

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
UNIVERSIDADE REGIONAL COMUNITÁRIA DE CHAPECÓ
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

RONEY CARLOS LORA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA VANCOMICINA INTRA-
VÍTREA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA**

São José dos Campos, SP

2008

Roney Carlos Lora

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA VANCOMICINA INTRA-
VÍTREA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, dentro do curso de Mestrado Interinstitucional Univap / Unochapecó.

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.
Co-orientadora: Profa. Dra. Stella R. Zamuner

São José dos Campos, SP

2008

L862i

Lora, Roney Carlos

Identificação e quantificação da vancomicina Intra-vítrea com Espectroscopia Raman.
/ Roney Carlos Lora. Orientadores: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.; Profa. Dra. Stella R.
Zamuner. -- São José dos Campos, 2008.

1 disco laser: Color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, Minter
Univap / Unochapecó. 2008.

1. Raman, espectroscopia 2. Vancomicina 3. Endoftalmite 4. Vítreo 5. Oftalmologia I.
Silveira Junior, Landulfoi, Orient. II. Zamuner, Stella Regina, Orient. III. Título

CDU: 617.7

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial ou
total desta tese, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que
citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data: 08/12/2008

RONEY CARLOS LORA

**“IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA VANCOMICINA INTRA-VÍTREA ATRAVÉS
DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof^a. Dra. **STELLA REGINA ZAMUNER** (UNIVAP)

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP)

Prof^a Dr. **ASTOR GRUMANN JUNIOR** (UNISUL)



Prof^a. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 08 de dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Minha família sempre esteve presente em minha vida, apoiando, confiando e perseverando.

Dedico este trabalho ao meu amado filho Enzo Rafael e à minha amada esposa Deise Helena, responsáveis pelo amor, segurança e tranquilidade, necessários para aprimorar meus estudos.

A todos os meus educadores, a quem devo o amadurecimento científico e a certeza de que desafios existem para serem enfrentados.

AGRADECIMENTOS

A elaboração e a conclusão deste trabalho foi uma soma de vários personagens e instituições; A Univap e a Unochapecó forneceram o ambiente e instigação necessários ao crescimento científico.

Em especial, o agradecimento é ao meu Professor orientador Dr. Landulfo Silveira Jr. que soube aproximar a Medicina e a Engenharia, não medindo esforços para tornar complementares nossos raciocínios.

À professora Stella Regina Zamuner que sempre se mostrou solícita no fornecimento de materiais, bem como na orientação à elaboração do trabalho.

A minha esposa Deise Helena, que muito contribuiu para a melhoria do texto deste trabalho, argumentando, criticando e sugerindo.

Aos colegas de mestrado que, como eu, conseguiram concluir mais esta etapa e, a cada encontro, se mostravam mais e mais perseverantes.

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA VANCOMICINA INTRA-VÍTREA COM ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA

RESUMO

Objetivo: Este trabalho objetiva avaliar a técnica de espectroscopia Raman dispersiva utilizando radiação laser no infravermelho próximo (830nm) como uma ferramenta de identificação e quantificação da molécula de vancomicina intra-vítrea, utilizando a ferramenta estatística PLS. Métodos: Foram obtidas diluições de vancomicina em água com valores de 0 a 50 mg/mL. Estas diluições foram submetidas à espectroscopia Raman dispersiva no infravermelho próximo usando como fonte de excitação um laser de diodo de 830 nm e potência de saída de 80 mW. Com estas diluições em água foi desenvolvida uma curva de calibração, utilizando a técnica multivariada PLS (*Partial Least Squares*). A seguir, foram realizadas injeções de vancomicina em vítreo de coelhos. Foram utilizados coelhos distribuídos em grupos: G1, G2, G3, com 4 animais cada. Após injeção de 05 mg de vancomicina intra-vítrea de forma segmentada por grupo: G3 8 h, G2 24 h, G1 48 h, foi realizada coleta do vítreo de cada uma dos animais, por grupo, e do conteúdo correspondente. Resultados e Discussão: A curva de calibração da vancomicina em água, desenvolvida através do PLS, apresentou erro de calibração de 1,83 mg/mL. A vancomicina injetada no vítreo pode ser identificada através da regressão PLS, sendo demonstrado que as concentrações variaram dependendo do tempo de injeção, apesar do alto desvio padrão. O experimento não demonstrou satisfatoriamente que a espectroscopia Raman dispersiva é um instrumento apto para identificar a molécula da vancomicina dissolvida no corpo vítreo. Contudo os resultados relativos à quantificação da droga foram imprecisos. Para efeitos de melhora no emprego do método, sugere-se a utilização de fonte excitadora com comprimento de onda curto, em casos de meios transparentes e comprimentos maiores em meios opacos. Conclusão: O método Raman é capaz de identificar a presença da molécula de vancomicina no interior vítreo, porém carece de precisão na quantificação da droga.

Palavras-chave: 1.Raman 2.Vancomicina 3.Vítreo

INTRA-VITREOUS VANCOMICYN IDENTIFICATION USING RAMAN DISPERSIVE SPECTROSCOPY

ABSTRACT

Background: This work aims the evaluation of dispersive Raman spectroscopy using infrared laser excitation as a tool to identify and to quantify the vancomycin antibiotic injected intra vitreous, using the PLS statistical tool. **Methods:** Eyes of New Zealand rabbits were injected with 5,0mg vancomycin at different time injection groups (8 h, 24 h and 48 h) and the vitreous were submitted to Raman spectroscopy. The dispersive Raman equipment used a infrared laser (830nm and 80 mW), imaging spectrograph and liquid-nitrogen, deep-depletion CCD camera, with time exposure of 50s. Vitreous samples were placed in quartz cuvette for Raman collection. It was developed a calibration curve using de PLS method with vancomycin diluted in water, in the range of 5,0 to 40 mg/mL. **Result:** The PLS calibration model had a standard error of calibration of 1,8mg/mL. The Raman spectrum of lyophilized vancomycin presents bands in the position of C=C, amide I, CH₃, amide III and vibrations of the carbon chain (C-C, ring breathing and C-O-C). The Raman spectra of injected vitreous showed very weak bands which could be correlated to the pure drug. The PLS showed change in the predicted mean concentration of the injected vitreous, with amount near zero for the water injected group and between 2 and 3 mg/mL for the drug injected group. **Conclusion:** The amount of the drug in the vitreous body could be estimated in the range of 2 to 3 mg/mL, with a error of 1,8mg/mL.

Key words: 1. Raman 2. Vancomycin 3. Vitreous

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Espécime de olho humano coletado no Banco de Olhos de New England Eye Center, Boston, USA.....	14
Figura 2: Desenho esquemático do globo ocular demonstrando a compartimentalização do mesmo.....	15
Figura 3: Esquema de procedimento cirúrgico para coleta de amostras de vítreo.....	18
Figura 4 Estrutura molecular da vancomicina (Fonte: www.sigmaaldrich.com)	25
Figura 5: Espectro Raman da molécula de vancomicina	26
Figura 6: Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo utilizado no experimento. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução espectral: 8 cm^{-1}	35
Figura 7: Espectro Raman da vancomicina liofilizada, obtido com medicamento colocado na cubeta de quartzo. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm^{-1}	37
Figura 8: Espectro Raman do vítreo de coelho em cubeta de quartzo. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm^{-1}	38
Figura 9: Espectro Raman da água em cubeta de quartzo. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm^{-1}	38
Figura 10: Espectros Raman da vancomicina diluídas em água destilada, em concentrações conhecidas (mg/mL), com o espectro da água subtraído. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm^{-1}	40
Figura 11: Curva com a comparação entre a concentração real da diluição da vancomicina (abscissa) versus a concentração prevista pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman (ordenada) em solução aquosa, com o número de variáveis latentes igual a 1.....	41
Figura 12: Plotagem das duas primeiras variáveis latentes obtidas pelo modelo PLS aplicado aos espectros de vancomicina diluídas em água.	42
Figura 13: Plotagem dos espectros Raman médios do vítreo das amostras após a injeção de água e vancomicina em 8 h, 24 h, 48 h e média do grupo água.....	44
Figura 14: Gráfico de barras com o valor médio da concentração indicado pelo PLS em cada grupo separadamente.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Características físico-químicas da vancomicina fornecida pela empresa fabricante do antibiótico.	24
Tabela 2: Esquema das aplicações de vancomicina no vítreo e coleta das amostras. ...	33
Tabela 3: Resultados da aplicação do modelo PLS dos espectros de vancomicina em solução aquosa nos espectros Raman da vancomicina injetada no olho dos coelhos, com subtração do espectro da água.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O Olho: Entendimentos e Desafios.....	12
1.2 Estrutura do olho.....	14
1.3 Técnicas e Equipamentos Auxiliares na Oftalmologia.....	18
1.4 Laser na Oftalmologia.....	19
1.5 Endoftalmite.....	20
1.6 Limitações Clínicas no Tratamento da Endoftalmite.....	23
1.7 Vancomicina	23
1.8 Espectroscopia Raman	25
1.9 Espectroscopia Raman e Olho	27
1.10 PLS (Partial Least Square) - Método de Avaliação de Concentrações.....	29
2 OBJETIVO	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais Utilizados.....	32
3.2 Protocolo Experimental	32
3.3 Instrumentação Raman Utilizada.....	34
3.4 Obtenção da Curva de Calibração da Vancomicina	35
4 RESULTADOS	37
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO A: CEP	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Olho: Entendimentos e Desafios

Dentre as especialidades médicas, a Oftalmologia é uma das que mais necessita de exames não invasivos para diagnósticos e terapias que não abalem o delicado funcionamento das estruturas oculares, considerando-se, em especial, o extremo refinamento da função realizada pelo órgão¹.

