$), aplicação de $100 \mu\text{L}$ de cada amostra sobre a membrana (equivalente a 1 mg de fármaco), como meio receptor foi utilizado $2,5 \text{ mL}$ de tampão Tris-HCl 10 mM $\text{pH } 7,2$ e quantificação do VC em 280 nm . A agitação magnética foi mantida durante todo o processo e as leituras foram feitas com intervalo de 5 minutos na primeira hora e 30 minutos nos momentos seguintes, sendo 720 minutos o tempo total do ensaio. As amostras foram analisadas em triplicata.

10. Efeito de lipossomas de vancomicina na infecção experimental

Lipossomas contendo VC 10 mg/mL em gel de PLU 10% (p/p) foram filtrados em membrana de policarbonato com poros de 0,20 µm de diâmetro para um frasco de vidro previamente esterilizado por autoclavagem. Induziu-se endoftalmite experimental através da inoculação de $1,0 \times 10^7$ UFC/0,1 mL de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1755) na cavidade vítrea de olhos direito de coelhos (n=30), pesando cerca de 2,0-3,0 kg. Após 24 horas da inoculação do microrganismo, os coelhos apresentaram equimose e inflamação (endoftalmite tipo moderada). Os animais foram anestesiados com uma mistura de solução de cloridrato de cetamina (30 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) via intramuscular. Aplicou-se 0,1 mL (equivalente a 1 mg de VC) da dispersão de lipossomas no corpo vítreo dos coelhos (n=10). Utilizou-se como referência 0,1 mL de solução de VC, sendo aplicada também no corpo vítreo dos coelhos (n=10). Os 10 coelhos restantes foram utilizados como controle. Em intervalos de tempo pré-determinados foi realizada a análise clínica nos olhos dos animais com o objetivo de se verificar a regressão da infecção. A avaliação clínica incluiu inspeção, oftalmoscopia indireta, fotografias do segmento anterior e do fundo ocular e foram realizadas diariamente até o 3º dia após a injeção do VC livre e encapsulado, quando os coelhos foram sacrificados. O experimento foi realizado no Hospital das Clínicas localizado em Ribeirão Preto/SP em colaboração com o oftalmologista Dr. José Augusto Cardillo.

11. Ensaio Microbiológico

11.1. Endoftalmite experimental em coelhos

Uma cepa específica de *S. epidermidis* (ATCC 1755) foi armazenada em placas de ágar sangue em meio refrigerado.

Para a reativação do inóculo, os microrganismos foram retirados das placas e suspensos em 5 mL de meio líquido estéril de infusão cérebro-coração. O meio líquido foi

Bruna Juliana Wanczinski

deixado por 12 horas em estufa a 37°C para o crescimento bacteriano. A fim de mensurar o número de bactérias no meio foi determinada a sua densidade óptica ($D.O_{600}$) sendo considerada ótima para diluição quando igual a 0,9. Para isso, os 5 mL anteriores foram diluídos em 50 mL de meio líquido estéril de cérebro-coração e deixados em agitação a 37°C para as sucessivas aferições de densidade óptica. As diluições a partir da suspensão com densidade de 0,9 obtidas foram realizadas com soro fisiológico estéril até que a concentração tivesse valor de $1,0 \times 10^7$ UFC/0,1 mL.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de solução de cloridrato de cetamina (30 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) via intramuscular.

A endoftalmite foi induzida por injeções intravítreas (0,1 mL) a cerca de 2 mm do limbo com suspensão do inoculo contendo $1,0 \times 10^7$ UFC/0,1 mL de *S. epidermidis*, em cada olho direito dos coelhos através de agulha de 30 G.

11.2. Análise microbiológica

Para este estudo, 45 coelhos tiveram seus olhos infectados conforme descrito anteriormente (item 11.1). Estes coelhos foram divididos em 3 grupos, nos quais 15 coelhos receberam a administração intravítrea de lipossomas; 15 coelhos receberam a administração intravítrea de solução aquosa de VC e os outros 15 coelhos receberam uma injeção intravítrea de solução salina sendo utilizados como controle. Cinco coelhos de cada grupo foram utilizados diariamente até o 3º dia após a injeção. Os coelhos foram sacrificados sob anestesia geral com pentobarbital e tiveram o gel vítreo dos seus olhos direitos dissecados de maneira estéril e agitados vigorosamente. De cada espécime vítreo foram aspiradas duas amostras de 0,3 mL das quais 0,1 mL foi cultivada em placa de ágar sangue, e os outros 0,2 mL foram plaqueados de forma seriada (0,1 mL em diluição de 10^{-2} e 0,1 mL em diluição de 10^{-4}). As placas foram armazenadas em estufa por 24 horas a 37°C para posterior contagem das

colônias. Foram retiradas de cada vítreo dissecado duas amostras de 0,3 mL para prova e contra-prova do estudo.

12. Determinação da quantidade de VC no humor vítreo e aquoso em função do tempo

0,1 mL de lipossomas contendo VC 10 mg/mL em gel de PLU 10% (p/p) (equivalente a 1 mg de fármaco) foi administrado no corpo vítreo de coelhos albinos fêmeas da raça Nova Zelândia (n=18), previamente anestesiados com uma mistura de solução de cloridrato de cetamina (30 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) via intramuscular. O perfil de liberação do fármaco neste sistema *in vivo* foi determinado a partir da coleta de amostras do humor vítreo (n=18) e aquoso (n=18), em intervalos de 24 horas, por um período de 6 dias.

Após o término de cada experimento os animais foram sacrificados e o conteúdo vítreo e aquoso coletados para análise. As amostras foram então armazenadas sob refrigeração (-85°C). Posteriormente, estas foram centrifugadas a 16000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de policarbonato 0,20 µm e injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência, utilizando as condições cromatográficas especificadas no item 1.2.1. O mesmo procedimento foi realizado para a quantificação do fármaco livre, isto é não encapsulado em lipossomas, no humor vítreo e aquoso.

A quantificação de fármaco das amostras foi realizada a partir da equação da reta obtida conforme descrito no item 1.2.2. Os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Metodologia analítica para a determinação de VC

1.1. Espectrofotometria de UV-VIS

1.1.1. Espectro de máxima absorção do VC

O comprimento de onda de máxima absorção do VC, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2, observado na varredura foi a região de 280 nm (Figura 7).

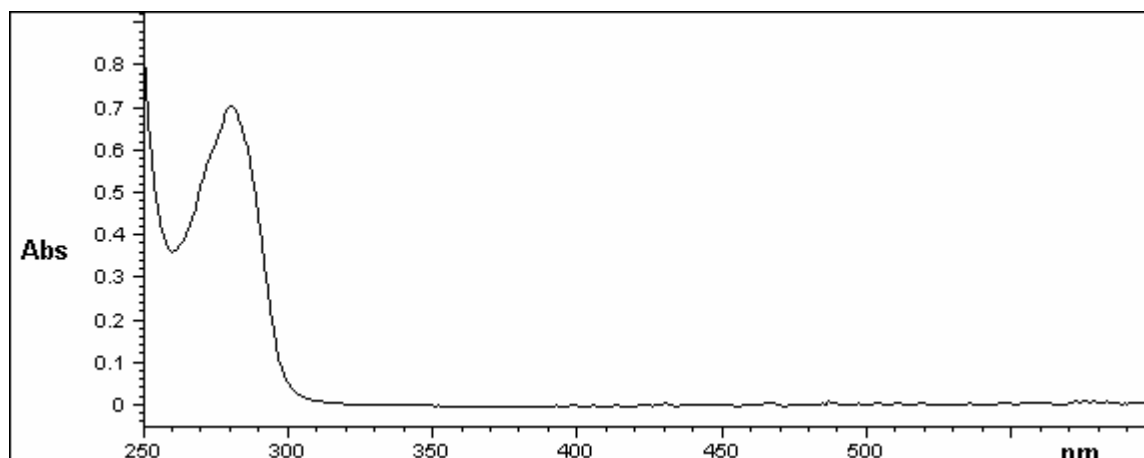


Figura 7. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.

1.1.2. Curva padrão do VC no UV-VIS

Foram preparadas 3 curvas padrão com objetivos distintos. A curva padrão obtida em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 (Figura 8) teve como objetivo determinar a concentração de VC no meio de dissolução, onde foi realizado o teste para a determinação do perfil de liberação *in vitro*.

Tabela 1. Variação da absorbância (Abs) com a concentração de VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2. As determinações foram obtidas em triplicata por espectrofotometria em 280 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Abs (média, $n=3$)	DP	CV (%)
9,90	0,0143	0,0038	26,5
19,60	0,0560	0,0028	5,0
29,12	0,0930	0,0042	4,52
47,61	0,1715	0,0078	4,55
65,42	0,2430	0,0155	6,38
78,34	0,2950	0,0198	6,71
99,09	0,3815	0,0247	6,47
107,14	0,413	0,0269	6,51
126,63	0,4945	0,0304	6,15
145,29	0,5685	0,0346	6,09
180,32	0,709	0,0438	6,18
196,78	0,7755	0,0502	6,47
227,79	0,8995	0,0502	5,58
256,50	1,0155	0,0545	5,37
270,07	1,0695	0,0572	5,35
275,36	1,0900	0,0579	5,31
280,58	1,1090	0,0609	5,49
290,78	1,1505	0,0615	5,35
300,70	1,1905	0,0672	5,64
310,34	1,2270	0,0665	5,42
319,73	1,2635	0,0643	5,09
328,86	1,3005	0,0629	4,84
337,74	1,3335	0,0671	5,03
346,41	1,3675	0,0629	5,00
354,83	1,4020	0,0650	4,64
363,06	1,4330	0,0622	4,34
371,07	1,4645	0,0601	4,10
450,10	1,7800	0,0707	3,97

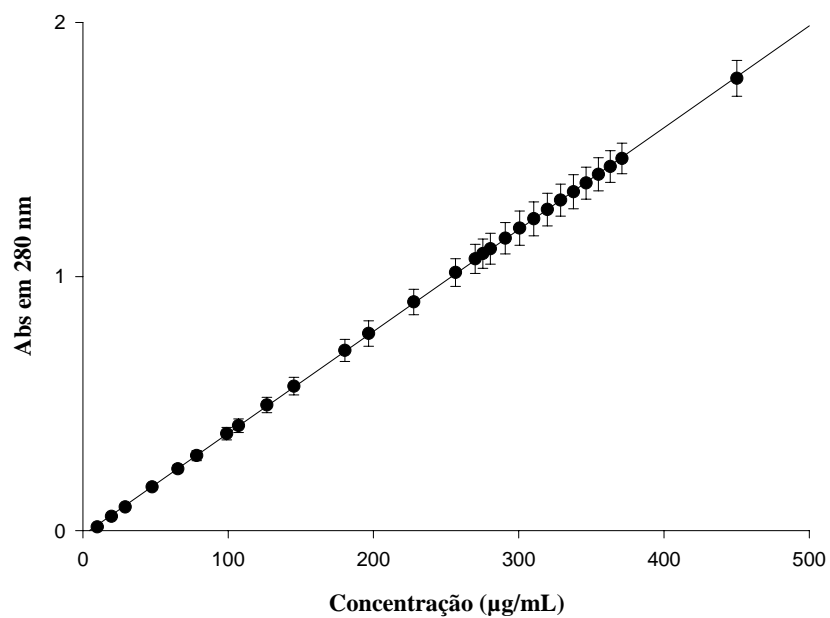


Figura 8. Curva padrão do VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2, obtida por espectrofotometria em 280 nm.

$$\text{Abs}_{280} = 0,00400 [\text{VC}] - 0,01793, r = 0,99994$$

A curva padrão do fármaco em metanol (Figura 9) teve como objetivo a determinação da quantidade de VC encapsulada nos lipossomas.

Tabela 2. Variação da Abs com a concentração de VC em metanol. As determinações foram obtidas em triplicata por espectrofotometria em 280 nm.

<i>Concentração ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Abs (média, $n=3$)</i>	<i>DP</i>	<i>CV(%)</i>
29,12	0,1526	0,0050	3,27
47,61	0,2517	0,0046	1,82
65,42	0,3509	0,0075	2,13
78,34	0,4220	0,0088	2,08
99,09	0,5372	0,0096	1,78
107,14	0,5814	0,0003	0,05
126,63	0,6961	0,0010	0,14
145,29	0,8164	0,0046	0,56
180,32	1,0309	0,0136	1,32
196,78	1,1307	0,0173	1,53

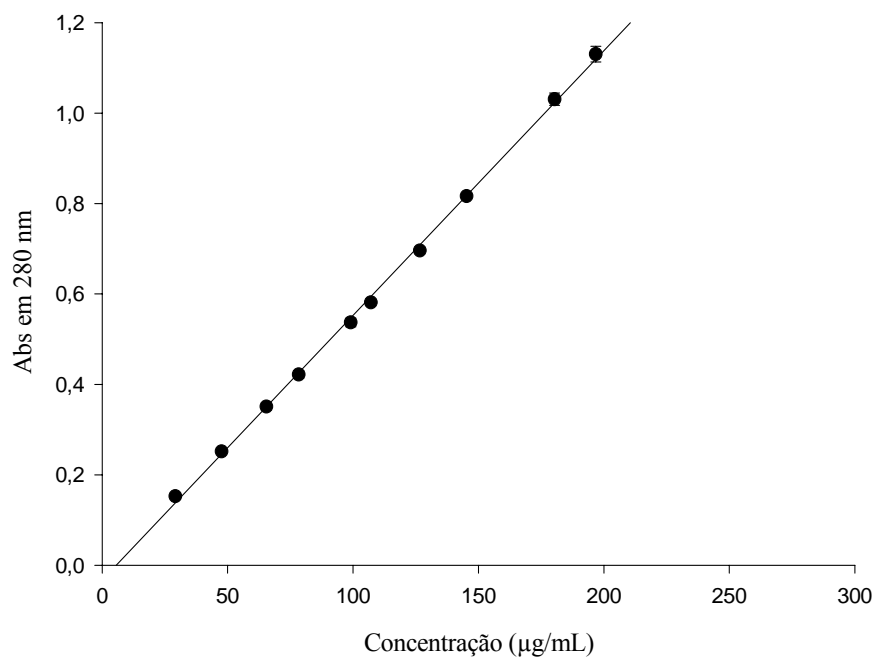


Figura 9. Curva padrão do cloridrato de VC em metanol, obtida por espectrofotometria em 280 nm.

$$\text{Abs}_{280} = 0,00585 [\text{VC}] - 0,03268, r = 0,99905$$

1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

1.2.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas no ensaio foram suficientes na separação e quantificação do fármaco modelo escolhido, conforme ilustrado na figura 10. O tempo de retenção do fármaco (t_R) foi de aproximadamente 10,42 minutos.

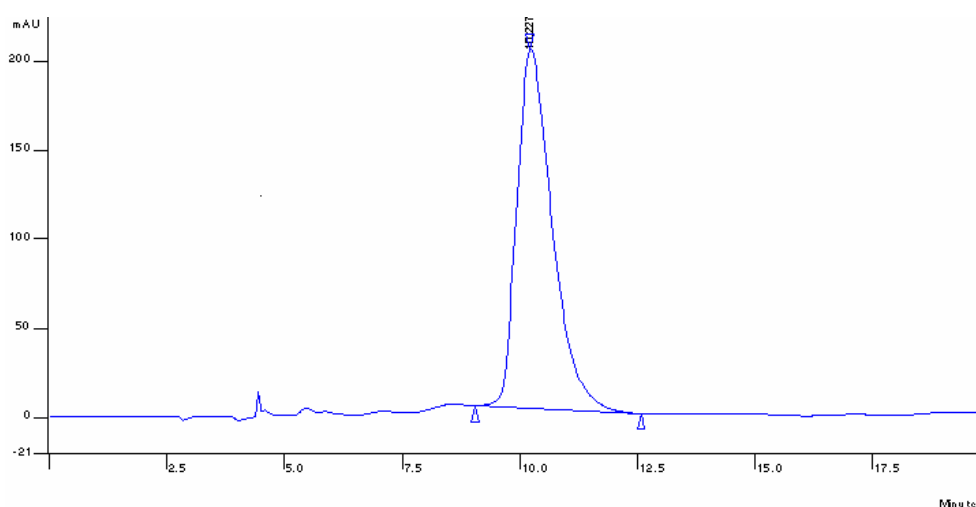


Figura 10. Cromatograma típico do VC obtido na análise por CLAE em 280 nm ($t_R = 10,42$ min).

1.2.2. Curva padrão do VC por CLAE

Para o ensaio de quantificação do fármaco no humor vítreo e aquoso de olhos de coelhos no decorrer de 6 dias foi construída uma curva padrão do VC em tampão Tris-HCL 10 mM pH 7,2 por CLAE (Figura 11). A CLAE foi utilizada, pois é um método que apresenta alta especificidade, resolução, eficiência e sensibilidade características importantes quando se trabalha com amostras biológicas de volume pequeno.

Tabela 3. Valores de área do pico das soluções de VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2. As determinações foram obtidas em triplicata por CLAE em 280 nm.