A função da visão é uma das mais importantes para o ser humano, pois a interação com o meio ambiente acontece, na sua maior parte, através dela. E para que este sentido tão importante funcione, é necessário uma perfeita combinação de efeitos físicos na superfície, bem como no interior do olho, como por exemplo, o efeito refracional da córnea e cristalino, juntamente com um efeito químico nos fotorreceptores da retina, células extremamente diferenciadas, onde há a transformação da energia luminosa em estímulo nervoso².

Qualquer mudança na curvatura da córnea ou alteração conformacional de suas estruturas, tais como cristalino, corpo vítreo, entre outras, podem acarretar uma perda da função visual³.

Dito isso, é possível concluir que a interferência e ou manipulação de qualquer uma das estruturas do globo ocular pode acarretar efeitos diversos, implicando na necessidade de se restaurar a condição óptica alterada artificialmente ou por conta de patologias oculares sob pena de sérios prejuízos à visão⁴.

Ocorre que na prática clínica atual, sempre que se necessita de uma avaliação citológica ou histológica do interior do globo ocular, normalmente para efeitos diagnósticos, precisa-se de uma intervenção cirúrgica. Estas intervenções em geral são agressivas e não são conseguidas com simples punções como se procede em coletas venosas, o que seria menos traumatizante. A particularidade do globo ocular é que este é preenchido, na sua maior parte, por um gel denominado vítreo, que consiste de frágeis e delicados filamentos de colágeno do tipo II envolvidos por água⁵.

Mais precisamente, a composição do gel vítreo, que ocupa aproximadamente 80% do volume do olho, é de 99% de água, o restante se distribui entre colágeno, ácido

hialurônico e células⁵. Com característica gelatinosa, não é plausível a remoção do vítreo com simples aspiração, a menos que a agulha utilizada seja de grande calibre, o que provoca significativo dano ao globo quando de sua introdução⁶.

Em conseqüência, há uma busca incessante de técnicas e aparelhos aptos a auxiliar no diagnóstico de afecções extras e intra-oculares, estas, como dito, as de maior desafio para os profissionais da área, considerando-se principalmente as dificuldades técnicas já citadas⁶.

Assim, a prática clínica oftalmológica confronta frequentemente o profissional com a decisão de realizar um procedimento invasivo e agressivo apenas para diagnóstico. A dicotomia está em optar por um tratamento baseado apenas em indícios clínicos, o que implica na incerteza de um tratamento correto, ou a escolha por um procedimento mais conclusivo, mas por vezes danoso para as estruturas oculares, além de difusor da própria patologia.

Como dito, a função ocular humana só é conseguida com a combinação perfeita e precisa do efeito físico com as refrações na superfície ocular e no interior do globo⁷,⁸; complementando-se com a reação químico-elétrica, que é desencadeada na superfície retiniana. O resultado é a estimulação dos fotorreceptores de modo a excitar as fibras nervosas sensitivas à produção do sinal visual no sistema nervoso central⁹.

O fato é que a combinação físico-química do olho humano pode proporcionar, além da visão, uma perfeita avaliação de seu interior através dos meios ópticos, ou seja, com o uso da luz visível. Dito de outra forma, mediante meios normalmente transparentes, a estrutura ocular fornece as condições ideais para a visualização de seu interior através de aparelhos ópticos^{10, 11}.

Embora a luz visível é muito utilizada no diagnóstico oftalmológico, a técnica pode e deve ser aprimorada, pois existem ainda inúmeras situações, como turvação vítrea ou catarata, em que as condições físico-patológicas impossibilitam a utilização da luz como meio de avaliação ocular, sendo então necessário a utilização dos procedimentos intervencionistas acima referidos.

Na Figura 1 pode-se evidenciar a alta transparência do corpo vítreo, bem como sua consistência gelatinosa após ser removida a camada fibrosa da esclera junto com a coróide e retina.

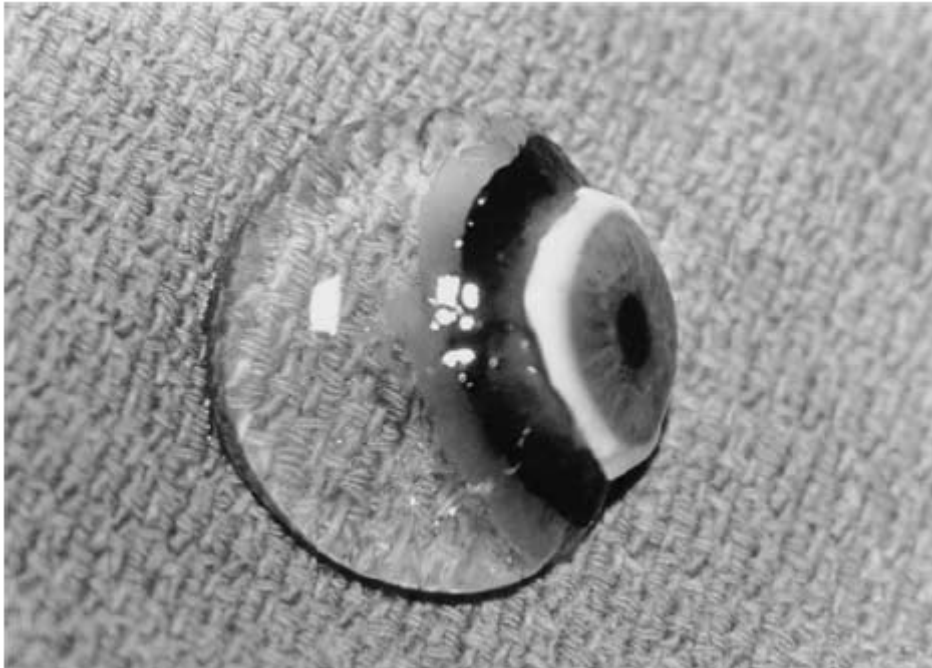


Figura 1: Espécime de olho humano coletado no Banco de Olhos de New England Eye Center, Boston, USA.

Dito isto, é possível concluir que a sensibilidade do olho humano requer o desenvolvimento de alternativas diagnósticas e terapêuticas menos invasivas a exemplo dos lasers; o que é objeto de trabalho da presente pesquisa.

1.2 Estrutura do olho

O olho humano pode ser caracterizado como um esfera hermeticamente fechada envolvida pela esclera e pela córnea, com tecidos internos como coróide, corpo ciliar e íris, aderidos a esta parede fibrosa. Mais internamente, na câmara vítrea, o olho humano é revestido pela retina que formará, na confluência de suas fibras, o nervo óptico, responsável pela condução do estímulo visual até o sistema nervoso central. Neste contexto, a visão é formada pela focalização dos estímulos luminosos na superfície retiniana.

Para entender um pouco mais sobre a estrutura ocular é importante conhecer a anatomia do globo ocular (Figura 2).

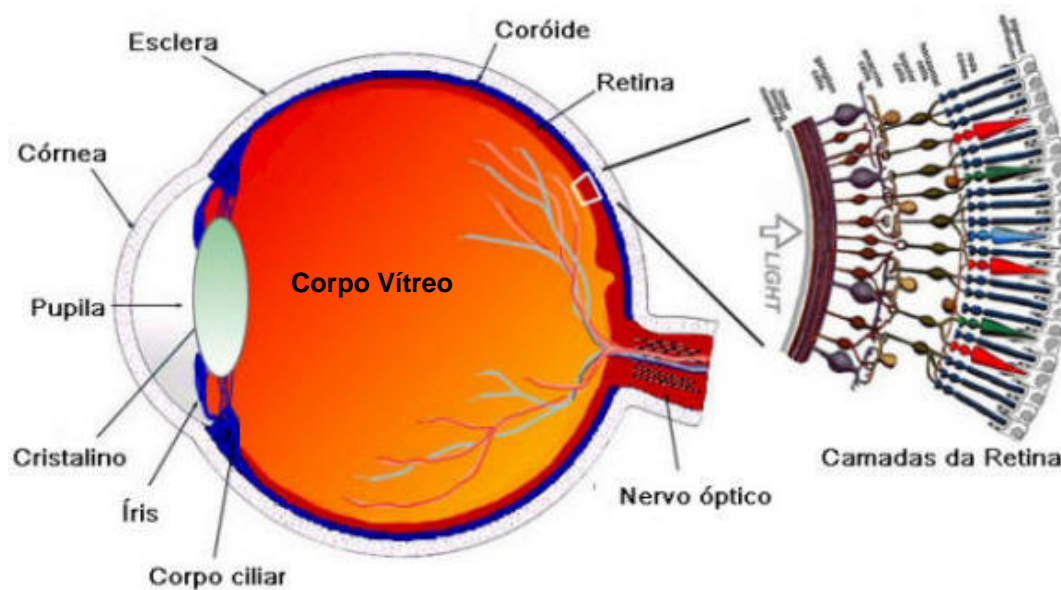


Figura 2: Desenho esquemático do globo ocular demonstrando a compartimentalização do mesmo.
 Fonte: <http://www.eyeatlas.com.br>

Na Figura 2 pode-se evidenciar, em termos anatômicos, a grande proporção do volume do corpo vítreo que ocupa todo o segmento posterior do olho, sendo envolvido pela retina em grande parte de sua extensão.

O vítreo humano e dos animais apresentam características muito semelhantes, sendo composto quase que exclusivamente por água (99%)^{12, 13} e mínimo conteúdo protéico. Isto resulta em ótima transparência do meio, quando em condições normais, sendo possível a análise espectral de substâncias associadas.

Tanto em termos diagnósticos como terapêuticos, o conhecimento da histologia ocular é importante, já que é neste nível que a barreira hemato-ocular se localiza. Tal estrutura é formada pela parede dos vasos intra-oculares e é responsável pela troca de substâncias de maneira extremamente seletiva entre a corrente sanguínea e os tecidos oculares. Esta barreira envolve totalmente o vítreo e é a responsável por bloquear, por exemplo, o acesso da grande maioria dos medicamentos no interior do globo e desta forma impedir que atinjam uma concentração terapêutica mínima.

Toda a nutrição dos tecidos oculares, como quase a totalidade dos demais tecidos do organismo, se dá pela circulação sanguínea, com difusão dos nutrientes tissulares de maneira extremamente seletiva para o interior dos tecidos. Porém, existe uma particularidade no interior do globo ocular: no corpo vítreo não há presença de vasos sanguíneos e, por essa razão, é grande a dificuldade para receber nutrientes e

antibióticos¹². Assim, a nutrição e oxigenação do corpo vítreo se dão por difusão a partir dos vasos da retina e corpo ciliar.

O problema é que como as células de defesa do nosso organismo têm acesso aos tecidos através da circulação sanguínea, é difícil para o sistema imunológico a abordagem das infecções no interior do vítreo.

Em outras palavras, sendo o vítreo um local isolado do sistema imunológico por não estar exposto à circulação sanguínea e morfologicamente se tratar de uma esfera gelatinosa, com nutrientes a disposição e mínimas trocas de substâncias durante a vida, qualquer bactéria que tenha a oportunidade de ali se alojar encontrará um ótimo meio de cultura.

É verdade que a barreira hemato-ocular também limita o acesso de bactérias, sendo raro o registro de infecções difundidas pela circulação sanguínea; nas poucas hipóteses registradas, o processo é chamado de endoftalmite endógena.

Com o difícil acesso das bactérias através da corrente sanguínea para o interior do olho, a maneira mais comum para o agente infeccioso adentrar é através de ferida cirúrgica ou traumática. A partir do que o agente patogênico desenvolve suas colônias e a infecção, que pode acometer apenas o segmento anterior do olho, menos grave, mas normalmente atinge também a câmara vítrea^{14, 15}.

Todo este contexto revela que mesmo sendo difícil o alojamento de microorganismos no interior do olho, na hipótese de isto acontecer o quadro torna-se gravíssimo pois, como já referido, o excelente meio de cultura e a dificuldade terapêutica com acesso ao olho, favorecem a patologia e dificultam o tratamento.

A grande maioria dos estudos realizados com diversos antibióticos, visando avaliar sua penetração no interior do globo ocular^{15, 16, 17}, alguns deles inclusive usando técnicas espectroscópicas como Raman^{18, 19}, demonstraram que a metodologia mais eficaz para se obter concentrações intra-vítreas (onde a dificuldade de controle da infecção é maior), é a aplicação do medicamento através de uma injeção direta no interior da cavidade fazendo com que este se dissolva no meio gelatinoso e então promova a eliminação dos agentes infecciosos.

A partir da injeção intra-ocular é possível acompanhar a evolução da doença apenas com avaliações clínicas, ou seja, sinais e sintomas que o paciente apresenta no decorrer dos dias. A padronização para o caso do antibiótico vancomicina é que se reaplique outra dose após 48 h, caso o exame clínico demonstre a necessidade²⁰. Porém

não é possível saber com exatidão que concentração será apresentada após reaplicações, pois é difícil avaliar o conteúdo residual da medicação devido ao metabolismo ocular ser algo dinâmico, passível de interações com o próprio processo inflamatório.

A indicação clínica de reaplicação de medicações é por si um desafio grande para o profissional responsável, pois o exame clínico realizado é bastante subjetivo, ou seja, a simples visualização do olho do paciente fundamentará a decisão acerca da necessidade de novas doses de medicamento. Porém, como já confirmado em experimentos, há uma esterilização do vítreo (livre de agentes patogênicos) após a primeira injeção de vancomicina, confirmado com cultura de 48 h. O problema é que a droga ainda é encontrada no interior do globo após 72 h^{21,22}.

Assim como os procedimentos invasivos mais agressivos, verificou-se que a excessiva concentração de medicação intra-ocular também é fator agravante do quadro clínico e conseqüentemente piora do resultado visual final^{23, 24}. Em decorrência, o desenvolvimento de um método de exame que pudesse informar a presença ou não da medicação intra-ocular e, se possível, avaliar a sua concentração, de maneira rápida e não invasiva, contribuiria para o tratamento da endoftalmite e minimizaria os danos provocados pela enfermidade, que inclusive, podem representar cegueira completa.

Até o presente momento, a única maneira disponível para avaliação das condições do interior vítreo pós-injeção é a coleta de amostra por cirurgia de vitrectomia via pars plana (Figura 3), em que o procedimento intervencionista busca coletar uma amostra do corpo vítreo e, a partir dela avaliar a presença de bactérias e a concentração de antibióticos. Importante que se ressalte que este procedimento envolve grande risco cirúrgico e alto custo financeiro bem como demora na obtenção dos resultados²³.

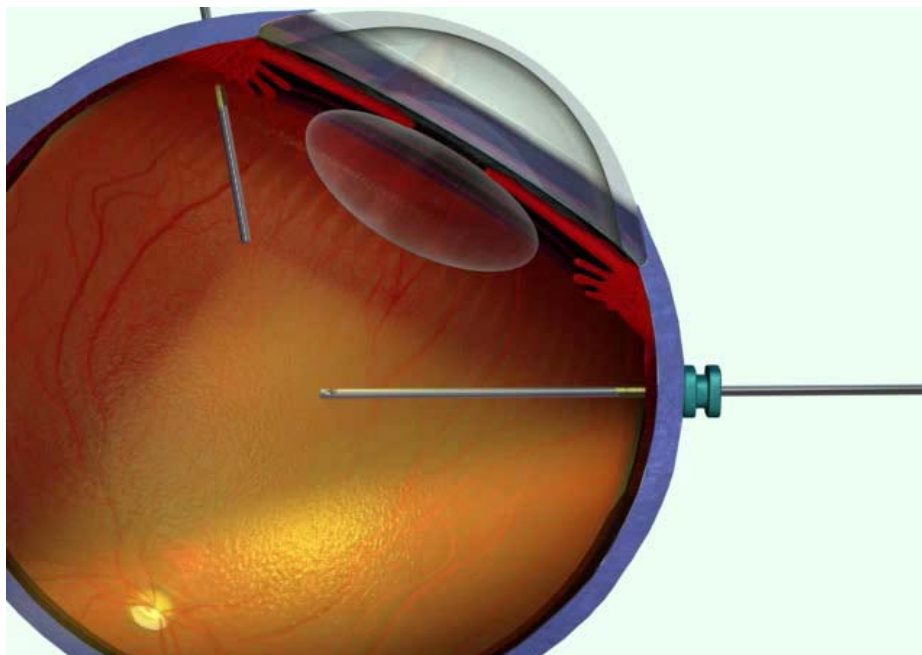


Figura 3: Esquema de procedimento cirúrgico para coleta de amostras de vítreo.

Fonte: <http://www.alconlabs.com>

Como alternativa, o método espectroscópico Raman vem se destacando pela possibilidade de se obter uma biópsia óptica, ou seja, não é necessário coleta de uma amostra do tecido para análise. Com a aplicação do laser de excitação, o espalhamento inelástico promovido pelas moléculas permite a avaliação necessária e o tecido não sofre dano significativo. Este método, que ainda não utilizado na prática oftalmológica, teria o potencial para realizar avaliações do interior do globo ocular¹⁹.

1.3 Técnicas e Equipamentos Auxiliares na Oftalmologia

Em alguns aspectos, há muito já se utiliza equipamentos para auxílio diagnóstico não invasivo, sendo que o primeiro e talvez mais importante, seja o uso da luz visível para o diagnóstico de erro refracional no olho humano (retinoscópio)⁷, coloquialmente referido como o “grau dos olhos”. Na seqüência, pode-se relacionar uma lista bastante significativa de técnicas que utilizam luz visível: a oftalmoscopia indireta e direta que permitem a avaliação da retina, nervo óptico, vasos retinianos e vítreo. No tocante a luz invisível, cita-se a utilização da Tomografia de Coerência

Óptica que fornece imagens do tecido retiniano com definições próximas a 10 μm , usando feixe de laser de comprimento 820 nm com potência de 200 μW ²⁵. Já o Ultrassom, que permite ultrapassar meios opacos e visualizar estruturas intra-oculares, mesmo sem a necessidade da visualização óptica, identifica as estruturas através da diferença do eco sonoro²⁶.