<i>Concentração</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Área do pico (mV.s)</i> (<i>média, n=3</i>)	<i>DP</i>	<i>CV</i> (%)
06	1102329	77875,75	7,0647
10	1755499	143269,7	8,1612
20	3587313	316207,9	8,8146
40	5643899	696916,1	12,3482
100	13747937	1387263	10,0907
200	26976564	2479037	9,1895
300	40684224	3269503	8,0362
400	49937489	8811719	17,6455
500	62257055	10364739	16,6483
600	74266804	10105879	13,6075
650	81707053	13310813	16,2909

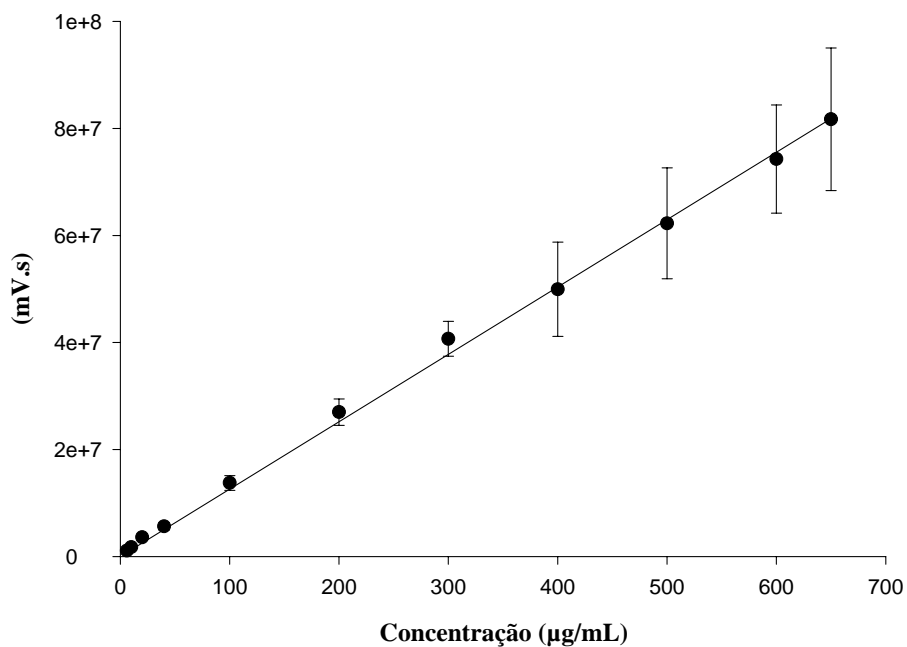


Figura 11. Curva padrão do VC em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 obtida por CLAE em 280 nm.

$$\hat{\text{Área do Pico}}_{280} = 125929,643 [\text{VC}], r = 0,9989$$

2. Estudo reológico das dispersões de PLU

A melhoria de um medicamento já existente, de uma forma farmacêutica convencional para um novo sistema de liberação pode modificar seu perfil, em termos de adesão do paciente ao tratamento, segurança e eficácia. Várias estratégias tecnológicas têm sido utilizadas nesse sentido. Os lipossomas apresentam grande potencial como sistema de liberação e direcionamento de fármacos devido às características de sua estrutura permitir incorporar diferentes tipos de fármacos ou de transportar ligantes celulares específicos. Uma das formas de implementar a liberação intraocular de fármacos a partir de lipossomas consiste na associação de polímeros termosensíveis na bicamada lipídica.

Os lipossomas utilizados neste estudo tiveram a fosfatidilcolina de soja hidrogenada como anfifílico estrutural associado ao copolímero termosensível de óxido de etileno e propileno, conhecido comercialmente por PLU. Como fármaco modelo foi utilizado o VC.

Estudou-se o comportamento reológico das dispersões do copolímero nas concentrações de 5; 7,5; 10 e 15% (p/p), sendo que as dispersões mantidas sob refrigeração apresentaram-se líquidas. Entretanto, na temperatura ocular ($34,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) os resultados do perfil reológico (Figuras 12, 13, 14 e 15) evidenciam fluxo não Newtoniano para todas as dispersões de Pluronic[®], com variação na viscosidade com o grau de cisalhamento aplicado. Neste caso a tensão e o gradiente de cisalhamento não são diretamente proporcionais originando diferentes valores de viscosidade. As dispersões contendo até 10% de PLU (Figuras 12, 13 e 14) mostraram comportamento tipo dilatante tempo independente, com aumento da viscosidade com o cisalhamento. Este tipo de comportamento é muito interessante tendo em vista que o sistema se destina a administração intravitreal com auxílio de uma seringa de diâmetro pequeno. Na aplicação de lipossomas contendo VC em PLU o cisalhamento é mimetizado pela velocidade de aplicação do sistema no globo ocular; por conseguinte se a viscosidade

aumenta com o cisalhamento, mantém-se a estruturação do gel no corpo vítreo sendo justificável a utilização de copolímeros em bloco com concentração inferior a 10 % (p/p).

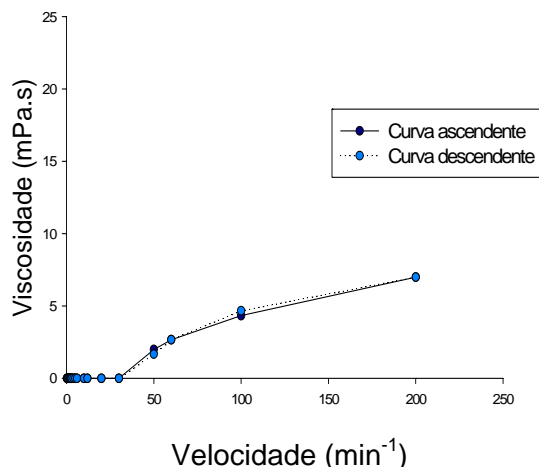


Figura 12. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 5% (p/p). Cilindro L1. $T = 34,5 \pm 0,5$ (°C).

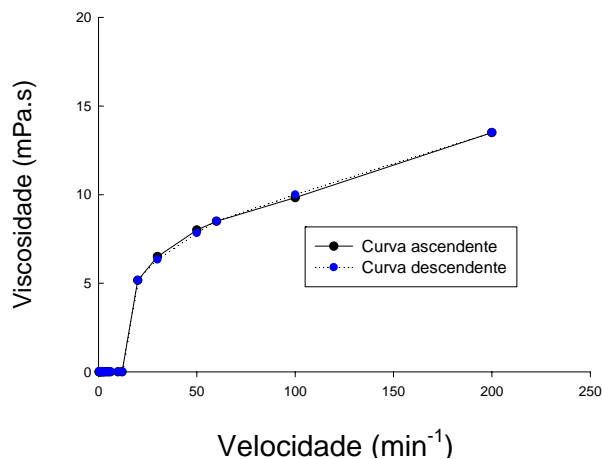


Figura 13. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 7,5% (p/p). Cilindro L1. $T = 34,5 \pm 0,5$ (°C).

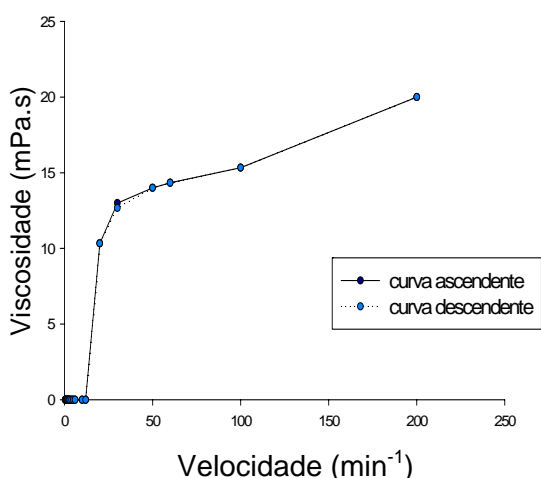


Figura 14. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 10% (p/p). Cilindro L1. $T = 34,5 \pm 0,5$ (°C).

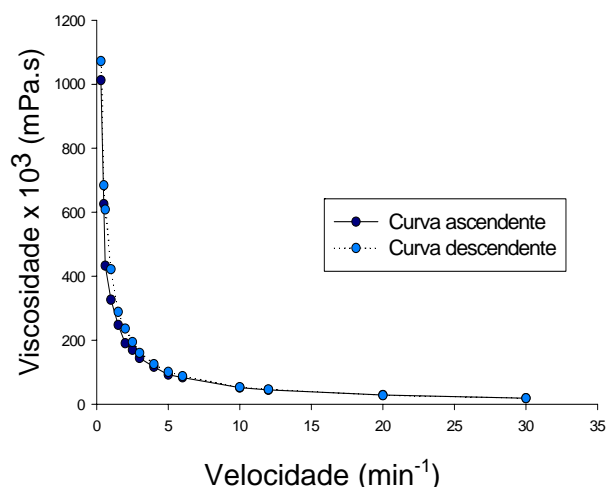


Figura 15. Comportamento reológico de dispersão de PLU a 15% (p/p). Cilindro L4. $T = 34,5 \pm 0,5$ (°C).

Na concentração de 15% de copolímero (Figura 15) mantêm-se a condição de fluxo não Newtoniano, porém tipo pseudoplástico tempo independente, com diminuição da viscosidade com o cisalhamento. Neste caso, provavelmente, durante a aplicação a viscosidade do PLU diminuí com o cisalhamento levando a uma desestruturação do gel que consequentemente irá

proporcionar um meio dispersante de viscosidade baixa que poderá resultar num tempo de retenção do sistema no globo ocular muito curto inviabilizando a utilização de PLU nesta concentração.

Através da análise reológica percebe-se que a viscosidade do sistema é diretamente dependente da temperatura e da concentração de copolímero, com tendência a formação de géis altamente viscosos, podendo proporcionar maior tempo de retenção do fármaco no globo ocular. Sabe-se que sistemas coloidais, como os lipossomas apresentam baixa viscosidade, o que favorece um menor tempo de retenção do fármaco no globo ocular, sendo assim a associação de copolímeros termosensíveis e lipossomas parece ser promissora.

4. Perfil de formação de lipossomas unilamelares pequenos

O perfil de formação de SUVs (Figuras 16-23) foi acompanhado pela redução da turbidez derivada do espalhamento de luz em 410 nm, em função do tempo de sonicação e em decorrência da redução de tamanho dos lipossomas multilamelares.

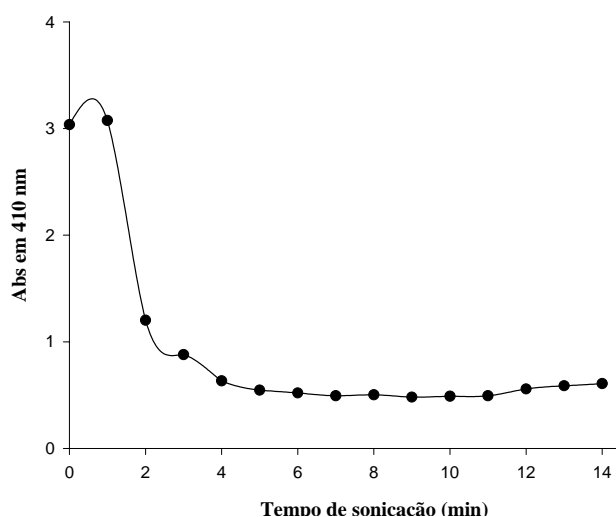


Figura 16. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo solução de VC a 10 mg/mL por espalhamento de luz em 410 nm.

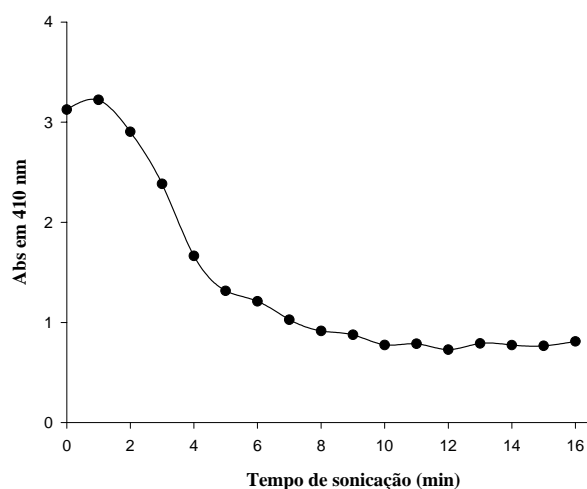


Figura 17. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo VC 10 mg/mL associado a PLU 5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.

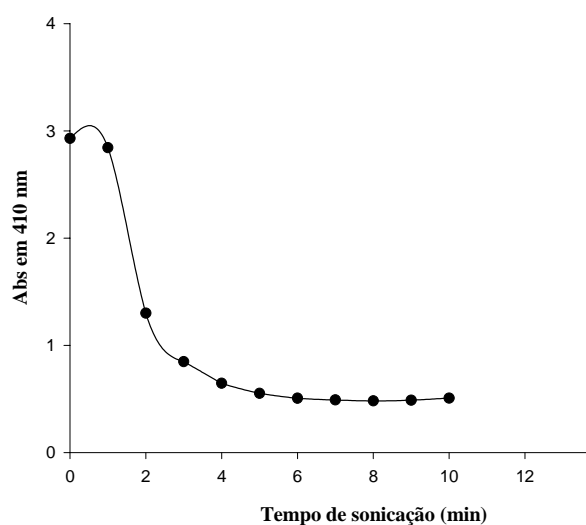


Figura 18. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo VC 10 mg/mL associado a PLU 7,5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.

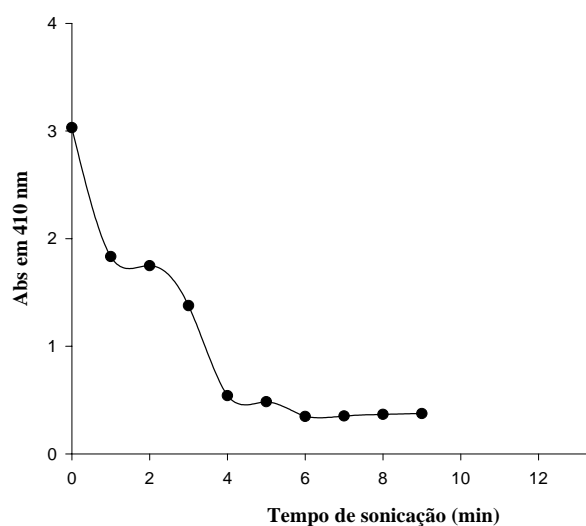


Figura 19. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo VC 10 mg/mL associado a PLU 10% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.

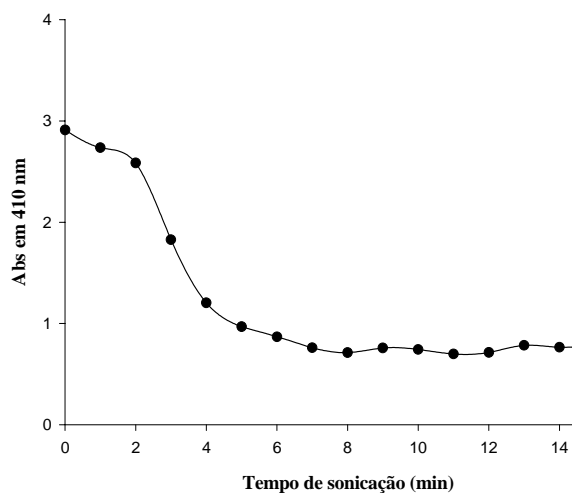


Figura 20. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 por espalhamento de luz em 410 nm.

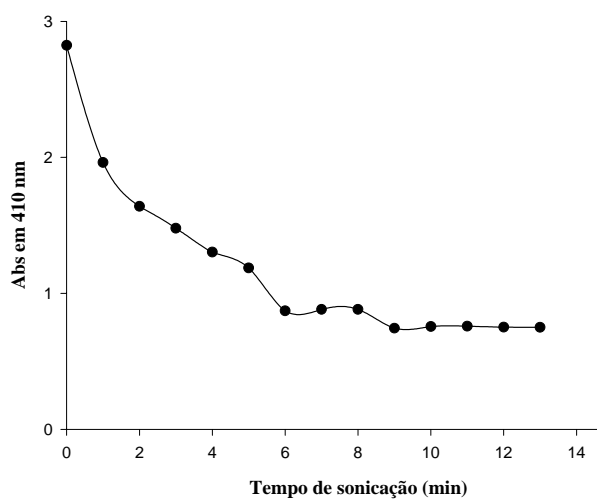


Figura 21. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo dispersão de PLU 5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.

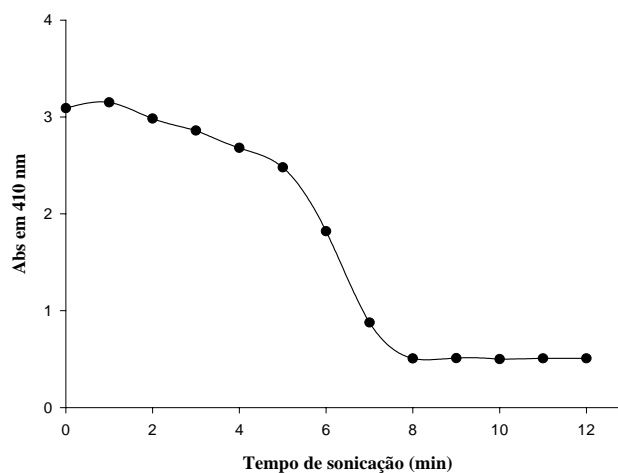


Figura 22. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo dispersão de PLU 7,5% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.