Talvez o laser seja a ferramenta mais promissora para o exame e tratamento de enfermidades oculares; isto se deve à característica da estrutura ocular que, através de seus meios transparentes, permite a penetração e absorção da luz seletivamente (item 1.1). A par disso, devido ao olho humano apresentar uma alta transmissão de luz, há também a possibilidade de captação reflexa destas ondas eletromagnéticas para interpretação de sua interação com os tecidos oculares, fenômeno de grande interesse para diagnóstico^{25, 27, 28, 29}.

Em termos de radiação eletromagnética, muitos estudos foram desenvolvidos a fim de avaliar a transmissão dos diferentes comprimentos de onda através das estruturas oculares, bem como o efeito tecidual destes, cada qual com sua contribuição científica. Desta forma, muitos equipamentos oftalmológicos se utilizam de diferentes ondas eletromagnéticas e diferentes efeitos para diagnóstico^{8, 30}. O Tomógrafo de Coerência Óptica, por exemplo, é o mais recente desenvolvimento da engenharia biomédica para avaliação das estruturas teciduais da retina e nervo óptico, como já referido, o mesmo utiliza laser para estudos micrométricos das estruturas intra-oculares²⁵.

1.4 Laser na Oftalmologia

A Oftalmologia foi uma das áreas da Medicina que mais precoce e mais intensamente se beneficiou com o surgimento dos aparelhos laser. Antes mesmo de seu surgimento, já se utilizava de fotocoagulação em tecidos oculares e, com a chegada dos lasers houve um avanço significativo nas técnicas³¹.

Desenvolvido em 1960 na Califórnia pelo físico Theodore Maiman, o primeiro laser utilizava como meio de gerador de radiação o rubi³². Logo após o surgimento do laser se iniciaram os primeiros estudos de seu uso em patologias até então sem resposta à qualquer tratamento, ou com respostas limitadas; dentre elas pode-se destacar a retinopatia diabética, que teve uma revolução no prognóstico visual após a instituição da terapia a laser para fotocoagulação. Esta doença continua até o momento sendo largamente beneficiada com as diversas opções de laser³³.

Em seguida à utilização do laser de rubi em fotocoagulações retinianas, a corrida para melhorar as técnicas e os equipamentos não cessou até os dias atuais, seja para efeitos terapêuticos como fotocoagulação da retina, ablação de tecidos neoplásicos^{8, 31}, quer seja para efeitos diagnósticos a exemplo da Tomografia de Coerência Óptica^{25, 34}, e uma série de exames diagnósticos complementares³⁵.

A contribuição do laser para a Oftalmologia talvez seja tão significativa como a descoberta dos antibióticos para a Clínica Geral. Como referido acima, têm-se inúmeros lasers para o tratamento e diagnóstico na prática oftalmológica atual, porém ainda existem semelhantes desafios que não permitem o abandono ou relaxamento na busca de novas técnicas e experimentos^{36, 37, 38, 39}.

1.5 Endoftalmite

Os itens 1.1 e 1.2 demonstraram que no interior do globo ocular normalmente não há presença de nenhum micro-organismo vivo, ou seja, ausência completa de bactérias, vírus ou fungos; sendo considerado um micro-ambiente asséptico contrastando com outras regiões do organismo humano onde o povoamento com microorganismos é comum (como na boca e pele). Porém, na superfície do globo ocular há presença de inúmeros microorganismos que povoam a conjuntiva, pálpebra e lágrimas; vivendo em harmonia com a estrutura ocular sem causar dano aos tecidos, a chamada flora local.

Quando há invasão de microorganismos no interior da cavidade ocular e estes proliferam de maneira a causar a infecção dos tecidos intra-oculares, caracteriza-se um quadro de endoftalmite⁴⁰. A endoftalmite pode ter sua causa associada a diversos motivos, porém o mais comum e de maior agressividade é o que se desenvolve pós-operatório^{15,21,41}. Ou seja, o paciente que foi submetido à um procedimento cirúrgico intra-ocular, como exemplo a facectomia para remoção da catarata, pode desenvolver, após o procedimento, um quadro doloroso associado a hiperemia ocular (olhos vermelhos por vasodilatação) e perda da visão de forma rápida. Na maioria dos casos, constata-se que a ferida cirúrgica permitiu a entrada dos agentes patogênicos e, neste momento, o que era para se tratar de um procedimento cirúrgico com intuito de melhorar a visão do paciente pode redundar na cegueira total e definitiva²¹.

Os casos de endoftalmite infecciosa por perfuração ocular acidental (trabalho ou lazer) também são comuns, porém menos freqüentes^{21, 42}. Mais raras são as endoftalmites endógenas, ou seja, as que o microorganismo causador se alojou espontaneamente no interior do olho e se proliferou de tal forma a desenvolver a infecção^{14,21,41}.

Como já citado, a endoftalmite é uma doença infecciosa que afeta o interior do globo ocular, sendo considerada uma das enfermidades de maior gravidade e que pressupõe tratamento em caráter de emergência^{21, 41}. O rápido diagnóstico é essencial, mas existe grande dificuldade clínica na identificação do agente causador da infecção. Sendo assim, há a necessidade de intervenção cirúrgica para coleta de amostra e realização da cultura para se ter certeza do diagnóstico etiológico^{41,42}, o que, por todos os motivos já referidos, é preferível evitar.

Em termos terapêuticos, estudos têm demonstrado que o tratamento com antibiótico é mais efetivo quando é feita injeção direta intra-ocular e esta é uma regra que rege a conduta em endoftalmite até os dias atuais^{41, 43, 44}.

Com a necessidade de aplicação intra-ocular direta, depara-se com mais uma dificuldade apresentada pelo olho, que é a avaliação da manutenção da concentração inibitória mínima para causar o efeito bactericida local^{16, 45, 46,47}. A complexidade do desafio é ainda maior quando considerado que o efeito do processo infeccioso intra-ocular causa uma alteração importante na permeabilidade dos tecidos intra-oculares, isto é, há uma variação do *clearance* (considerado o tempo médio que uma substância leva para ser eliminada de um tecido) das substâncias intra-oculares⁴⁶.

Já foi citado que há uma padronização do tempo de reaplicação das drogas intra-oculares, sendo considerado um período de 48 a 72 h para a maioria dos antibióticos de uso comum na via intra-vítrea^{21, 46, 47}. Porém é fato que este período carece de ajustes mais detalhados e precisos com relação à real concentração do antibiótico presente no interior do globo^{22, 48}. A precisão na comprovação da medicação no interior do olho é ainda mais importante quando se demonstra, por exemplo, que em concentrações excessivas, pode ocorrer toxicidade retiniana após injeção de antibiótico intra-ocular; causando efeito tão devastador quanto à própria infecção^{46, 47, 49}.

Também já foi referido que atualmente só há uma maneira de se pesquisar a presença de microorganismos ou a concentração de antibiótico no interior do globo: através da biópsia cirúrgica^{17, 43}, procedimento invasivo que, por si só, pode fragilizar ainda mais as estruturas já debilitadas^{17, 43, 44}.

Contribuindo na insegurança terapêutica há a associação de medicações necessárias para o tratamento, tais como antiinflamatórios, ou antibióticos de espectros diferenciados para um menor dano inflamatório e melhor cobertura antibiótica. Estas associações devem ser consideradas pois também implicam numa alteração no *clearance* das drogas intra-oculares bem como no aumento da toxicidade retiniana, devido ao efeito tóxico cumulativo em altas doses^{50, 51, 52, 53, 54}.

Assim, a grande tarefa no tratamento e diagnóstico da endoftalmite está na possibilidade de se analisar o interior do globo ocular sem necessidade de intervenção cirúrgica, bem como, na agilidade da demonstração dos resultados obtidos. Um grande estudo multicêntrico, iniciado em 1995, tentou padronizar o tratamento da endoftalmite aguda⁴¹. Este estudo, desenvolvido por um grupo denominado *Endophthalmitis Vitrectomy Study Group (EVSG)* prossegue até os dias atuais. Partindo dos resultados destas pesquisas há uma série de padronizações para o tratamento da doença, tais como: doses, escolha de droga, reaplicações, entre outros¹⁴.

1.6 Limitações Clínicas no Tratamento da Endoftalmite

É de se esperar que um tecido tão diferenciado como a retina sofra efeitos importantes com a concentração excessiva de antibióticos usualmente empregados no tratamento da endoftalmite, como já demonstrado em estudos⁴⁹. Somam-se a isso os efeitos de depósito dos carreadores ou solventes destes medicamentos que ainda não foram completamente estudados.

Os principais antibióticos usados na injeção intra-vítrea para tratamento de endoftalmites agudas são a vancomicina e a amicacina por propiciarem um bom espectro de ação sobre os principais agentes microbianos causadores²⁴. Outros como a ceftriaxona e a gentamicina também são utilizados, porém em menor escala devido ao seu espectro de ação ser mais limitado e os efeitos tóxicos serem mais frequentes²⁴.

Como os microorganismos infectantes nas endoftalmites geralmente ou são *gram* positivos (ocorrendo na grande maioria dos casos, entre 60 e 80%) ou *gram* negativos (que junto com anaeróbios e fungos completam a totalidade dos casos)⁴¹, é de consenso que a vancomicina seja uma droga de primeira escolha já que oferece uma boa cobertura bactericida sobre *gram* positivos e, quando associada à amicacina, que oferece boa cobertura para *gram* negativos, o resultado costuma ser satisfatório²⁴. Neste contexto, a vancomicina constitui a principal droga no manejo da endoftalmite aguda.

1.7 Vancomicina

Na Clínica Médica Geral, o uso da vancomicina se faz através da injeção intravenosa; para que a mesma se distribua sistemicamente no organismo do paciente e então chegue até o sítio infeccioso, alcançando uma concentração inibitória mínima no local da infecção. Porém, como já comentado, esta prática não é a melhor opção para o tratamento de endoftalmites infecciosas. Muitos estudos já demonstraram que a injeção

da vancomicina intravenosa não é capaz de produzir uma concentração inibitória mínima no interior do globo, justamente devido a presença da barreira hemato-ocular¹⁷.

A vancomicina (cloridrato de vancomicina) é comercializada sob a forma liofilizada (desidratada) que é reconstituída previamente a sua utilização. A particularidade da infusão intra-vítrea em relação à infusão endovenosa, é que naquela a diluição necessária é muito superior que na endovenosa, explicado pela deposição do antibiótico diretamente no interior do globo ocular infectado.

A dose normalmente utilizada no vítreo é de 1 mg dissolvido em um volume de 0,1 mL. Estes parâmetros se mostraram eficazes para o controle da infecção e de menor toxicidade para a retina⁴¹.

A molécula de vancomicina apresenta as seguintes especificações conforme fabricante Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com):

Tabela 1: Características físico-químicas da vancomicina fornecida pela empresa fabricante do antibiótico.

Característica	Valores
Nome do produto	Cloridrato de Vancomicina
Numero do produto (Sigma)	861987
Fórmula molecular	$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24} \cdot HCl \cdot xH_2O$
Peso Molecular	1485.71 (anhydrous basis)
Aparência	Pó branco para laranja claro
Análise elementar	50.7 à 56.0% Carbono, 8.0 à 8.9% Nitrogênio

A Figura 4 apresenta a estrutura molecular da vancomicina.

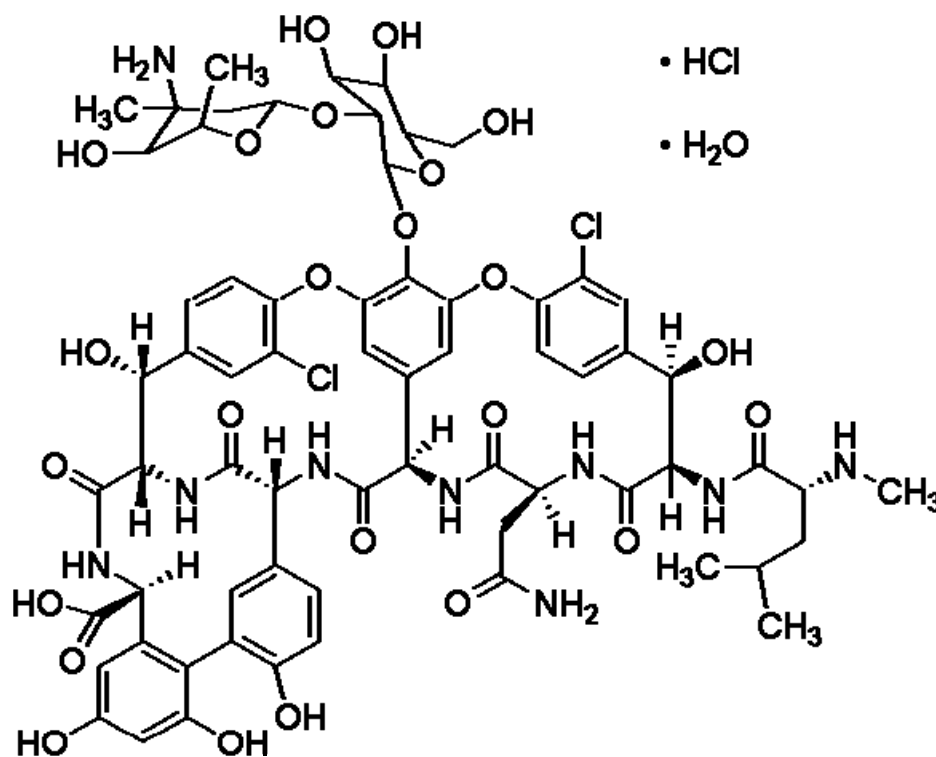


Figura 4 Estrutura molecular da vancomicina (Fonte: www.sigmaaldrich.com)

1.8 Espectroscopia Raman

Desde a descoberta do efeito Raman pelo físico indiano C. V. Raman em 1928, muitos estudos foram produzidos no intuito de verificar sua eficácia na avaliação de estruturas biológicas⁵⁵.

Detalhadamente, o efeito Raman é obtido pelo seguinte processo: 1) ondas eletromagnéticas (luz) são incididas sobre a molécula em estudo; 2) a energia irradiada é parte espalhada na mesma frequência das ondas incidentes (espalhamento elástico), o que é irrelevante; 3) parte da energia irradiada é absorvida pela molécula, elevando seus níveis de energia eletrônicos; 4) a elevação dos níveis de energia provoca um estado de excitação da molécula; 5) durante o regresso dessa molécula ao seu estado fundamental ocorre emissão de radiação (fluorescência); 6) a radiação emitida é espalhada em frequências maiores e/ou menores que a frequência de excitação

(espalhamento inelástico); 7) a perda ou ganho de energia da molécula pela troca de energia entre a luz irradiada e sua vibração origina o fóton Raman⁵⁵.

O efeito Raman teve um grande impulso com o advento do laser, pois com este, a irradiação da amostra é feita com um feixe de luz monocromática de alta potência e, recentemente, com o desenvolvimento de espectrógrafos de imagem e câmeras CCD, refrigeradas por nitrogênio líquido, a qualidade do sinal coletado em um único espectro foi melhorada e o tempo de coleta reduzido^{55, 56}. Em outras palavras, com a utilização de uma fonte de radiação monocromática como o laser, um espectrógrafo que faça a dispersão da luz e um detector que faça a conversão da luz em sinal elétrico, pode-se avaliar as vibrações das diversas moléculas dos materiais, identificando possíveis alterações nos tecidos, bem como variações patológicas⁵⁵.

Como um exemplo da especificidade do efeito Raman, a Figura 5 apresenta o espectro da molécula de vancomicina obtida da empresa Sigma-Aldrich na faixa espectral entre 600 e 1800 cm^{-1} . O espectro mostra bandas bem estreitas e resolvidas, indicando os grupos moleculares mais importantes, principalmente os relacionados às vibrações das ligações de carbono muito comuns em compostos orgânicos/biológicos.

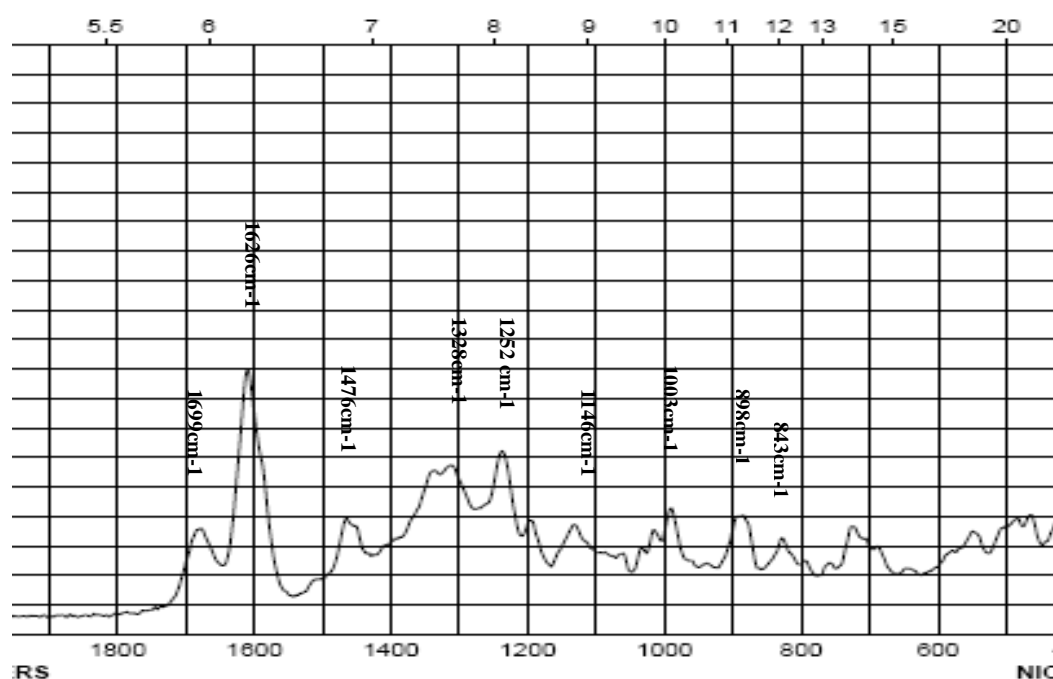


Figura 5: Espectro Raman da molécula de vancomicina
 Fonte: Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>

Assim, a Figura 5 demonstra que a identificação das vibrações dos componentes da vancomicina pelo espectrógrafo Raman, representa um retrato singular e detalhado de todos os elementos integrantes da droga. O mesmo pode ser efetuado com outras substâncias.