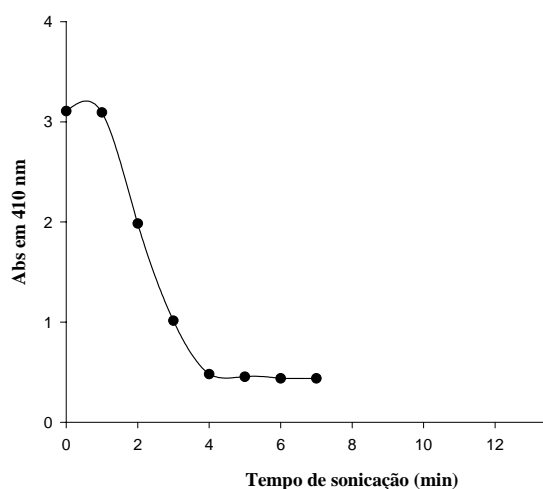


Figura 23. Monitorização espectrofotométrica de MLV constituído de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo dispersão de PLU 10,0% (p/p) por espalhamento de luz em 410 nm.

Observa-se que a adição de PLU na concentração de 10% (p/p) (Figura 24) proporciona uma redução de turbidez dos lipossomas mais acentuada em um menor tempo de sonicação quando comparada aos lipossomas compostos de PLU na concentração de 0-7,5%

Bruna Juliana Wanczinski

(p/p). Provavelmente, este fato ocorre devido a uma interação favorável entre o copolímero de caráter anfílico com a bicamada fosfolípídica. Jamshaid et al. (1988) sugeriram que os *Poloxâmeros* podem penetrar na bicamada lipídica da fosfatidilcolina de soja e projetar seus grupos de polioxietileno para a superfície da vesícula.

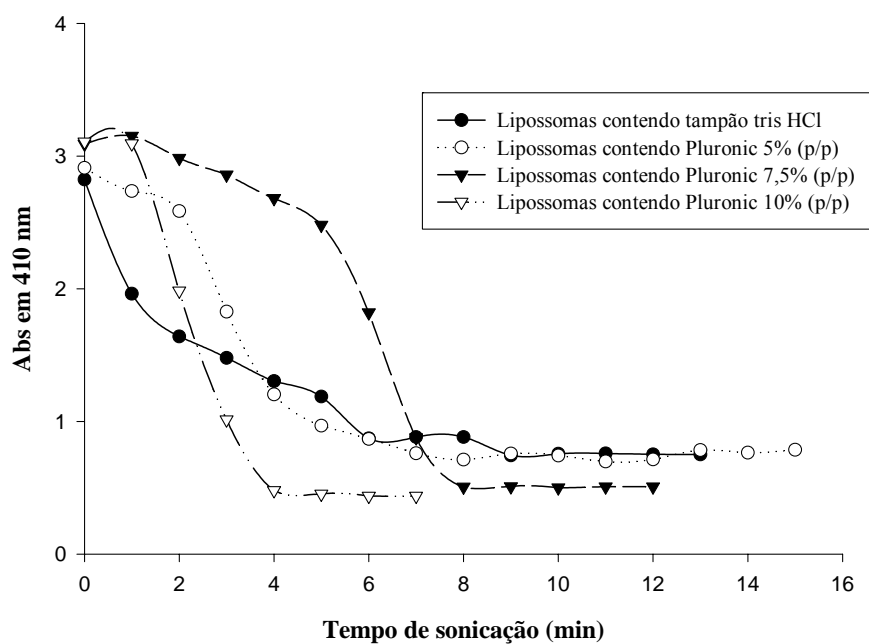


Figura 24. Influência da variação das concentrações de copolímero termosensível (PLU) sobre o perfil de formação dos lipossomas.

A adição de VC ao filme lipídico (Figura 25) provocou uma redução no tempo de sonicação necessário para a formação dos lipossomas unilamelares pequenos contendo tampão Tris e copolímero na concentração de 7,5% (p/p).

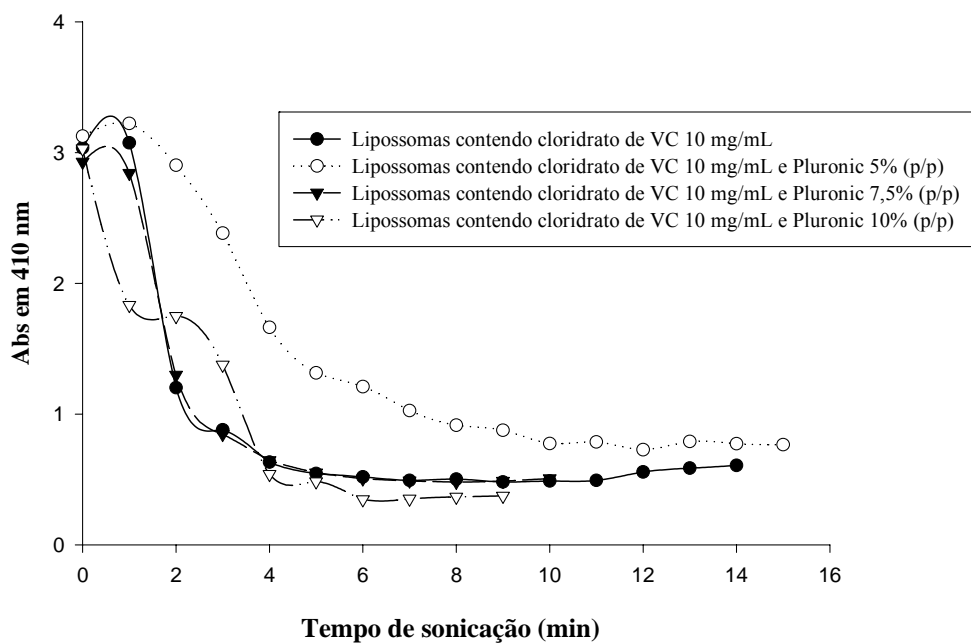


Figura 25. Influência da variação das concentrações de copolímero termosensível (PLU) com a adição de VC (10 mg/mL) sobre o perfil de formação dos lipossomas.

5. Separação do fármaco não encapsulado

As figuras 26-29 demonstram a absorbância das 60 frações recolhidas após eluição pela coluna de Sephadex G-50. Estas frações foram analisadas por espalhamento de luz em 410 nm e a detecção do fármaco livre monitorizada por sua absorbância em 280 nm.

A cromatografia de exclusão em Sephadex G-50 foi eficiente na separação do fármaco não encapsulado para todas as concentrações de copolímero utilizadas, como também para a preparação isenta de PLU.

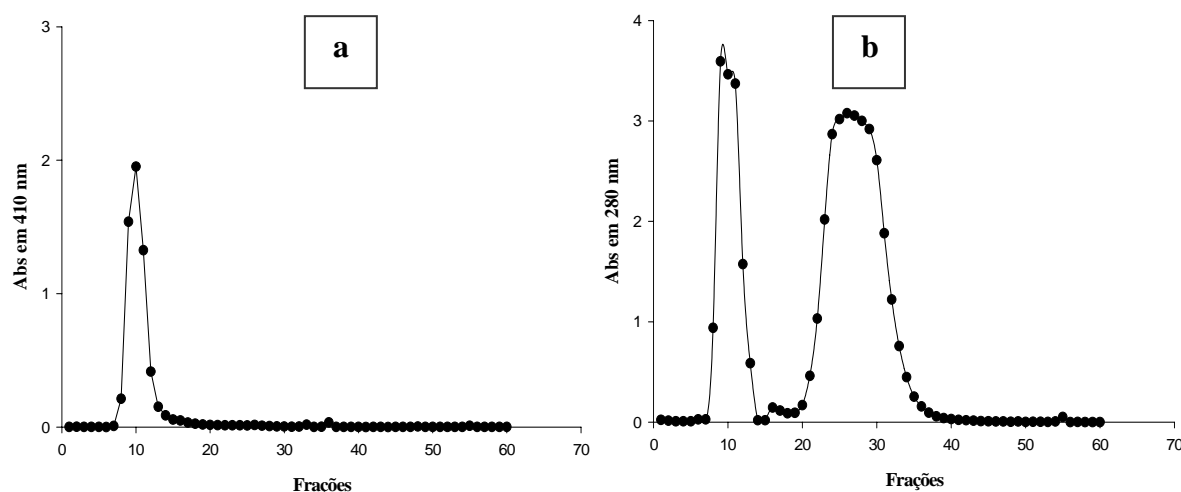


Figura 26. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco. SUVs compostos de 50mM de PCH e 10 mg/mL de VC. Monitorização da eluição em 410 nm (a) e 280 nm (b).

De acordo com as leituras em 410 nm, as quais descrevem a eluição dos lipossomas, observa-se que as vesículas eluíram nas frações 8-13. Reunindo-se estas 6 frações, obteve-se um volume total de 12 mL, o qual foi levado ao liofilizador.

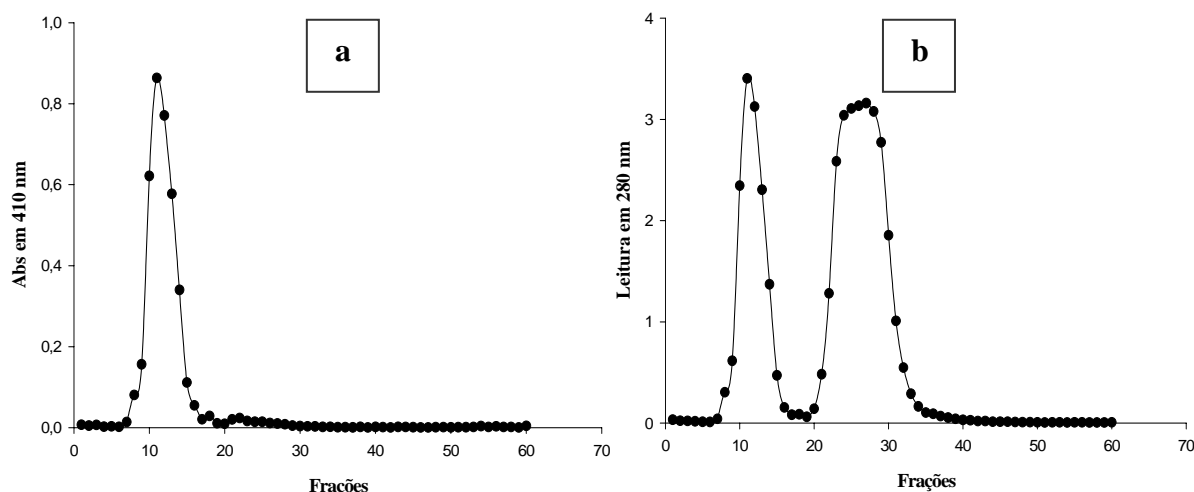


Figura 27. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco contendo PLU 5% (p/p). SUVs compostos de 50mM de PCH e 10 mg/mL de VC associado a PLU 5% (p/p). Monitorização da eluição em 410 nm (a) e 280 nm (b).

De acordo com as leituras em 410 nm, as quais descrevem a eluição dos lipossomas, observa-se que as vesículas eluíram nas frações 9-15. Reunindo-se estas 7 frações, obteve-se um volume total de 14 mL, o qual foi levado ao liofilizador.

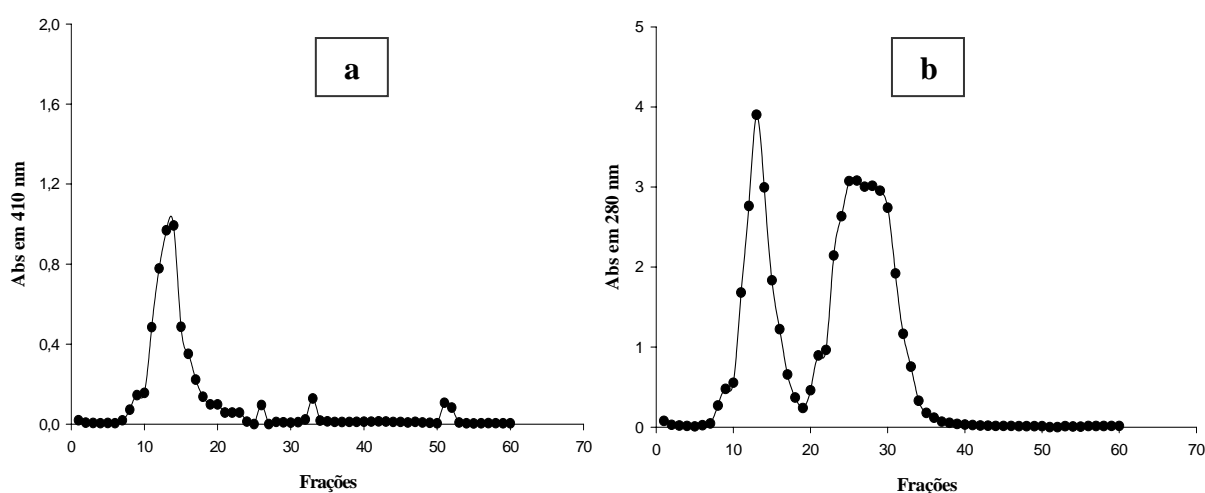


Figura 28. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco contendo PLU 7,5% (p/p). SUVs compostos de 50mM de PCH e 10 mg/mL de VC associado a PLU 7,5% (p/p). Monitorização da eluição em 410 nm (a) e 280 nm (b).

De acordo com as leituras em 410 nm, as quais descrevem a eluição dos lipossomas, observa-se que as vesículas eluíram nas frações 9-18. Reunindo-se estas 10 frações obteve-se um volume final de 20 mL, o qual foi levado ao liofilizador.

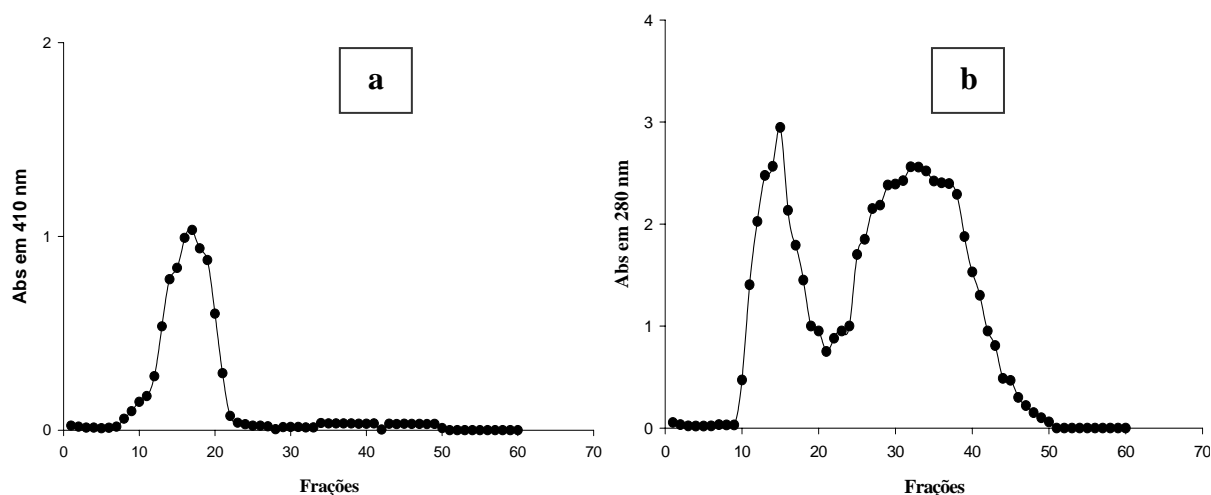


Figura 29. Perfil de eluição de SUVs em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 em coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2 e saturada com lipossomas isentos de fármaco contendo PLU 10,0% (p/p). SUVs compostos de 50mM de PCH e 10 mg/mL de VC associado a PLU 10.0% (p/p). Monitorização da eluição em 410 nm (a) e 280 nm (b).

De acordo com as leituras em 410 nm, as quais descrevem a eluição dos lipossomas, observa-se que as vesículas eluíram nas frações 10-21. Reunindo-se estas 12 frações, obteve-se um volume total de 24 mL, o qual foi levado ao liofilizador.

6. Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação é resultado do coeficiente de partição do fármaco, método de preparação dos lipossomas, tamanho e lamelaridade da vesícula, tempo de hidratação do filme lipídico e da concentração do lipossoma, sendo que este último é o parâmetro que exerce maior influência sob a eficiência de encapsulação da substância ativa.

Portanto, espera-se um aumento na eficiência de encapsulação do fármaco com o aumento da fração lipídica dos lipossomas (tipo e composição lipídica da vesícula) (MARGALIT et al, 1991). Neste estudo, utilizou-se lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada na concentração de 50 mM.