1.9 Espectroscopia Raman e Olho

As técnicas de diagnóstico na Medicina têm evoluído imensamente nos últimos anos, passando de uma fase empírica inicial a uma fase baseada em evidências, ou seja, a identificação específica da patologia através de exames diagnósticos.

A técnica Raman é uma das que se destaca na resposta à identificação de alterações moleculares nos tecidos, devido às características já citadas anteriormente, isto se evidencia na literatura, onde a técnica é usada largamente em pesquisas para solucionar problemas diagnósticos^{55, 56}.

Devido a excelente transparência dos tecidos internos do olho, com o uso do laser, há uma alta penetração da luz até os tecidos mais profundos, sem ocorrer grande perda de sua potência por espalhamento ou absorção. Com esta particularidade apresentada pelo olho, espera-se que seja possível estimular moléculas no interior do globo ocular e desta forma captar o espectro Raman destas moléculas^{18, 19, 30}.

Estudos com Raman para avaliar o conteúdo do olho já demonstraram a importância desta técnica como auxiliar no diagnóstico molecular de inúmeras condições, tais como, avaliação de: glicose intra-ocular⁵⁷, moléculas estruturais da retina^{58, 59, 60, 61, 62, 63}, alterações moleculares do cristalino^{64, 65}, alterações estruturais da córnea^{66, 67}, alterações do humor aquoso^{68, 69, 70}, próteses intra-oculares^{71, 72, 73}, presença de antimicrobianos intra-oculares^{74, 75, 76, 78}, e até mesmo do comportamento térmico dos tecidos intra-oculares⁷⁹.

Se for considerada a necessidade de se obter informações intra-oculares sem invasão do globo e a possibilidade da espectroscopia Raman de informar a composição molecular do interior do globo, cria-se uma correlação complementar entre as

necessidades que a clínica apresenta com as ofertas técnicas que o método Raman oferece.

O gel vítreo, por se tratar de um tecido biológico composto quase que exclusivamente por água, apresenta-se como um campo excelente para identificar qualquer variação na sua composição: quando na sua forma essencial o vítreo não apresenta efeito Raman significativo a exemplo da água, porém quando alterado pela presença de outras moléculas, estas podem ser facilmente identificadas⁵⁷.

Nos estudos citados acima ^{57, 58, 59, 60, 61, 62}, pode-se comprovar a eficácia da técnica Raman na identificação e quantificação de algumas moléculas e/ou alterações moleculares intra-oculares. Sendo o olho um dos órgãos mais trabalhados com laser, é conhecido também o efeito que cada comprimento de onda causa nas diversas estruturas tissulares³¹, bem como a intensidade necessária para que este efeito seja obtido. Portanto, a utilização de comprimento de onda de excitação adequado é seguro às estruturas transparentes do globo, bem como aos tecidos mais profundos e pigmentados do olho^{33,36}.

Neste contexto, o comprimento de onda do laser no infravermelho próximo (laser de diodo semiconductor, com comprimento de onda de 830nm, por exemplo) mostra-se indicado para excitação vibracional das moléculas, por se tratar de um comprimento de onda de fácil transmissão e que necessita de uma potência alta para causar danos nos tecidos intra-oculares capazes de absorvê-lo (exemplo: epitélio pigmentar da retina).

O comprimento de onda no infravermelho próximo também reduz o efeito de fluorescência nos tecidos biológicos, ao contrário dos comprimentos de onda menores (exemplo azul ou verde). A fluorescência é indesejada quando se mede o espalhamento Raman no visível, visto que o fóton Raman tem intensidade muito menor que o fóton fluorescente nos tecidos biológicos⁵⁵.

Outro fator em vantagem aos comprimentos de ondas maiores é a sua melhor penetração em meios mais opacos; ultrapassando, desta forma, possíveis opacidades de cristalino e vítreo e alcançando profundidades mais significativas no corpo vítreo.

Neste contexto, surge a necessidade de acrescentar à técnica Raman (apta a identificar e diferenciar moléculas), um elemento de mensuração, pois o diagnóstico da presença de determinada substância no olho deve, na prática clínica, estar

acompanhado da sua quantificação. O método PLS (*Partial Least Square*) pode então ser útil.

1.10 PLS (Partial Least Square) - Método de Avaliação de Concentrações

A Quimiometria é a análise de dados químicos de natureza multivariada, que surgiu devido à necessidade de se utilizar ferramentas para tratar e/ou obter informações dos equipamentos como os espectrógrafos, por exemplo, onde a intensidade da absorção, espalhamento ou emissão em diversos comprimentos de onda são registrados em apenas um espectro, de uma única vez. A Quimiometria emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar experimentos de forma otimizada e fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos⁸⁰.

Uma das ferramentas quimiométricas de extrema importância no campo da Química Analítica é o método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS - *Partial Least Squares*). Trata-se de um método eficiente para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades, além de ser suficientemente robusto para permitir que seus parâmetros não se alterem com a inclusão de novas amostras ao conjunto de dados. Outra vantagem do PLS é a possibilidade de realização de calibração mesmo na presença de interferentes, sejam estes conhecidos ou não⁸⁰.

Basicamente, o PLS usa a informação das concentrações na obtenção dos fatores ou variáveis latentes. Estas variáveis latentes são combinações lineares das componentes principais calculadas pela Análise dos Componentes Principais (PCA - *Principal Component Analysis*)⁸¹. As primeiras variáveis latentes descrevem a direção de máxima variância que também se correlacionam com a concentração. O processo de cálculo segue com a subtração desta variância do conjunto de dados e o cálculo da segunda variável latente é realizado no remanescente de dados. O processo segue até encontrar-se o número de variáveis latentes igual ao número de amostras.

A técnica PLS pode ser utilizada para calcular concentração em amostras com quantidades de soluto desconhecidas, desde que uma calibração tenha sido efetuada em

uma faixa de concentrações conhecidas de soluto. Com a técnica PLS não se requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes na ocasião da construção do modelo⁸².

O método PLS pode ser dividido em duas etapas básicas. A primeira consiste em montar as matrizes de dados X a partir dos dados espectrais (variáveis independentes) e Y a partir das propriedades de interesse (variáveis dependentes, as concentrações, por exemplo), a segunda etapa consiste em obter-se a relação entre as matrizes X e a matriz Y , que possui a propriedade de interesse⁸³.

Desta forma, o PLS mostra-se um método eficaz para medir concentrações de soluto em solução, sendo útil no auxílio diagnóstico das concentrações da vancomicina intra-vítrea obtidas pela espectroscopia Raman.

Inicialmente, cria-se um modelo aplicando-se o PLS em um conjunto de dados espectrais onde a concentração do soluto é conhecida e varia dentro de uma faixa. Depois, aplica-se um modelo inversamente, onde o dado espectral de uma amostra desconhecida é alimentada no modelo, e a concentração é obtida pela regressão multivariada.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo avaliar a técnica de espectroscopia Raman dispersiva utilizando radiação laser no infravermelho próximo (830nm) como uma ferramenta de: (a) identificação da molécula de vancomicina injetada em concentrações de 0,5 mg/mL intra-vítrea, em coelhos da raça Nova Zelândia, em diferentes tempos de injeção da droga (8h, 24h, 48h) e (b) quantificação da droga vancomicina injetada intra-vítrea, através da construção de um modelo de calibração utilizando a ferramenta estatística multivariada PLS, modelo este obtido a partir de espectros Raman de vancomicina diluída em água destilada em concentrações de 0 a 40 mg/mL e utilizado para calcular a concentração nas amostras de vítreo injetadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Utilizados

Foram utilizados 12 coelhos da raça Nova Zelândia, com peso aproximado de 800 g por animal, distribuídos em 3 grupos de 4 animais. A escolha do coelho deu-se pela semelhança estrutural e morfológica do globo ocular do animal em relação ao globo ocular humano e pela praticidade de acesso e manipulação.

Os animais não apresentavam nenhuma alteração ocular evidente e foram considerados com globos oculares íntegros e livres de infecção.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta instituição, sendo aprovado sem restrições sob o protocolo nº A086/CEP/2007.

3.2 Protocolo Experimental

Grupo 1 - G1 (48 h – dia 1): 4 animais foram anestesiados com Zoletil 50 (Cloridrato de Tiletamina 125 mg, Cloridrato de Zolazepan 125 mg) na quantidade diluída de 0,3 mL intra-muscular. Após a completa anestesia, observada pela ausência de reação a estímulos dolorosos, foi aplicada Vancomicina 5 mg em diluente de água destilada no volume de 0,05 mL em ambos os olhos de 3 coelhos, perfazendo um total de 6 olhos. O quarto animal foi destacado como controle, com a aplicação de água destilada nos dois olhos. Os animais foram mantidos alimentados e com água *ad libidum* por 48 h sem apresentarem alterações significativas de comportamento e/ou alteração clínica observável de seus olhos. Após 48 h, foram sacrificados e ambos os globos oculares retirados.