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada da seguinte maneira:

- os lipossomas liofilizados foram pesados e uma alíquota de 20 mg do liofilizado foi dissolvida em 2,5 mL de metanol. Pipetou-se 1,5 mL desta preparação e adicionou-se 0,5 mL de metanol em cubeta de quartzo. Amostras de lipossomas isentos de fármaco foram utilizadas como branco e foram também submetidas ao mesmo tratamento.
- a absorbância resultante foi aplicada na curva padrão de VC em metanol, sendo encontrada uma concentração de X mg/mL.

X mg ----- mL

Y ----- volume utilizado para dissolver resíduo

Y mg ----- 20 mg de dispersão liofilizada

Z ----- massa total das frações eluídas contendo lipossomas

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

K ----- 4,0 mL de dispersão preparados

↓

C mg/mL

Verificou-se que a eficiência de encapsulação aumentou com a adição de copolímero termosensível no sistema (Tabela 4). Este fenômeno pode ser explicado devido à propriedade do copolímero em aumentar a solubilidade do fármaco aumentando a taxa de encapsulação.

Tabela 4. Encapsulação média de VC nos lipossomas.

<i>Amostra</i>	<i>Eficiência de Encapsulação (%)</i> <i>(Média, n = 3)</i>
Lipossomas VC 10 mg/mL	4,193 ± 0,81
Lipossomas VC/PLU 5%	6,587 ± 0,92
Lipossomas VC/PLU 7,5%	11,209 ± 0,95
Lipossomas VC/PLU 10%	12,304 ± 1,01

Segundo Berger et al. (2001), geralmente a eficiência de encapsulação diminuí com a diminuição do tamanho dos lipossomas. Neste estudo, os lipossomas contendo fármaco apresentaram um diâmetro médio menor quando comparados aos lipossomas contendo antibiótico e copolímero em diferentes concentrações (Tabela 6), como também demonstraram uma eficiência de encapsulação menor em relação às demais preparações. A formulação contendo fármaco e copolímero na concentração de 10% (p/p) possuiu um diâmetro médio maior (MD = 113 nm) como também apresentou uma eficiência de encapsulação maior quando comparada às demais formulações.

7. Encapsulação do cloridrato de VC

Com o objetivo de se estudar a caracterização das vesículas contendo VC e copolímero na concentração de 10% (p/p), diversas formulações contendo diferentes concentrações de fármaco foram desenvolvidas, sendo o perfil de separação do fármaco não encapsulado representado na figura 30.

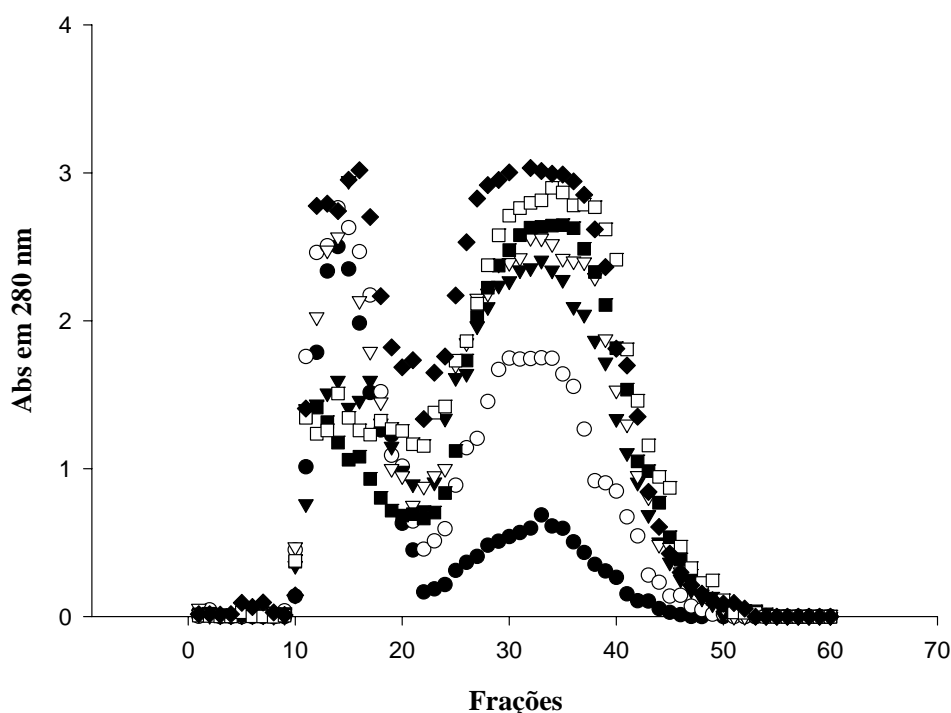


Figura 30. Perfil de separação de VC e SUVs compostos de 50 mM de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e quantidades variáveis do fármaco em PLU 10% (p/p), utilizando coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 e saturada com vesículas contendo PLU 10% (p/p) isentas de fármaco. Monitorização da eluição em 280 nm.

- Lipossomas preparados com 2 mg/mL de VC.
- Lipossomas preparados com 5 mg/mL de VC.
- ▼ Lipossomas preparados com 7,5 mg/mL de VC.
- ▽ Lipossomas preparados com 10 mg/mL de VC.
- Lipossomas preparados com 12,5 mg/mL de VC.
- Lipossomas preparados com 15,0 mg/mL de VC.
- ◆ Lipossomas preparados com 20 mg/mL de VC.

Da mesma forma, as frações que apresentaram lipossomas foram reunidas e liofilizadas, sendo a eficiência de encapsulação calculada conforme descrito no item 06. Observa-se que, na faixa de concentração de fármaco estudada (2-20 mg/mL), a encapsulação de VC aumentou com o aumento da quantidade de antibiótico adicionada ao filme de fosfatidilcolina (Figura 31).

Erro! Vínculo não válido.

Figura 31. Encapsulação de diferentes concentrações de VC em PLU 10% (p/p) adicionado ao filme lipídico contendo 50 mM de PCH.

8. Índice de Refração dos Lipossomas

O índice de refração (IR) dos lipossomas (Tabela 5) foi verificado, pois na análise de espalhamento de luz se faz necessário considerar o IR das partículas para se obter resultados reprodutíveis e seguros. O IR é um dos métodos utilizados para se determinar a concentração de materiais, estabelecer identidade e a pureza de fluídos. Observa-se que as amostras possuíram um valor de IR muito semelhante ao IR da água ($IR = 1,33$) com elevada transparência, fato que justifica a pureza das vesículas em estudo.

Tabela 5. Valores do índice de refração das amostras.

<i>Amostra</i>	<i>IR (Média, n = 3)</i>
Lipossoma vazio	1,345 ± 0,001
Lipossomas PLU 5%	1,345 ± 0,002
Lipossomas PLU 7,5%	1,345 ± 0,001
Lipossomas PLU 10%	1,349 ± 0,001
Lipossomas VC 10 mg/mL	1,339 ± 0,001
Lipossomas VC 10 mg/mL/PLU 5%	1,345 ± 0,001
Lipossomas VC 10 mg/mL/PLU 7,5%	1,346 ± 0,001
Lipossomas VC 10 mg/mL/PLU 10%	1,345 ± 0,001

9. Diâmetro Médio das Partículas dos Lipossomas

A determinação do tamanho das vesículas foi verificada por espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering*). O coeficiente de difusão medido é utilizado para obter o raio hidrodinâmico médio, portanto, o diâmetro médio dos lipossomas.

Os resultados obtidos (Tabela 6) mostraram que os lipossomas isentos de antibiótico tiveram ligeiramente o diâmetro reduzido na presença de PLU. Esta redução do tamanho dos lipossomas pode ser decorrente da interação existente entre as moléculas de lecitina com as moléculas do copolímero levando a uma modificação do empacotamento da fosfatidilcolina e propiciando a formação de vesículas menores (ISRAELACHVILE et al., 1976; EL JASTIMI

et al., 1999; MULLER et al., 2004). Os lipossomas isentos de fármaco e copolímero tiveram seu diâmetro reduzido de $97,6 \pm 0,7$ para $85,7 \pm 0,7$ nm com a adição de VC 10 mg/mL. Neste caso, o fármaco pode estar afetando a organização das bicamadas lipídicas induzindo a formação de planos lipídicos com raios de curvatura menores e conseqüentemente levando a formação de vesículas pequenas, além disso, também pode estar ocorrendo interações do ânion cloreto do fármaco com a carga positiva do grupo trimetilamônio da molécula de fosfatidilcolina alterando a carga superficial da vesícula (EL JASTIMI et al., 1999; MULLER et al., 2004) e favorecendo a redução do tamanho dos lipossomas. Entretanto, para os lipossomas contendo VC os diâmetros médios aumentaram de 88 a 113nm, quando a concentração de PLU variou de 5 a 10% (p/p). O aumento do tamanho das vesículas com a adição do antibiótico e copolímero termosensível pode estar relacionado ao caráter anfifílico e ao fato de serem estruturas estericamente volumosas, as quais podem incorporar-se à estrutura da bicamada provocando um ligeiro aumento no diâmetro dos lipossomas (BOCHOT et al., 1998; SON et al., 2003).

Tabela 6. Resultados da análise de espalhamento de luz realizada com as amostras.

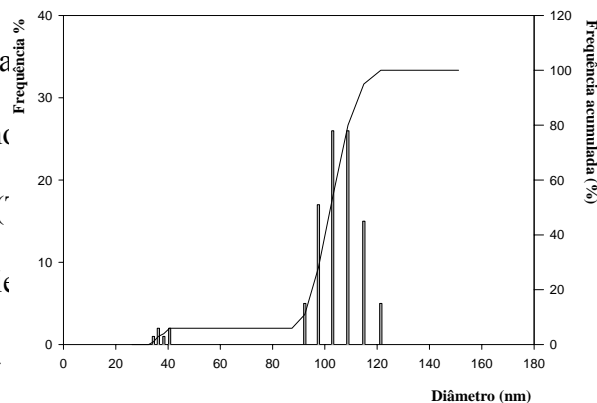
Diluição: 200 μ L da amostra em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2.

<i>Amostra</i>	<i>Diâmetro (nm)</i> <i>(Média, n = 10)</i>	<i>Polidispersidade</i>	<i>Coefficiente de</i> <i>Difusão ($\times 10^{-8}$ cm²/s)</i>
Lipossoma Vazio	$97,6 \pm 0,7$	0,180	2,1948
Lipossomas PLU 5%	$85,2 \pm 0,5$	0,132	2,5140
Lipossomas PLU 7,5%	$85,2 \pm 0,4$	0,194	2,5140
Lipossomas PLU 10%	$95,8 \pm 0,7$	0,223	2,2356
Lipossomas VC 10 mg/mL	$85,7 \pm 0,4$	0,197	2,4991
Lipossomas VC/PLU 5%	$88,2 \pm 0,3$	0,168	2,4282

Lipossomas VC/PLU 7,5%	90,3 ± 0,5	0,165	2,3717
Lipossomas VC/PLU 10%	113,1 ± 0,8	0,222	1,8936

A polidispersidade é definida como a medida da largura da distribuição do tamanho das vesículas (MULLER et al, 2004). De acordo com os resultados descritos na tabela 6, os lipossomas utilizados neste estudo apresentam uma distribuição de tamanho adequada, indicando uma adequada distribuição de tamanho.

Os cálculos do coeficiente de difusão (D) e do diâmetro médio das vesículas menor é o coeficiente de difusão do fármaco liberado com o passar do tempo, haja



outros, a um aumento da viscosidade do sistema como também a um aumento do diâmetro médio dos lipossomas. Contudo, este parâmetro pode influenciar diretamente o perfil de liberação do fármaco *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados evidenciam que o copolímero pode estar interagindo com a bicamada lipídica dos lipossomas interferindo diretamente no diâmetro médio dos mesmos, mas proporcionando estruturas de tamanho adequadas para a administração intravitreal.

9.1. Distribuição de Tamanho dos Lipossomas

As figuras de 32 a 39 apresentam os gráficos de distribuição e a média (MD) do tamanho dos lipossomas (nm) em estudo. Observa-se que a maioria dos gráficos possui um comportamento do tipo bimodal.

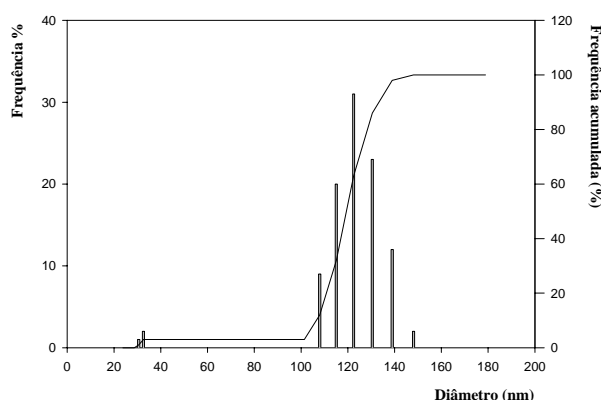


Figura 32. Distribuição de tamanho de lipossomas vazios. MD = 97,6 ± 0,7.

Bruna Juliana Wanczinski

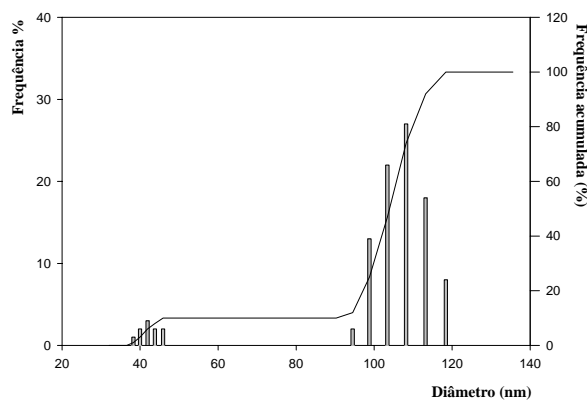


Figura 36. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo cloridrato de vancomicina (VC). MD = $85,7 \pm 0,4$.

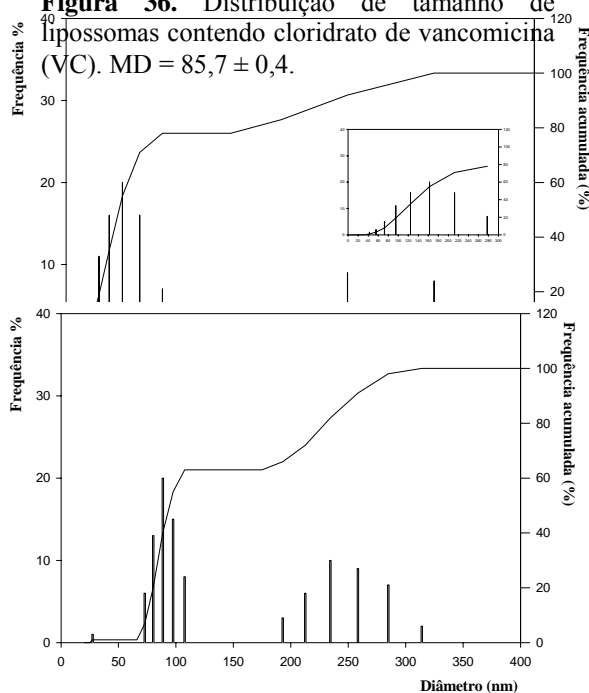


Figura 38. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo cloridrato de vancomicina (VC) e pluronic 7,5% (p/p). MD = $90,3 \pm 0,5$.

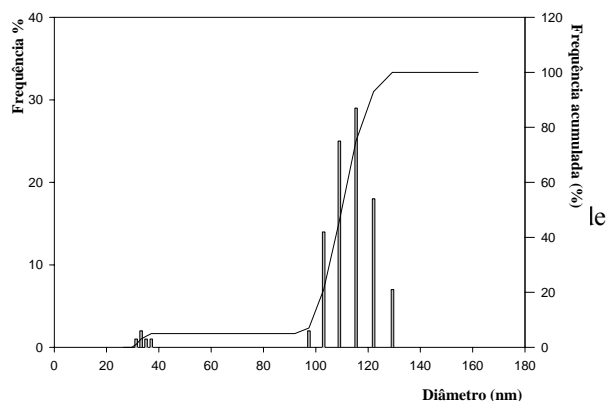


Figura 37. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo cloridrato de vancomicina (VC) e pluronic 5% (p/p). MD = $88,2 \pm 0,3$.

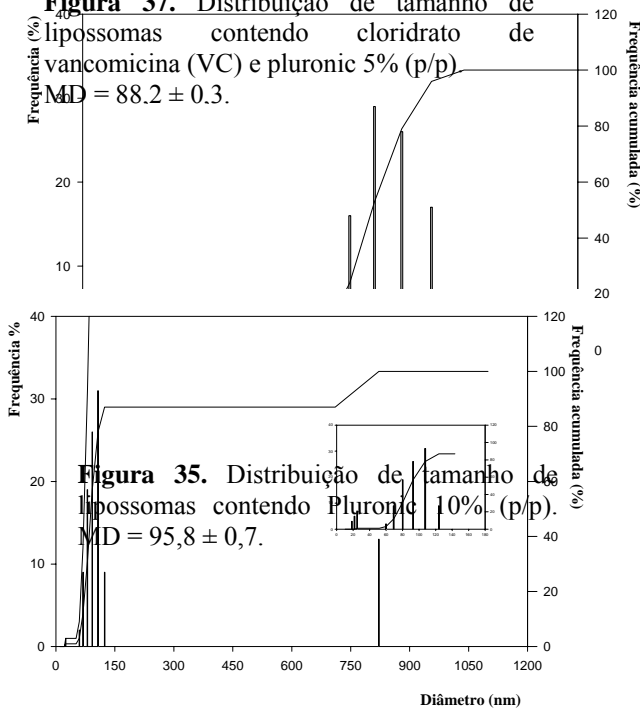


Figura 35. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo Pluronic 10% (p/p). MD = $95,8 \pm 0,7$.

Figura 39. Distribuição de tamanho de lipossomas contendo cloridrato de vancomicina (VC) e pluronic 10% (p/p). MD = $113,1 \pm 0,8$.

10. Ensaio de liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* do fármaco nas diversas formulações foi verificado medindo-se a quantidade de VC que atravessou a membrana de acetato de celulose e atingiu o meio receptor localizado no outro lado da membrana.

Lipossomas isentos de fármaco foram submetidos ao teste de liberação *in vitro* e as absorvâncias medidas em função do tempo no comprimento de onda de máxima absorção do cloridrato de vancomicina ($\lambda=280$ nm). O tempo total do experimento foi de 720 minutos. Os valores médios de absorvância encontrados para os lipossomas isentos de VC foram subtraídos dos valores médios de absorvância das amostras contendo o fármaco de modo que os lipossomas vazios foram utilizados como branco na análise do perfil de liberação do VC encapsulado em SUVs. Para as demais formulações (não lipossomais) os valores médios de absorvância foram aplicados diretamente na equação da reta obtida através da curva padrão do fármaco em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2 (Figura 8) a fim de se obter a [VC] em determinado período de tempo. Os perfis de liberação *in vitro* do VC (Figuras 40-47) foram determinados pela relação entre o percentual das concentrações de VC aplicadas na célula de difusão com as aplicadas diretamente no meio de dissolução.

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados para as seguintes amostras:

- ✓ Fármaco livre (VC 10 mg/mL);
- ✓ Lipossomas contendo VC 10 mg/mL;
- ✓ VC 10 mg/mL em PLU 5% (p/p);
- ✓ Lipossomas contendo VC 10 mg/mL veiculados em PLU 5% (p/p);
- ✓ VC 10 mg/mL em PLU 7,5% (p/p);
- ✓ Lipossomas contendo VC 10 mg/mL veiculados em PLU 7,5% (p/p);
- ✓ VC 10 mg/mL em PLU 10% (p/p);

- ✓ Lipossomas contendo VC 10 mg/mL veiculados em PLU 10% (p/p).

A figura 41 mostra que o perfil de liberação do VC encapsulado em lipossomas unilamelares é mais lento em relação ao fármaco livre (Figura 40). Este fato ocorre, pois o fármaco encapsulado em lipossomas está na sua forma mais compartimentalizada, isto é deve sofrer principalmente um processo de difusão através da bicamada lipídica alcançando o meio dispersante, posteriormente este atravessa a membrana de acetato de celulose atingindo o meio receptor, sendo somente após estes processos quantificado. Entretanto, o fármaco livre por estar prontamente disponível no meio atravessa a membrana de acetato de celulose num espaço de tempo menor e numa velocidade maior o que justifica uma concentração maior de VC liberado em função do tempo para o fármaco livre.

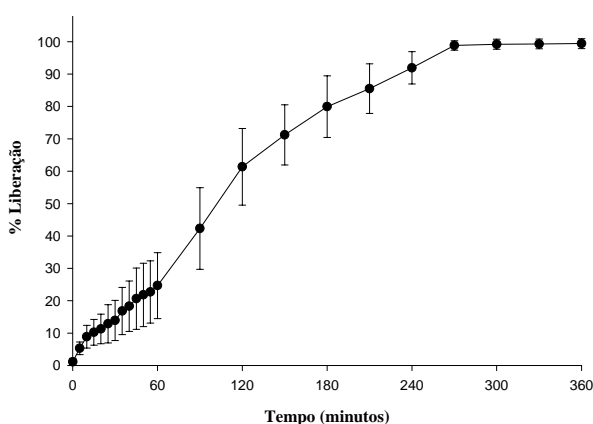


Figura 40. Perfil de liberação *in vitro* do fármaco livre. Condições experimentais: $T = 35 \pm 0,5^\circ\text{C}$; Meio Receptor: Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2; Aplicação: 0,1 mL (equivalente a 1 mg de VC). $n=3$.

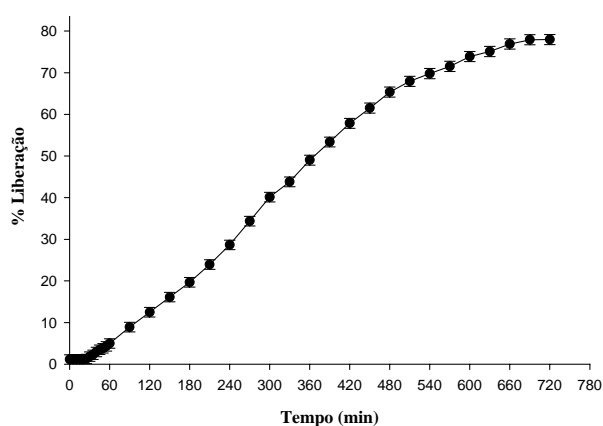
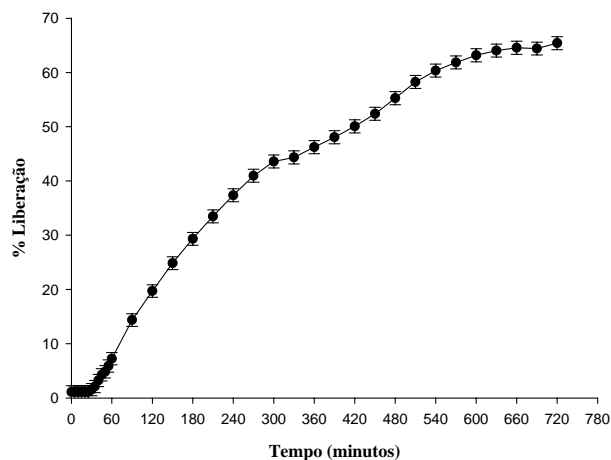


Figura 41. Perfil de liberação *in vitro* da VC a partir de SUV. Condições experimentais: $T = 35 \pm 0,5^\circ\text{C}$; Meio Receptor: Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2; Aplicação: 0,1 mL (equivalente a 1 mg de VC); $[\text{PCH}] = 50\text{mM}$. $n=3$.

Observa-se ainda que para o fármaco disperso em gel de PLU (Figuras 42, 44 e 46) a liberação é mais lenta quando comparado ao fármaco livre (Figura 40), isto provavelmente ocorre, pois o VC e o copolímero possuem características de hidrofobicidade, sendo que esta favorece a solubilização do fármaco no meio dispersante, o qual por sua vez possui

características reológicas de elevação da viscosidade em função da temperatura e do aumento da concentração de PLU. Além disso, os géis de PLU consistem de populações micelares em fase aquosa sendo que o fármaco incorporado para ser liberado tende a sofrer um processo de difusão através dos canais extra-micelares da matrix do gel (VEYRIES et al., 1999). Estes fatores colaboram para uma difusão mais lenta do fármaco através da membrana de acetato de celulose quando comparado ao fármaco livre. Entretanto, para os lipossomas contendo VC em PLU (Figuras 43, 45 e 47) a liberação é mais lenta quando comparada ao perfil de liberação do VC em PLU (Figuras 42, 44 e 46), pois o fármaco além de estar compartimentalizado e ter que se difundir pela bicamada lipídica alcança um meio dispersante de maior viscosidade proporcionando uma concentração menor de VC liberada no decorrer do tempo. Observa-se também que o perfil de liberação para o VC encapsulado em lipossomas e para o VC em PLU



diminuiu com o aumento da concentração de copolímero.

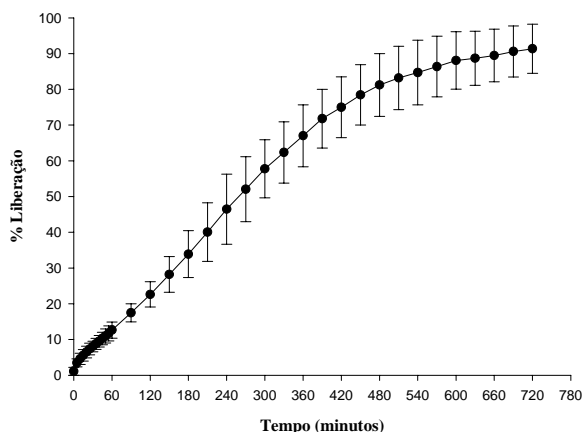


Figura 42. Perfil de liberação *in vitro* da VC em PLU 5% (p/n). Condições experimentais:

Figura 43. Perfil de liberação *in vitro* da VC em PLU 5% (p/n) a partir de SUVs. Condições

Bruna Juliana Wanczinski

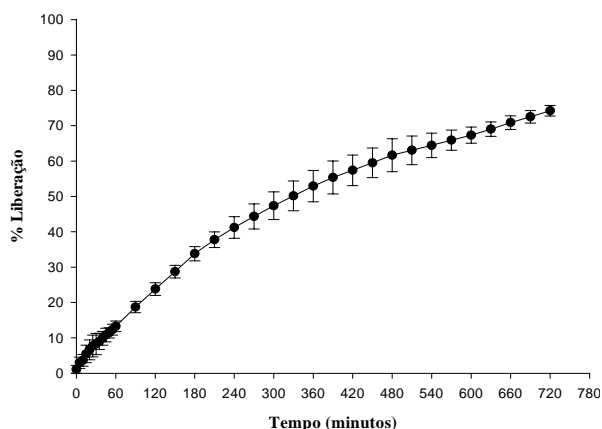


Figura 44. Perfil de liberação *in vitro* da VC em PLU 7,5% (p/p). Condições experimentais: $T=35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Meio Receptor: Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2; Aplicação: 0,1 mL (equivalente a 1 mg de VC); [PLU]=7,5% (p/p). n=3.

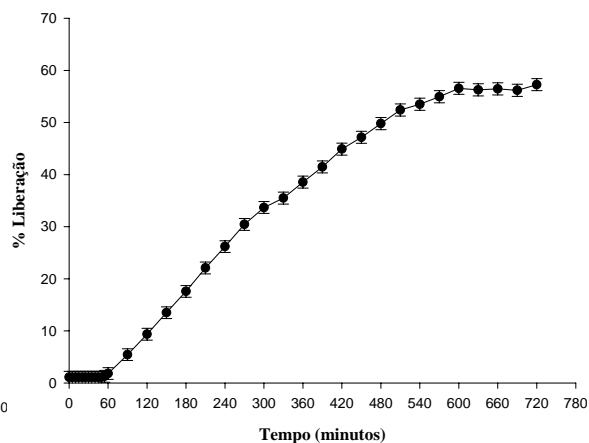


Figura 45. Perfil de liberação *in vitro* da VC em PLU 7,5% (p/p) a partir de SUVs. Condições experimentais: $T=35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Meio Receptor: Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2; Aplicação: 0,1 mL (equivalente a 1 mg de VC); [PCH]=50 mM; [PLU]=7,5% (p/p). n=3.

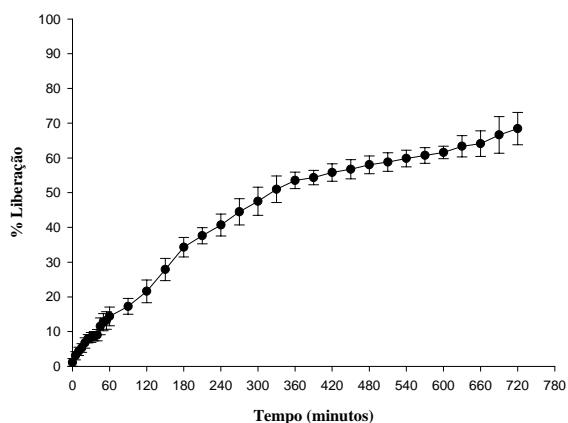


Figura 46. Perfil de liberação *in vitro* da VC em PLU 10,0% (p/p). Condições experimentais: $T=35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Meio Receptor: Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2; Aplicação: 0,1 mL (equivalente a 1 mg de VC); [PLU]=10% (p/p). n=3.

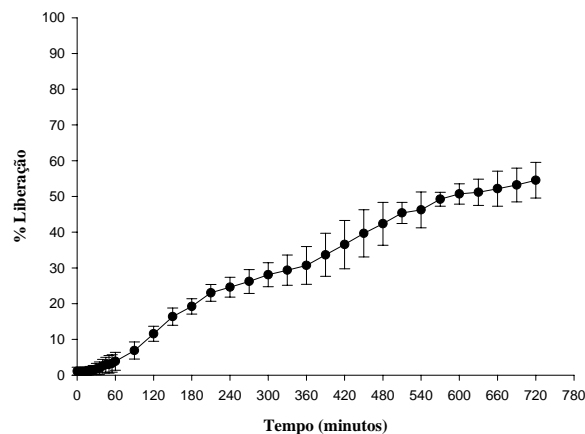


Figura 47. Perfil de liberação *in vitro* da VC em PLU 10,0% (p/p) a partir de SUVs. Condições experimentais: $T=35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Meio Receptor: Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,2; Aplicação: 0,1 mL (equivalente a 1 mg de VC); [PCH]=50 mM; [PLU]=10% (p/p). n=3.

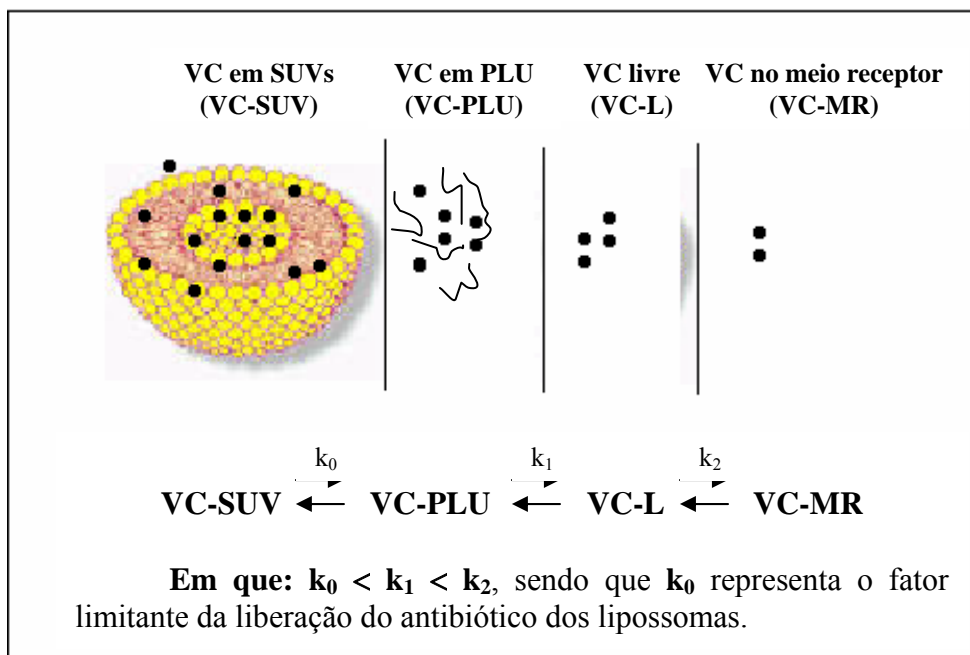


Figura 48. Representação esquemática do processo de liberação *in vitro*.

No esquema da figura 48, k_0 representa a liberação do antibiótico das formulações com lipossomas para o meio externo. O fármaco quando sofre o processo de difusão nos lipossomas atinge o meio dispersante, e atravessa a membrana polimérica atingindo assim a solução receptora. Pode-se observar que os gráficos de liberação indicam que a velocidade de saída do antibiótico das dispersões (k_0) é menor do que a de passagem através do PLU (k_1) e da membrana polimérica (k_2), o que determina o perfil de liberação lenta do VC encapsulado em lipossomas e veiculados em copolímero termosensível.

Observou-se também que os lipossomas contendo VC, apresentaram conforme demonstrado anteriormente, um coeficiente de difusão maior quando comparado aos lipossomas veiculados em copolímero termosensível, o que colabora para um processo de difusão mais rápido do fármaco para o meio receptor. Os lipossomas constituídos de PCH e

PLU 10% apresentaram o menor coeficiente de difusão e conforme observado na figura 47 um perfil de liberação mais lento, provavelmente em virtude do coeficiente de difusão como também da maior viscosidade do meio dispersante nesta concentração de copolímero.

11. Efeito da encapsulação de VC na infecção experimental e Análise Microbiológica

O efeito de lipossomas estruturados com 50 mM de PCH contendo 10% de PLU na infecção experimental foi verificado através da inoculação de cepa de *S. epidermidis* (ATCC 1755) no vítreo direito de coelhos, e posterior tratamento pela administração intravitreal de fármaco livre e encapsulado em SUVs.

Bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus* são responsáveis por cerca de 94% dos casos de endoftalmite bacteriana, sendo que deste total 70% das espécies isoladas são de *S. epidermidis*, 10% de *S. aureus* e aproximadamente 2% de *Enterococcus* sp (KASPAR et al., 2001).

Apesar da baixa virulência do *S. epidermidis*, uma vez penetrado no segmento posterior dos olhos, este microrganismo pode levar a um quadro de endoftalmite severa que, se não tratado de forma adequada, pode levar à perda da visão ou até mesmo do olho (OUM et al., 1989; SMITH et al., 1991 ROTH e FLYNN, 1997; KASPAR et al., 2001).

As figuras 49 e 51 mostram um quadro característico de endoftalmite moderada desenvolvida após 24 horas da administração de cepa de *S. epidermidis* na cavidade vítrea de olho direito de coelhos. Os sinais resultantes da infecção verificados na inspeção e documentados por meio de fotografia do segmento anterior foram hiperemia e quemose da conjuntiva, edema de córnea, turvação e hipópio de câmara anterior.

A administração intravitreal de antimicrobianos é ainda um dos principais meios de se tratar a endoftalmite de etiologia bacteriana. Entretanto, injeções intravítreas repetidas de fármaco são necessárias para manter a concentração terapêutica efetiva e estão associadas ao

desenvolvimento de patologias oculares secundárias como catarata, descolamento retinal, hemorragia, entre outros. Além do surgimento de efeitos tóxicos oriundos da administração freqüente de fármacos (KASPAR et al., 2001; BOCHOT et al., 2002).

O VC ainda é um dos antibióticos mais eficazes na endoftalmite causada por bactérias gram-positivas (OUM et al., 1989; SMITH et al., 1991 ROTH e FLYNN, 1997).

Neste estudo, observou-se que vinte e quatro horas após a injeção de VC encapsulado em SUVs verificou-se melhora importante dos sinais de endoftalmite, como hiperemia e quemose conjuntivais, hipópio e edema de córnea. Com 48 e 72 horas após a injeção dos lipossomas, externamente os olhos injetados assemelhavam-se aos olhos contra-laterais. Após, a injeção de solução de VC, a evolução clínica foi semelhante. Os olhos injetados com salina pioraram progressivamente ao longo dos 3 dias após a injeção de salina.

A figura 50 representa o tratamento da infecção experimental pela administração intravitreal de fármaco livre na concentração de 1 mg/0,1 mL após 72 horas da administração do fármaco. Observa-se que este tratamento resultou em hemorragia no globo ocular de alguns coelhos, provavelmente em razão do modo de administração do fármaco, pois segundo Kattan e Pflugfelder (1989) somente administração intravitreal de 5 mg ou mais de VC estão associadas a reações indesejáveis no corpo vítreo de coelhos. Homer et al. (1975) foram os primeiros pesquisadores a estudarem a toxicidade do VC administrado via intravitreal em coelhos e concluíram que a injeção intravítrea de 1 mg ou menos deste fármaco não está relacionada a anormalidades no eletroretinograma como também a alterações histológicas característica de toxicidade. Entretanto, a administração intravitreal de 2 a 5 mg de VC no corpo vítreo está associada com toxicidade local na retina com degeneração dos segmentos fotoreceptores, sendo que acima de 10 mg há total destruição retinal (HOMER et al., 1975; KATTAN e PFLUGFELDER, 1989).

Na figura 52 verifica-se que a administração intravitreal da mesma concentração de VC encapsulado em lipossomas de PCH veiculados em gel de PLU a 10% reduziu a infecção experimental.

A análise clínica nos olhos dos coelhos, através de lupa de grande aumento, demonstrou que a infecção reduziu com ambas as formulações utilizadas no tratamento do vítreo dos coelhos (Figuras 50 e 52).



Figura 49. A seta indica o olho infectado pela administração intravitreal de cepa de *S. epidermidis* provocando a endoftalmite experimental.

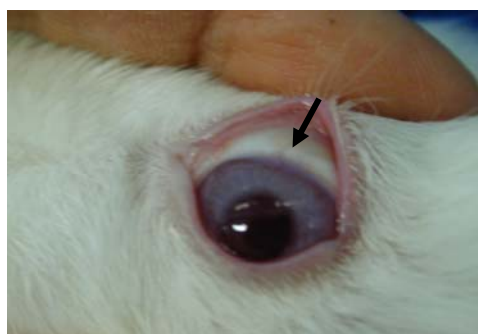


Figura 50. A seta indica o tratamento com administração intravitreal de VC 10 mg/mL.



Figura 51. A seta indica o olho infectado pela administração intravitreal de cepa de *S. epidermidis* provocando a endoftalmite experimental.



Figura 52. A seta indica o tratamento com administração intravitreal de lipossomas contendo VC e PLU 10% (p/p).

Apesar da evolução clínica ter sido favorável em ambas as formulações teste, a análise microbiológica, no entanto, diferiu entre as mesmas. Na figura 53 pode-se observar que nos coelhos que receberam a administração intravitreal de lipossomas contendo VC foi verificado

um número menor de colônias resultantes da semeadura de amostras do vítreo infectado, em relação ao grupo tratado com solução aquosa de VC e dos coelhos que receberam a administração intravítrea de salina (grupo controle). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) levando-se em consideração os olhos de coelhos sacrificados 72 horas após a injeção intravítrea de antibiótico ou salina. A cultura de diluições do vítreo puro a 10^{-2} e 10^{-4} mostraram quantidade respectivamente menores de colônias e serviram para comprovação do estudo microbiológico.

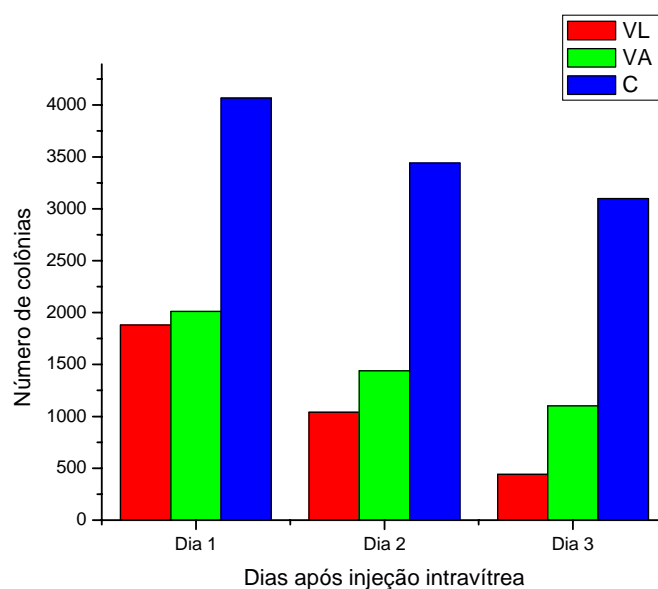


Figura 53. Número médio de colônias resultantes de semeadura de vítreo puro dos olhos de coelhos pertencentes ao grupo injetados com lipossomas (VL), tratados com solução aquosa de VC (VA) e controle (C). Pode-se notar a variação do número de colônias 24 horas (Dia 1), 48 horas (Dia 2) e 72 horas (Dia 3) após a injeção intravítrea de antibiótico ou salina.

Estas observações, em princípio, levam a crer que a encapsulação de vancomicina veiculado em copolímero termosensível em lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada pode representar vantagens do ponto de vista farmacológico e clínico.

12. Determinação da quantidade de VC no humor vítreo e aquoso em função do tempo

As infecções que acometem o segmento posterior dos olhos são de difícil tratamento devido à utilização de antibióticos de meia-vida de eliminação muito curta na cavidade vítrea, implicando em administrações repetidas de fármaco que acabam levando a severos efeitos colaterais e a um certo desconforto por parte do paciente (HOMER et al., 1975; LEE, 1990; KAUR et al., 2004). Novos métodos de liberação de fármacos oftálmicos têm sido desenvolvidos visando facilitar o tratamento de uma variedade de patologias oculares. Lipossomas apresentam grande potencial como um sistema de liberação de fármacos no globo ocular, entretanto, existem relatos na literatura de que estas vesículas se difundem rapidamente na cavidade vítrea podendo levar a um certo desconforto visual (PEYMAN e GANIBAN, 1995) além do que sua baixa viscosidade implica em um curto tempo de retenção do fármaco no globo ocular (BOCHOT et al., 1998). Uma das formas de se melhorar a utilização deste tipo de agregado é associação de lipossomas com copolímeros termosensíveis (PLU). Este sinergismo pode levar à obtenção de vesículas de elevado tempo de retenção da substância ativa nos olhos e a uma maior adesão do paciente ao tratamento.

Neste estudo, avaliou-se o perfil de liberação do VC no sistema proposto (lipossomas constituídos de PCH contendo fármaco na concentração de 10 mg/mL e PLU 10% no corpo vítreo de olhos de coelhos albinos.

O conteúdo de fármaco de cada amostra do humor vítreo e aquoso foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência. O sistema de CLAE utilizado foi o descrito conforme metodologia do item 1.2.1. Primeiramente, analisaram-se amostras do humor vítreo e aquoso provenientes de coelhos saudáveis, isto é que não receberam a administração intravítrea da fórmula lipossomal contendo o fármaco modelo.

Os cromatogramas apresentados nas figuras 54a e 55a mostram que não é necessário proceder a extração do fármaco das amostras provenientes do humor vítreo e aquoso devido à ausência de interferentes no tempo de retenção do fármaco em estudo.

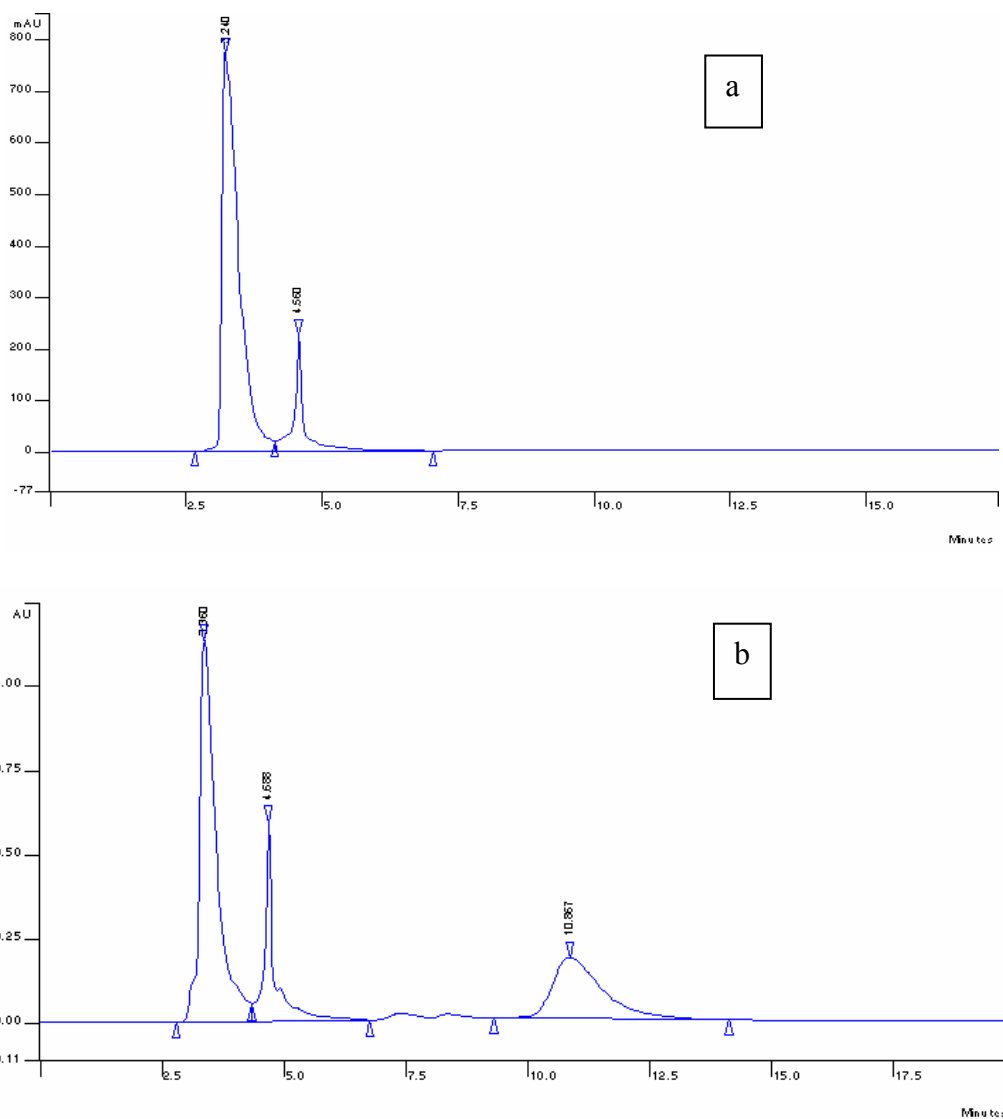


Figura 54. Cromatograma de amostra de humor vítreo (branco) (a) e amostra de humor vítreo contendo fármaco (b) obtido na análise por CLAE.

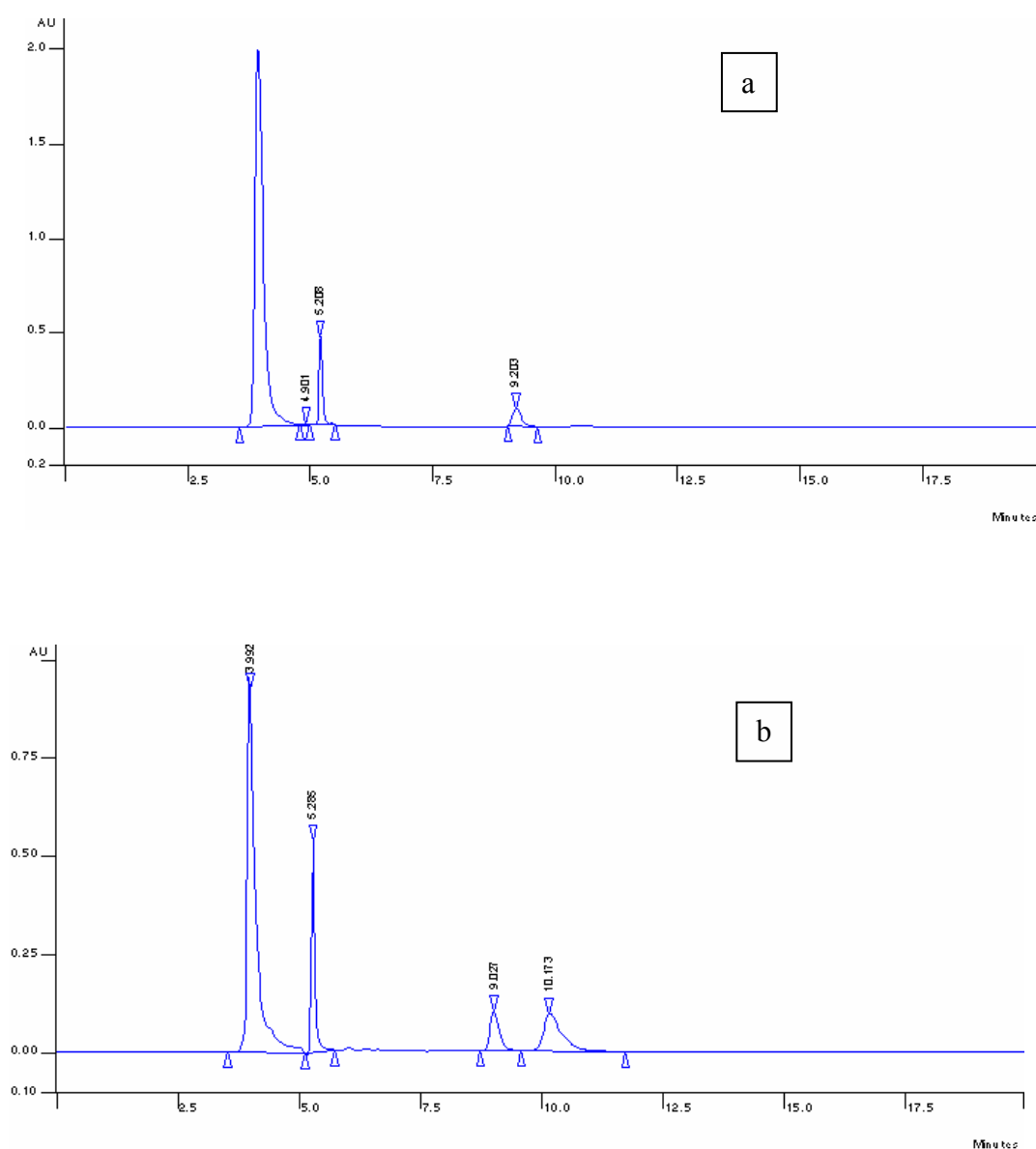


Figura 55. Cromatograma de amostra de humor aquoso (branco) (a) e amostra de humor aquoso contendo fármaco (b) obtido na análise por CLAE.