Grupo 2 - G2 (24 h - dia 2): 4 animais foram anestesiados com Zoletil 50 (Cloridrato de Tiletamina 125 mg, Cloridrato de Zolazepan 125 mg) na quantidade

diluída de 0,3 mL intra-muscular. Após a completa anestesia, observada pela ausência de reação a estímulos dolorosos, foi aplicada Vancomicina 5 mg em diluente de água destilada no volume de 0,05 mL em ambos os olhos de 3 coelhos, perfazendo um total de 6 olhos. O quarto animal foi destacado como controle, com a aplicação de água destilada nos dois olhos. Os animais foram mantidos alimentados e com água *ad libidum* por 24 h sem apresentarem alterações significativas de comportamento e/ou alteração clínica observável de seus olhos. Após 24 h, foram sacrificados e ambos os globos oculares retirados.

Grupo 3 - G3 (8 h - dia 3): 4 animais foram anestesiados com Zoletil 50 (Cloridrato de Tiletamina 125 mg, Cloridrato de Zolazepan 125 mg) na quantidade diluída de 0,3 mL intra-muscular. Após a completa anestesia, observada pela ausência de reação a estímulos dolorosos, foi aplicada Vancomicina 5 mg em diluente de água destilada no volume de 0,05 ml em ambos os olhos de 3 coelhos, perfazendo um total de 6 olhos. O quarto animal foi destacado como controle, com a aplicação de água destilada nos dois olhos. Os animais foram mantidos alimentados e com água *ad libidum* por 8 h sem apresentarem alterações significativas de comportamento e/ou alteração clínica observável de seus olhos. Após 8 h, foram sacrificados e ambos os globos oculares retirados.

Para o sacrifício dos animais foi aplicada anestesia geral, após infusão de Cloreto de potássio em overdoses conseguindo êxito em todos os animais. Comprovado o óbito dos animais, os globos oculares foram coletados através de micro-cirurgia, o conteúdo vítreo foi removido e separado das demais estruturas do olho, também através de micro-cirurgia.

Todas as amostras foram avaliadas no mesmo dia após a coleta do corpo vítreo dos animais sacrificados. O conteúdo vítreo de cada animal foi colocado em uma cubeta de quartzo e analisado pela espectroscopia Raman.

Tabela 2: Esquema das aplicações de vancomicina no vítreo e coleta das amostras.

	Dia 01 16h00	Dia 02 16h00	Dia 03 08h00	Dia 03 16h00
G 1	Injeção droga			Coleta amostra
G 2		Injeção droga		Coleta amostra
G 3			Injeção droga	Coleta amostra

3.3 Instrumentação Raman Utilizada

Para a obtenção dos espectros Raman foi utilizado um espectrômetro Raman dispersivo no infravermelho próximo (Figura 6). O espectrômetro possui um laser de diodo com comprimento de onda de 830 nm com potência de saída de 80 mW (Micro Laser Systems Inc., modelo L4830S) para a excitação da amostra. O laser foi direcionado para as amostras através de uma disposição de lentes e prismas.

A amostra vítrea foi dispensada no interior de uma cubeta de quartzo e esta colocada em um porta-amostras de alumínio adaptado a um posicionador com deslocamento micrométrico nos 3 eixos (x-y-z). Este porta amostras foi arranjado de forma a fazer um ângulo de 45° com relação ao feixe de luz incidente. A coleta de luz retro espalhada e da emissão foi feita por um sistema óptico composto de duas lentes L1 e L2 de $f=100\text{mm}$, também a 45° com relação ao porta amostras. A radiação laser foi bloqueada na entrada do espectrógrafo por meio de um filtro rejeita-banda do tipo *notch* (Kaiser Optical Systems. MI, USA, modela HNPF 3804) com comprimento de onda de rejeição em 830 nm.

O dispersor de luz é um espectrógrafo de imagem $f/4$ com grade de difração de 600 linhas/mm (Chromex, NM, USA, modelo 250IS). Este espectrógrafo é acoplado a uma câmera CCD (Princeton Instruments, NJ, USA, modelo LNCCD 1024x256) refrigerada por nitrogênio líquido e controlador da câmera (Princeton Instruments, NJ, USA, modelo ST130) para a detecção do sinal luminoso. Esta Câmera CCD é composta por 1024 elementos dispostos na horizontal, que é o sentido da dispersão da grade do espectrógrafo e 256 elementos dispostos na vertical, onde cada coluna representa um único comprimento de onda de dispersão. Como há a característica de igualdade de comprimento de ondas para todos os elementos de cada uma das colunas, agrupou-se estes elementos (*binning*). Com isto, cada coluna foi transformada em um único “super-elemento”, tendo um aumento na relação sinal-ruído (RSR) do espectro. O tamanho de cada elemento da CCD é de 25 μm , portanto, o tamanho total da área sensível da CCD é de 25,6 X 6,4mm. A câmera CCD possui um diafragma mecânico

na face frontal, que permite o controle do tempo de exposição do detector para melhor adequação da RSR dos espectros.

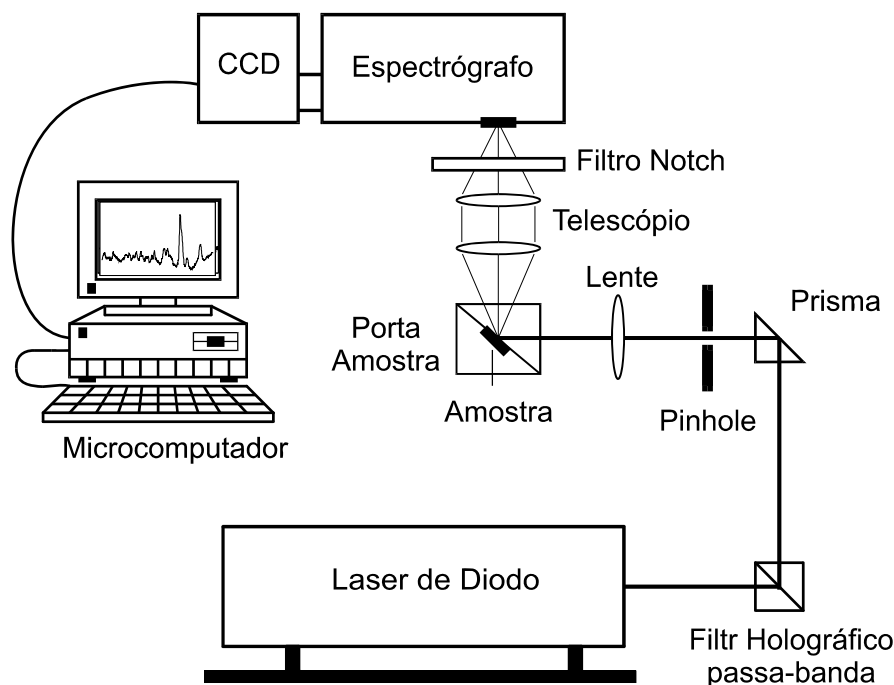


Figura 6: Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo utilizado no experimento. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução espectral: 8 cm^{-1} .

A aquisição e armazenamento dos espectros foram feitos por um microcomputador IBM-PC utilizando o *software* Winview (Princeton Instruments, NJ, USA), que controla o tempo de exposição do detector e o número de aquisições por amostra e armazena os espectros no formato ASCII. O tempo de exposição para a obtenção do espectro foi escolhido de maneira que não houvesse saturação do sinal pela câmera CCD e situou-se em 50s.

3.4 Obtenção da Curva de Calibração da Vancomicina

A fim de quantificar a concentração de vancomicina injetada intra-vítrea nas amostras extraídas dos globos oculares dos coelhos, foi obtida uma curva de calibração

utilizando vancomicina diluída em água destilada. Após a diluição, em concentrações de 0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, foram obtidos espectros Raman destas soluções acondicionadas na cubeta de quartzo. Com os espectros Raman obtidos destas amostras foi realizada a curva de calibração via PLS visando verificar a capacidade da técnica Raman em quantificar a concentração da Vancomicina nas soluções diluídas.

Com o valor da concentração conhecida da vancomicina em água e a intensidade do espectro Raman, foi desenvolvido o modelo de calibração multivariado utilizando o PLS, que será utilizado em última instância para o cálculo das concentrações reais do fármaco nas amostras de vítreo. No Matlab (versão 4.2), os espectros Raman e as concentrações de vancomicina foram considerados as variáveis independentes (ordenadas) e dependentes (abscissas) respectivamente, e através da função $[p,q,w,t,u,b,ssq] = pls(x,y,lv,l)$ onde: x são os espectros, y os valores de concentrações, lv o número de variáveis latentes determinado pelo usuário, construiu-se o modelo PLS, sendo que neste trabalho o número de lv foi variado entre 1 e 2, visto que há poucas variáveis latentes, principalmente o medicamento, a serem consideradas nos espectros. As saídas da função são p = carregamento das variáveis independentes x ; q = carregamento das variáveis dependentes y ; w = importância das variáveis independentes; t = escores das variáveis independentes x ; u = importância das variáveis dependentes y ; b = vetor coeficiente interno do PLS; $ssqdif$ = tabela de variâncias entre x e y obtida pelo modelo PLS.