O bioensaio é essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e se baseia na comparação efetuada entre a curva de resposta obtida relacionando-se a concentração de fármaco quantificada em determinado período de tempo de um composto conhecido com a de um desconhecido utilizando-se um modelo animal adequado. Entretanto, o principal problema

observado nestes estudos é o da variação biológica sendo muitas vezes responsável pelo desvio padrão elevado nestes ensaios.

O ensaio de biodisponibilidade do fármaco livre e encapsulado em SUVs foi realizado através da quantificação de VC encontrada no humor vítreo e aquoso em olhos de coelhos no decorrer do tempo (total de 6 dias). A figura 56b mostra que a administração intravitreal de fármaco encapsulado em SUVs e veiculado em PLU proporcionou uma maior concentração de fármaco no humor vítreo em função do tempo quando comparado a administração intravitreal do fármaco livre (figura 56a). Observa-se também que o tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) da VC no humor vítreo é de aproximadamente 0,3 dia (=7,2h) para o fármaco livre e de 1,8 dias (=43,2 h) para o fármaco encapsulado em SUVs e veiculado em PLU. Verifica-se que a encapsulação do fármaco em SUVs aumentou o $t_{1/2}$ em cerca de 6 vezes. Sendo que o $t_{1/4}$ (2º tempo de meia-vida de eliminação) é de 0,7 dias (=16,8h) para o fármaco livre e de 3,5 dias (=84h) para o fármaco encapsulado em SUVs.

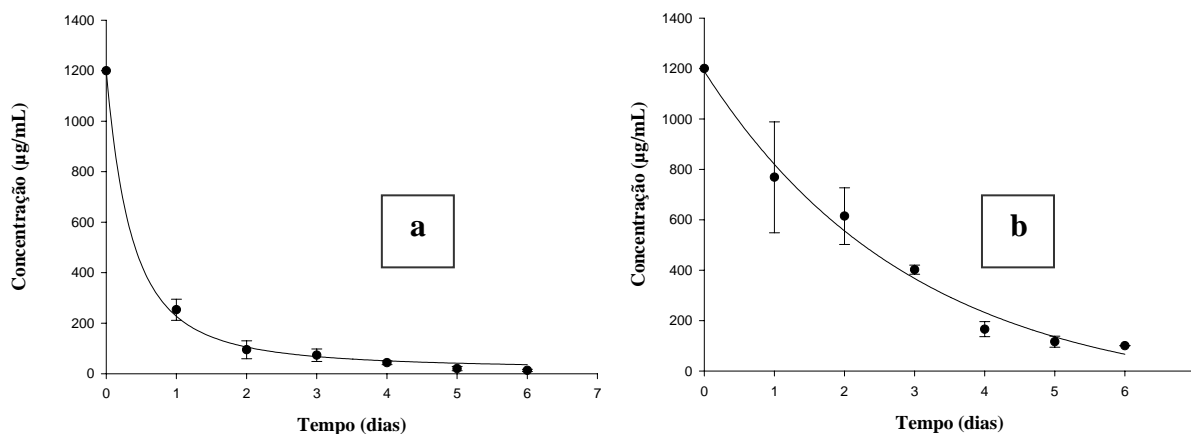


Figura 56. Variação dos níveis de concentração de VC no humor vítreo em função do tempo (dias) com o fármaco livre (a) e fármaco encapsulado em lipossomas estruturados com 50 mM de PCH e veiculados em PLU 10% (p/p) (b).

Este aumento na concentração de VC no humor vítreo estando o fármaco encapsulado em SUVs é justificado pois, quando o fármaco livre é administrado no corpo vítreo tem-se uma concentração inicial de fármaco muito elevada, entretanto a concentração num tempo posterior, t , irá depender da velocidade de eliminação do fármaco. O fármaco livre, por estar em solução, é rapidamente distribuído e eliminado, acarretando uma diminuição da concentração de VC em um menor espaço de tempo e, conseqüentemente, levando a um $t_{1/2}$ menor. Entretanto, para o fármaco encapsulado em SUVs e veiculado em PLU tem-se uma velocidade de distribuição e eliminação menor pois uma fração deste encontra-se aprisionado no interior da vesícula, o que favorece a uma concentração maior de VC no humor vítreo pois o fármaco estando compartimentalizado terá que se difundir pela bicamada lipídica atingindo um meio dispersante de elevada viscosidade o que colabora para um maior tempo de retenção da VC no humor vítreo. Observa-se ainda que após 6 dias da administração do fármaco encapsulado em SUVs, os níveis de antibiótico no corpo vítreo permaneceram maiores quando comparado aos níveis obtidos com a administração intravítreal do fármaco livre e bem acima da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de bactérias causadoras de patologias oculares, como a endoftalmite.

Os resultados da concentração de VC em função do tempo encontrados com a fórmula lipossomal no humor vítreo estão de acordo com Bochot et al. (2000, 2002), que descrevem um aumento do tempo de retenção de fármacos no vítreo após a administração intravítreal de lipossomas. Além do maior tempo de retenção proporcionado por estas vesículas, os lipossomas protegem o fármaco da ação das enzimas metabólicas presentes no epitélio ocular (KAUR et al., 2004). O uso de polímeros termosensíveis favorece ao aumento da viscosidade do meio dispersante e, conseqüentemente, do tempo de retenção do fármaco no globo ocular, assim como implementam a liberação de fármacos a partir de lipossomas (CHANDAROY et al., 2001).

A figura 57b mostra que os níveis de fármaco no humor aquoso foram superiores quando o fármaco estava encapsulado em SUVs quando comparado ao fármaco livre (Figura 57a). Verifica-se que ambas as formulações no tempo 0 (t_0) possuem uma concentração elevada de fármaco no humor vítreo e uma concentração nula de VC no humor aquoso, observada se extrapolarmos as curvas em sino para t_0 ; isto se deve em virtude da própria administração intravítrea que no t_0 proporciona aproximadamente 100% de biodisponibilidade na cavidade vítrea. Entretanto, à medida em que o fármaco vai sendo distribuído para o segmento anterior e/ou demais tecidos, a concentração de VC no humor vítreo diminui, sendo que no humor aquoso a concentração tende a atingir uma concentração máxima que cai com o decorrer do tempo devido aos parâmetros farmacocinéticos e fisiológicos do globo ocular.

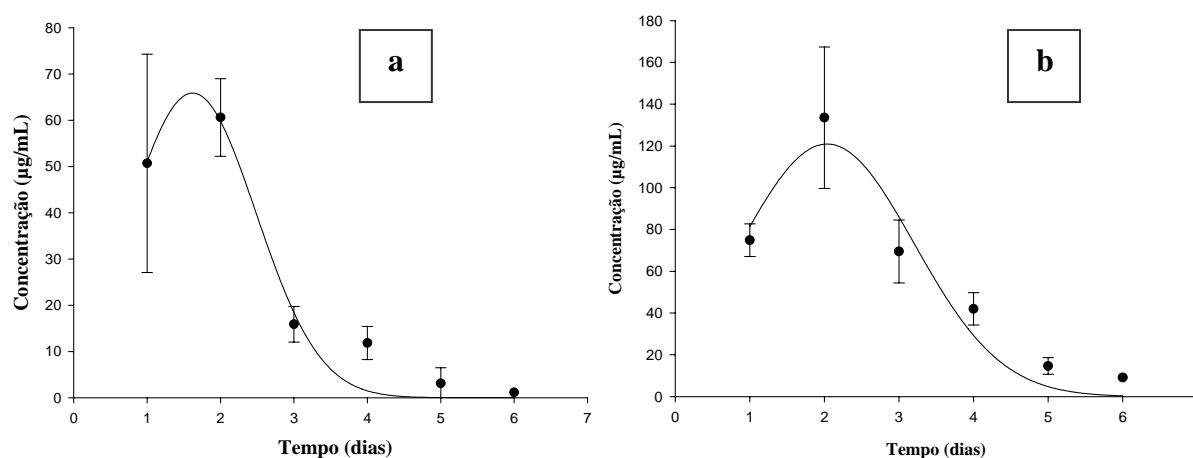


Figura 57. Variação dos níveis de concentração de VC no humor aquoso em função do tempo (dias) com o fármaco livre (a) e fármaco encapsulado em lipossomas estruturados com 50 mM de PCH em PLU 10% (p/p) (b).

De acordo com a figura 57a observa-se que, quando a concentração de VC no humor aquoso atinge uma concentração máxima de aproximadamente 65 µg/mL em torno do 1,5 dia

(=36h), a concentração de VC no humor vítreo é de aproximadamente 120 µg/mL (Figura 56a), em virtude da rápida distribuição do antibiótico a partir do humor vítreo. Entretanto, quando o fármaco atinge o segmento anterior é rapidamente eliminado pelo lacrimejamento e drenagem nasolacrimal, entre outros processos, levando à queda da concentração do fármaco a valores mínimos no decorrer do tempo no compartimento aquoso.

Na figura 56b observa-se que, quando a concentração de VC no humor vítreo é de aproximadamente 600 µg/mL no 2º dia (=48h), a concentração de VC no humor aquoso atinge uma concentração máxima de aproximadamente 130 µg/mL (figura 57b). Estes valores ainda são bem maiores, quando comparados aos encontrados nestes compartimentos para o fármaco livre.

Conclui-se que a encapsulação do fármaco no sistema proposto aumentou a meia-vida de eliminação do antibiótico na cavidade vítrea, quando comparada à administração intravítreal do fármaco livre. Este fato é muito importante, pois no caso da endoftalmite, um dos grandes problemas no seu tratamento está nas administrações repetidas de VC via intravítreal, o que leva a um certo desconforto por parte do paciente. O sistema estudado, lipossomas contendo VC veiculados em PLU 10% (p/p), foi capaz de manter a concentração efetiva do fármaco por um período de tempo prolongado, o que acaba sendo uma alternativa promissora e adequada no tratamento de patologias que acometem o segmento posterior dos olhos e principalmente evitando desta maneira várias re-injeções de antibióticos no humor vítreo.

CONCLUSÕES

- ✓ A adição de copolímero termosensível na concentração de 10% (p/p) proporcionou a formação de vesículas em um espaço de tempo menor de sonicação quando comparado às demais preparações.
- ✓ A determinação do diâmetro mostrou que os lipossomas isentos de antibiótico tiveram seu tamanho reduzido na presença de PLU. Entretanto, para os lipossomas contendo VC os diâmetros aumentaram de 88 a 113 nm, quando a concentração de PLU variou de 5 a 10% (p/p). Verificou-se desta maneira, que o copolímero pode estar interagindo com a bicamada lipídica dos lipossomas interferindo diretamente no diâmetro médio dos mesmos, mas proporcionando estruturas de tamanho adequadas à administração intravitreal.
- ✓ A adição de VC provocou redução no tamanho das vesículas sem copolímero termosensível.
- ✓ A eficiência de encapsulação aumentou com a adição de copolímero termosensível no sistema. Para o sistema constituído de fármaco em lipossomas veiculados em PLU 10% (p/p), quanto maior a quantidade de fármaco adicionado menor é a eficiência de encapsulação (%) e maior é a quantidade de fármaco encapsulado.
- ✓ A análise clínica nos olhos dos coelhos, através de lupa de grande aumento, demonstrou que a infecção reduziu em ambos os coelhos tratados com a fórmula lipossomal e com a solução do fármaco livre, entretanto o número de colônias no vítreo provenientes de coelhos tratados com a fórmula lipossomal é bem menor em relação aos coelhos tratados com

a solução de VC. Isto nos leva a crer que a encapsulação de VC veiculado em copolímero termosensível em lipossomas de PCH pode representar vantagens do ponto de vista farmacológico e clínico.

✓ Os ensaios de liberação *in vitro* mostraram que a velocidade de liberação do VC encapsulado em lipossomas unilamelares e veiculados em PLU é mais lento em relação ao VC livre. Observa-se, ainda, que para o fármaco encapsulado em lipossomas, a liberação é dependente da presença de PLU no sistema, diminuindo significativamente com o aumento da concentração de copolímero.

✓ Os ensaios *in vivo* demonstraram um aumento da meia-vida de eliminação do fármaco no segmento posterior dos olhos com os lipossomas contendo VC veiculados em PLU quando comparado ao fármaco livre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Br J Ophthalmol.** v. 78, p. 677-680, 1994.

ALLEN, T.M. Liposomal drug formulations. **Drugs.** v. 56, p. 747-756, 1998.

ANDERSON, B.C.; PANDIT, N.K.; MALLAPRAGADA, S.K. Understanding drug release from poly (ethylene oxide)-*b*-poly (propylene oxide)-*b*-poly (ethylene oxide) gels. **J Control Release.** v. 70, p. 157-167, 2001.

ALGHADYAN, A.A.; PEYMAN, G.A.; KHOUBEHI, B.; MILNER, S.; LIU, K.R. Liposome bound cyclosporine: aqueous and vitreous level after subconjunctival injection. **Int Ophthalmol.** v.12, p. 101-104, 1988.

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

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T. **Surfactants Systems: their chemistry, pharmacy and biology.** London: Chapman & Hall, 1983. p. 739-748.

BAILU, G.R.; NEAL, D. Vancomycin ototoxicity and nephrotoxicity: a review. **Med Toxicol.** v. 3, p. 376-386, 1988.

BAKKER-WOUNDENBERG, A.J.M.; LOOKERSE, A.F.; ROERDINK, F.; REGTS, D.; MICHEL, M.F. Free versus liposome-entrapped ampicilin in treatment of infection due to *Listeria monocytogenes* in normal and athymic nude mice. **J Infec Dis.** v. 151, p. 917-924, 1985.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. **J Mol Biol.** v. 13, p. 138, 1965.

BANGHAM, A.D. Lipid bilayers and biomembranes. **Annu Rev Biochem.** v. 41, p. 753-776, 1972.

BANGHAM, A.D.; HILL, M.W.; MILLER, N.G.A. In: KORN, E.D. (Ed.). **Methods in membrane biology.** New York: Plenum Press, 1974. v.1, p. 1-68.

BANGHAM, A.D. **Preparation of liposomes and methods for measuring their permeabilities.** New York: Plenum Press. In: _____. Techniques in the life sciences. 1977, p. B4/11, B420/25.

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

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

BENSON, H. Permeability of the cornea to topically applied drugs. **Arch Ophthalmol.** v. 91, p. 313-327, 1974.

BERGER, N.; SACHSE, A.; BENDER, J.; SCHUBERT, R.; BRANDL, M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. **Int J Pharm.** v. 223, p. 55-68, 2001.

BERTHOLD, A.; NAIR, U.B.; BAGWILL, C.; ARMSTRONG, D.W. Derivatized vancomycin stationary phases for LC chiral separations. **Talanta,** v.43, p.1767-1782, 1996.

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.

BOCHOT, A.; FATTAL, E.; BOUTED, V.; J.L.; DEVERRE, J.R.; JEANNY, J.C.; CHACUN, H.; COUVREUR, P. Intravitreal delivery of oligonucleotides by sterically stabilized liposomes. **Invest Ophthalmol Visual Sci.** v. 43, p. 253-259, 2002.

BRITISH Pharmacopoeia. 2001. ed. v. I. London: The Stationery Office, 2001. 1744 p.

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.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobial agents: Protein Synthesis Inhibitors and Miscellaneous Antibacterial Agents. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.) **Goodman & Gilman: the pharmacological basis of therapeutics.** 10th ed. United States of America: McGraw-Hill Companies. 2001. Chapter 46, p. 1239-1271.

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.

CHRAI, S.S.; ROBINSON, J.R. Ocular evaluation of methylcellulose vehicle in albino rabbits. **J Pharm Sci.** v. 68, p. 1218-1223, 1974.

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.

CROMMELIN, D.J.A.; SCHREIER, H. Liposomes. In: KREUTER, J. (Ed). **Colloidal drug delivery systems.** New York: Marcell Dekker, 1994. p. 73-190.

CUNHA, B.A.; RISTUCCIA, A.M. Clinical usefulness of vancomycin. **Clin Pharm.** v. 2, p. 417-424, 1983.

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

DEL NOZAI, M.J.; BERNAL, J.L.; PAMPLIEGA, A.; MARINERO, P.; LÓPEZ, M.I.; COCO, R. High Performance Liquid Chromatography determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous, aqueous humor after intravitreal injection of the drug. **J Chromatogr.** v. 727, p. 231-238, 1996.

DE NOBILI, M.; GJESSING, E.; SEQUI, P. Sizes and shapes of humic by gel chromatography . In: HAYES, M.H.; MACARTHY, P.; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S. ed. **Humic substances. II: in search of structure.** New York: J. Wiley, 1989. p. 561-591.

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.

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

DUZGUNES, N. Treatment of human immunodeficiency virus, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* infections by liposome-encapsulated drugs. In: LASIC, D.D.; PAPAHAPOULOS, D. **Medical applications of liposomes.** Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 189-219.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as na 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.

ENGELHARD PERSONAL CARE MATERIALS. Overview of liposomes. Disponível em: <http://www.collabo.com/liposome.htm>. Acesso em 27/02/2004.

FARMACOPÉIA Brasileira 4. ed. Atheneu Ed. 1988. p. 2.6.

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

FRANK, L.S.; HUANG,L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. **Int J Pharm**. v. 144, p. 131-139, 1996.

FREISE, J. The preparation of sterile drug containing liposomes. In: Gregoriadis, G.(Ed.). **Liposome Technology**. Boca Raton: CRC Press, 1984. v.1, p. 131-137.

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.J. **Lipossomas contendo vancomicina veiculados em gel de Pluronic para aplicação intraocular**. 2003. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, Brasil.

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

GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. **N Engl J Med**. v. 295, p. 704-706, 1976.

GREGORIADIS, G. Gregoriadis (Ed.). **Liposomes as drug carriers: recent trends and progress**. Chichester: John Wiley, 1988a.

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

GREGORIADIS, G. Special liposome issue. **Int J Pharm** . v.162, p. 1-3, 1998.

GUPTA, S K; VELPANDIAN, T.; DHINGRA, N.; JAISWAL, J. Intravitreal pharmacokinetics of plain and liposome-entrapped fluconazole in rabbit eyes. **J Ocular Pharmacol Therapeut**. v. 16, p. 511-518, 2000.

HAMILTON, R.L.; GOERKE, J.; GUO, L.; WILLIAMS, M.C.; HAVEL, R.J.J. Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. **Lipids Res**. v. 21, p. 981-982, 1980.

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

HAUNG, C. Studies on phosphatidylcholine vesicles, formation and physical characteristics. **Biochemistry.** v. 8, p.344-352, 1969.

HAYASHI, H.; KONO, K.; TAKAGISHI, T. Temperature-dependent associating property of liposomes modified with a thermosensitive polymer. **Bioconjug Chem.** v. 9, p. 382-389, 1998.

HOMER, P.; PEYMAN, G.A.; KOZIOL, J.; SANDERS, D. Intravitreal injection of vancomycin in experimental staphylococcal endophthalmitis. **Acta Ophthalmol.** v. 53, p. 311-320, 1975.

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. **Colloid Surface B.** 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.

JACQUIN, C.; NASICA, X.; GUILLARD, D.; AUJOULAT, O.; STOECKEL, C. Intravitreal treatment of endophthalmitis. **Méd Mal Infect.** v. 31, p. 493-497, 2001.

JAFERT, C.T.; VAN HOOFF, P.L.; HEATH, J. Solubilization of non-polar compounds by non-ionic micelles. **Wat Res.** v. 28, p. 1009-1017, 1994.

JAMSHAD, M.; FARR, S.J.; KEARNEY, P., KELLAWAY, I.W. Poloxamer sorption on liposomes: comparison with polystyrene latex and influence on solute efflux. **Int J Pharm.** v. 88, p. 125-131, 1988.

JAWETZ, E. Fármacos com Indicações Especializadas e Anti-Sépticos Urinários. In: 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 extrusion of multilamellar vesicles 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.

KASPAR, H.M.; HOEPFNER, A.S.; ENGELBERT, M.; THIEL, M.; TA, C.N.; METTE, M.; SCHULZE-SCHWERING, M.; GRASBON, T.; SESMA-VEA, B.; CASAS, J.M.; ITURRALDE-GONI, R.; KLAUSS, V.; KAMPIK, A. Antibiotic resistance pattern and visual outcome in experimentally-induced *S. epidermidis* endophthalmitis in a rabbit model. **Ophthalmology.** v. 108, p. 470-477, 2001.

KATAYAMA, K.; KATO, Y.; ONISHI, H.; NAGAI, T.; MACHIDA, Y. Preparation of novel double liposomes using the glass-filter method. **Int J Pharm.** v. 248, p. 93-99, 2002.

KATTAN, H.; PFLUGFELDER, S.C. Complications of intraocular antimicrobial agents. **Int Ophthalmic Clin.** v. 29, p. 188-194, 1989.

KATZUNG, B.G. (Ed.) **Farmacologia Básica & Clínica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 562.

KAUR, I. P.; SMITHA, R; AGGARWAL, D.; KAPIL, MONA. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. **Int J Pharm.** v. 248, p. 1-14, 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.

KENO, 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.

KIKUCHI, H.; CARLSSON, A.; YACHI, A.; HIROTA, S. Possibility of heat sterilization of liposomes. **Chem Pharm Bug.** v.39, p. 1018-1022, 1991.

KIM, E.K.; KIM, H.B. Pharmacokinetics of intravitreally injected liposome encapsulated tobramycin in normal rabbits. **Younsei Med.** v. 31, p. 308-314, 1990.

KIM, J.C.; BAE, S.K.; KIM, J.D. Temperature sensitivity of liposomal lipid bilayers mixed with poly (N-iso-propylacrylamide-co-acryhe acid). **J Biochem.** v. 121, p. 15-19, 1997.

KONINGS, A.W.T. Lipid peroxidation in liposomes. In GREGORIADIS, G. (Ed.), **Liposome Technology.** Boca Raton: CRC Press, 1984. v. 1, p. 139-163.

KORMAN, T.M.; TURNIDGE, J.D.; GRAYSON, M.L. Risk factors for adverse cutaneous reactions associated with intravenous vancomycin. **J Antimicrob Chemother.** v. 39, p. 371-381, 1997.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico guanabara.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999, E.L.18 p.

KRESLOFF, M.S.; CASTELLARIN, A.A.; ZARBIN, M.A. Endophtalmitis. **Surv. Ophthalmol.** v.43, p.193-224, 1998.

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. **Liposomes in gene delivery**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p.67-113.

LASIC, D.D.; PAPAHAPOULOS, D. Liposomes in medicine. In: LASIC, D.D.; PAPAHAPOULOS, D. **Medical applications of liposomes**. Amsterdam: Elsevier. 1998, p. 1-13.

LAURENCIN, C.T.; HORAN, R.F.; SENATUS, P.B.; WHEELER, C.B.; LIPSON, S.J. Stevens-Johnson-like reaction with vancomycin treatment. **Ann Pharmacother**. v. 26, p. 1520-1521, 1992.

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

LE BOURLAIS, C.A.; ACAR, L.; ZIA, ROSEIN; SADO, P.A.; NEEDHAM, T.; LRHODES; LEVERGE, R. Ophthalmic drug delivery systems – Recent advances. **Prog Retin Eye Res**. v. 17, p. 33-58, 1998.

LEE, V.H.L.; URREA, P.T.; SMITH, R.E.; SCHANZLIN, D.J. Ocular drug bioavailability from topically applied liposomes. **Survey Ophthalmol**. v. 29, p. 335-348, 1985.

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, V.H.L. Ophthalmic drug delivery systems. In: A.K. Mitra (Ed.). **Drug and the Pharmaceutical Sciences**. New York: Marcel Dekker, 1993a. v. 58, p. 59-81.

LEE, V.H.L. Application of liposomes in ocular drug delivery system. In: PLEYER, U.; SCHIMIDT, K.; THIEL, H.J. (Eds.). **Liposomes in ophthalmology and dermatology**. Stuttgart: Hippokrates Verlag, 1993b. p. 53-59.

LEE, J.W.; PARKE.S.; CHI, S.C. Solubilization of ibuprofen in aqueous solution. **J Kor Pharm Sci**. v. 27, p. 279-286, 1997.

LESIEUR, S.; GABRIELLE-MEDELONT, C.; PATERNOSTRE, M.T.; OLLIVON, M. Size analysis and stability study of lipid vesicles by high performance gel exclusion chromatography, turbidity and dynamic light scattering. **Anal Biochem.** v. 192, p. 334-343, 1991.

LI, V.H.K.; ROBINSON, J.R.; LEE, V.H.L. 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**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 4-61.

LIU, K.R.; PEYMAN, G.A.; KHOUBEHI, B. Efficacy of liposome-bound amphotericin B for the treatment of experimental fungal endophthalmitis in rabbits. **Invest Ophthalmol Visual Sci.** v. 30, p. 1527-1534, 1989.

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

LOPEZ-BERESTEIN, G.; MEHTA, R.; HOPFER, R.L; MILL, K.; KASI, L.; FAINSTEIN, V.; LUNA, M.; HERSH, E.M.; JULIANO, R. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome encapsulated amphotericin. **Brit J Infect Dis** .v. 147, p. 939-944, 1983.

MARGALIT, R.; ALON, R.; LINENBERG, M.; RUBIN, I.; ROSEMAN, T.J.; WOOD, R.W. Liposomal drug delivery: thermodynamic and chemical kinetic considerations. **J Control Release.** v. 17, p. 285-296, 1991.

MARTINDALE: The Extra Pharmacopoeia. 33th ed. London: The Pharmaceutical Press, 2002. 2483 p.

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

MEZEI, M.; MEISNER, D. Liposomes and nanoparticles as ocular drug delivery systems. In: P. Edman (Ed). **Biopharm Ocular Drug Delivery**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 91-104.

MILLER, S.C.; DONOVAN, M.D. Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits. **Int J Pharm**. v. 12, p. 147-252, 1982.

MOGHIMI, S.M.; PATEL, H.M. Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposomes. **Biochim Biophys Acta**. v. 984, p. 384-387, 1989.

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.

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.

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

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.

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. 300 p.

NEWFIELD, P.; ROIZEN, M.F. Hazards of rapid administration of vancomycin. **Ann Int Med**. v. 91, p. 581, 1979.

NIESMAN, M.R. The use of liposomes as drug carriers in ophthalmology. **Crit Rev Drug Carriers Syst**. v. 9, p. 1-38, 1992.

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

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

OLSON, F.; HUNT, C.A.; SZOKA, F.C.; VAIL, W.J.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochim Biophys Acta**. v. 557, p. 9-23, 1979.

ONYEJI, C.O.; NIGHTINGALE, C.H.; MARANGOS, M.N. Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposome entrapped vancomycin and teicoplanin. **Infection**. v. 22, p. 338-342, 1994.

OSTRO, M. (Ed.) **Liposomes: from biophysics to therapeutics**. New York: Marcel Dekker, 1987.

OUM, B.S.; D AMICO, D.J.; WONG, K.W. Intravitreal antibiotic therapy with vancomycin and aminoglycoside. **Arch Ophthalmol**. v. 107, p. 1055-1060, 1989).

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.

PAPAHAADJOPOULOS, D.; BANGHAM, A.D. Biophysical properties of phospholipids. II. Permeability of phosphatidylserine liquid crystals to univalent ions. **Biochim Biophys Acta**. v. 126, p. 185-188, 1966.

PAPAHAADJOPOULOS, D. Stealth liposomes: from steric stabilization to targeting. In: LASIC, D.; MARTIN, F. **Stealth Liposomes**. Boca Raton: CRC Press. 1995. p. 1-6.

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

PEYMAN, G.A.; SCHULMAN, J.A.; KHOUBEHI, B. Toxicity and clearance of a combination of liposome-encapsulated ganciclovir and trifluridine. **J Retin Vitro Dis.** v. 9, p. 232-236, 1989.

PEYMAN, G.A.; GANIBAN, G.J. Delivery systems for intraocular routes. **Adv Drug Delivery Rev.** v. 16, p. 107-123, 1995.

PICK, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. **Arch Biochem Biophys.** v. 212, p. 186-194, 1981.

PLEYER, U.; ELKINS, B.; RUCKERT, D.; LUTZ, S.; GRAMMER, J.; CHOU, J.; SCHIMIDT, K.H.; MONDINO, B.J. Ocular absorption of cyclosporin A from liposomes incorporated into collagen shields. **Curr Eye Res.** v. 13, p. 177-181, 1994.

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

SAETTONE, M.F.; GIANNACCINI, B.; DELMONTE, G.; CAMPIGLI, V.; TOTA, G.; MARCA, F. Solubilization of tropicamide by poloxamers physicochemical data and activity data in rabbits and humans. **Int J Pharm.** v. 43, p. 67-76, 1988.

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.

SANDERSON, N.M.; JONES, M.N. Encapsulation of vancomycin and gentamicin within cationic liposomes for inhibition of growth of *Staphylococcus epidermidis*. **J Drug Target.** v. 4, p. 181-189, 1996.

SCHAEFFER, H.E.; KROHN, D.L. Liposomes in topical drug delivery. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 22, p. 220-227, 1982.

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.

SHEK, P.N.; BARBER, R.F. Liposomes are an effective carrier for the ocular delivery of prophylactics. **Biochim Biophys Acta**. v. 902, p. 229-236, 1987.

SHINOHARA, K.; TANAKA, M.; SAKUMA, T.; KOBAYASHI, Y. Efficacy of daunorubicin encapsulated in liposome for the treatment of proliferative vitreoretinopathy. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging**. v. 34, p. 299-305, 2003.

SINGH, K.; MEZEI, M. Liposomal ophthalmic drug delivery system. I. Triancinolone acetamide. **Int J Pharm**. v.16, p. 339-344, 1983.

SMITH, M.A.; SORENSON, J.A.; SMITH, C.; MILLER, M.; BORENSTEIN, M. Effects of intravitreal vancomycin in experimental methicillin-resistant *S. epidermidis* endophthalmitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 35, p. 1298-1302, 1991.

SMOLIN, G.; OKUMOTO, M.; FEILER, S.; CONDON, D. Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis. **Am J Ophthalmol**. v. 91, p. 220-225, 1981.

SON, Y.J.; JANG, J.S.; CHO, Y.W.; CHUNG, H.; PARK, R.W.; KNOW, I.C.; KIM, I.S.; PARK, J.Y.; SEO, S.B.; PARK, C.R.; JEONG, S.Y. Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. **J Control Release**. v. 91, p. 135-145, 2003.

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.

STRATFORD, R.E.; YANG, D.C.; REDELL, M.A.; LEE, V.H.L. Effects of topically applied liposomes on disposition of epinephrine and inulin in the albino rabbit eye. **Int J Pharm**. v. 13, p. 263-272, 1983.

SZOKA, F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposome with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Biochemistry**. v. 75, p. 4194-4198, 1978.

TALSMA, H.; CROMMELIN, D.J.A. Liposomes as drug delivery systems, part. I: Preparation. **Pharm Technol.** v. 16, p. 96-106, 1992.

TARAPRASAD DAS, M.D.; SAVITRI SHARMA, M.D.; MURALIDHAR, V.A. Effect of vancomycin on *Staphylococcus epidermidis* adherence to ploy (methyl methacrylate) intraocular lenses. **J Cataract Refract Surg.** v. 28, p. 703-708, 2002.

TAYLOR, R.L.; WILLIAMS, P.M.; CRAVEN, P.C.; GRAYBILE, J.R.; DRUTZ, D.J. MAGEE, W.E. Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. **Am Rev Resp Dis.** v. 125, p. 610-611, 1982.

THE MERCK INDEX. 13th ed. Rahway: Merck, 2001. 10248 p.

THE UNITED States Pharmacopeia. 23th ed. United States: Rockville, 1995. 2391 p.

THE UNITED States Pharmacopeia. 25th ed. United States: Rockville, 2002. 2675 p.

TREMBLAY, C.; BARZA, M.; SZOKA, F.; LAHAV, M.; BAUM, J. Reduced toxicity of liposome-associated amphotericin B injected intravitreally in rabbits. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 26, p. 711-718, 1985.

VAN WINDEN, E.C.C.; ZUIDAM, N.J.; CROMMELIN, D.J.A. Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use. In: _____. **Medical applications of liposomes.** Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 567-604.

VANRELL, R.H.; REFOJO, M.F. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. **Adv Drug Delivery Rev.** v. 52, p. 5-16, 2001.

VEMURI, S.; YU, C.; DE GROOT, J.; WANGSATORNTANAKUN, V.; VENKATRAM, S. Effect of sugars on freeze-thaw and lyophilization of liposomes. **Drug Develop Ind Pharm.** v. 17, p. 327-348, 1991.

VEMURIS, 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.

VIDAL, M. Methodes de caracterization des liposomes. In: DELATRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPPOT, J.R.; SCHUBER, F. (Eds). **Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques.** Paris: INSERM, 1993. p. 69-86.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solutions. **Colloid Poly Sci.** v. 268, p. 101-117, 1990.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. The aggregation behavior of Phase diagrams and aggregation behavior of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene)-poly (oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. **Macromolecules.** v. 27, p. 4145-4159, 1994.

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 Cont Release.** v. 83, p. 65-74, 2002.

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

WISE, K.I. Modern management of severe staphylococcal disease. **Medicine.** v. 52, p. 295-304, 1973.

WOODLE, M.C.; NEWMAN, M.S.; MARTIN, F.J. Liposome leakage and blood circulation: comparison of adsorbed block copolymers with covalent attachment of PEG. **Int J Pharm.** v. 88, p. 327-334, 1992.

ZANINI, A.C.; BASILE, A. C.; FOLLADOR, W.; OGA, S. **Uso Racional de Medicamentos.** Guia de Medicamentos. 2. ed. São Roque, 1997. 1179 p.

ZHENG, H.C.; YAO, K. Action of miosis of 1% pilocarpine liposome in rabbits. **Acta Acad Med Sin.** v. 25, p. 343-345, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)