Um procedimento de validação cruzada, utilizando os mesmos valores empregados na construção do modelo foi estabelecido com lv igual a 1 e 2, através da função $ypred = pls(pred)(x,b,p,q,w,lv)$. Gráficos foram plotados entre os valores das concentrações conhecidas e as previstas pelo modelo PLS ($ypred$), e com os resultados deste gráfico, foi calculado do erro padrão (EP) para lv igual a 1 e 2. O EP tem a função de avaliar o quanto o modelo PLS é capaz de prever concentrações a partir dos dados utilizados na construção do modelo, e também verificar se tais erros estão dentro dos padrões aceitáveis dados pela literatura e pela prática clínica.

A fim de verificar se as concentrações de vancomicina possuíam diferenças significativas entre os grupos de tempo de injeção, foi aplicado teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e caso as amostras possuísem distribuição normal, foi aplicado o teste ANOVA com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

A fim de verificar se o espectro Raman da vancomicina estava de acordo com o obtido da literatura (Sigma-Aldrich), e obter-se uma referência de espectro Raman dispersivo da substância pura utilizada na injeção no vítreo dos animais, uma amostra de vancomicina liofilizada foi submetida ao espectrógrafo, apresentando o seguinte espectro Raman (Figura 7):

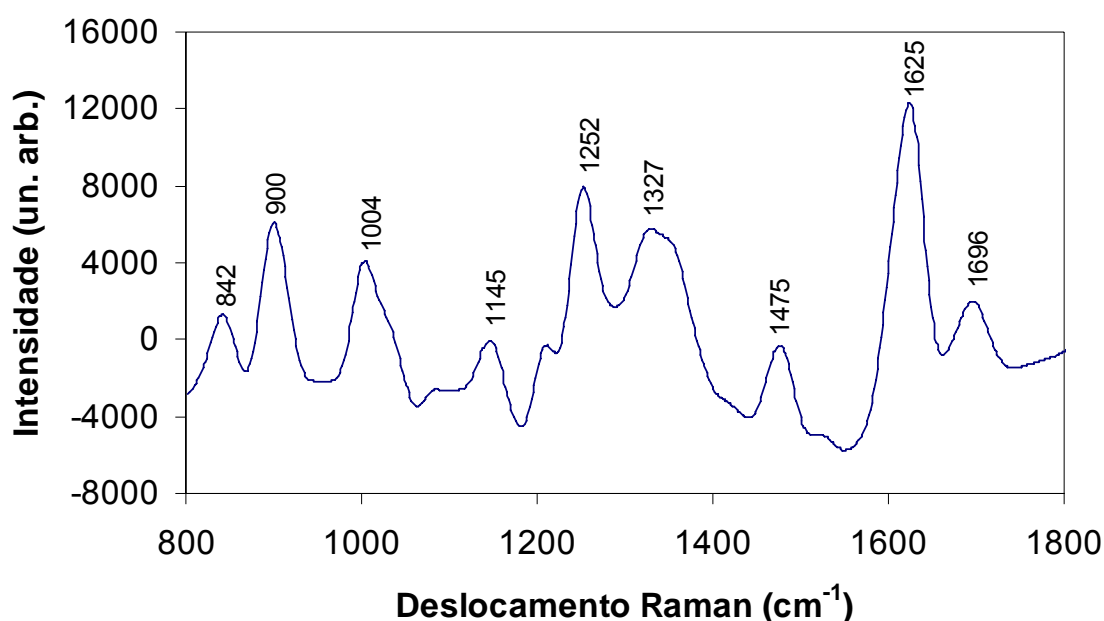


Figura 7: Espectro Raman da vancomicina liofilizada, obtido com medicamento colocado na cubeta de quartzo. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm⁻¹.

Considerando que para o experimento utilizou-se espectro Raman de diluições de vancomicina em água destilada, a Figura 9 demonstra que foi obtido espectro Raman de solução aquosa pura (0 mg/mL), para possibilitar a comparação entre o espectro Raman da água destilada e o vítreo de uma das amostras do olho do coelho livre de droga. Referida conduta foi procedida para permitir a análise dos meios (água destilada e vítreo), necessária à verificação da existência ou não de diferenças fundamentais que pudessem interferir nos resultados obtidos.

Para tanto, o espectro Raman do vítreo de uma das amostras do olho do coelho sem aplicação da vancomicina é apresentado na Figura 8. Pode-se observar a pequena quantidade de características espectrais, basicamente características espectrais da

cubeta de quartzo, com as bandas entre 800 e 1000 cm^{-1} e entre 1000 e 1200 cm^{-1} , visto que a composição do vítreo é basicamente de água.

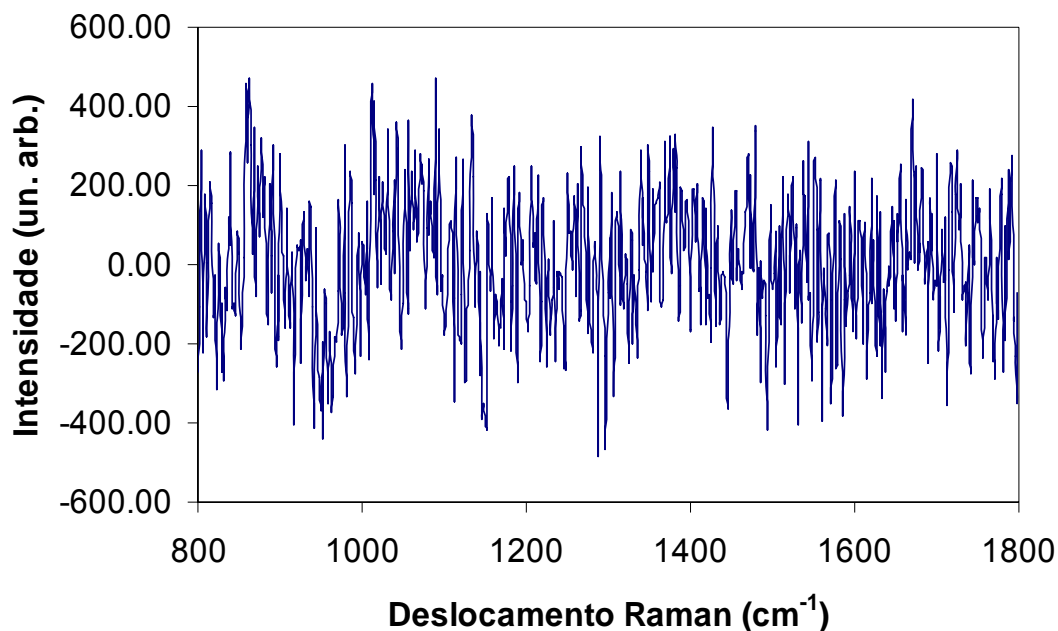


Figura 8: Espectro Raman do vítreo de coelho em cubeta de quartzo. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm^{-1} .

Como comparação, se plotou um gráfico ilustrando o espectro da água pura distinguindo-se do espectro do vítreo como pode-se evidenciar na Figura 9,

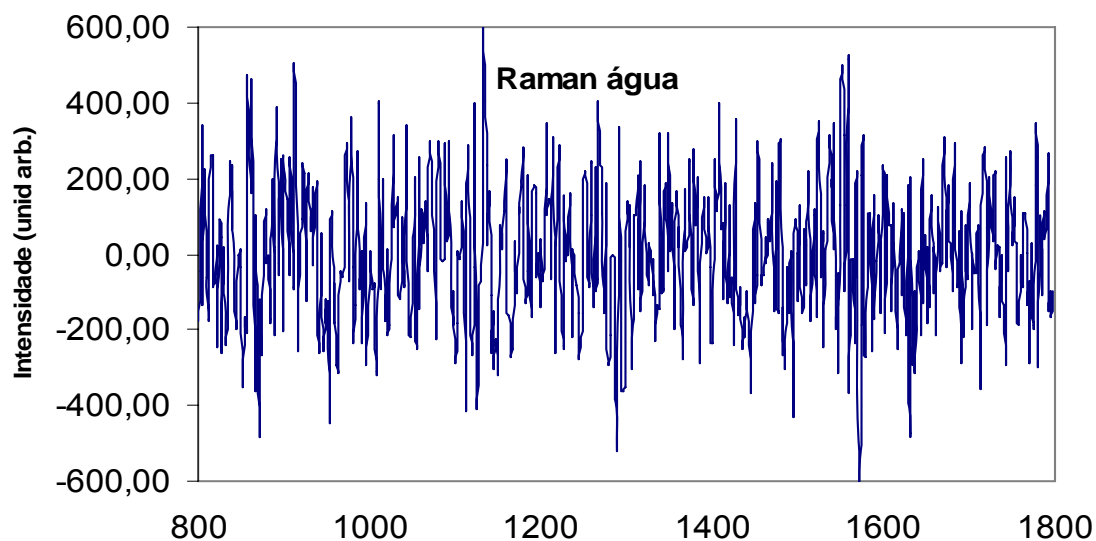


Figura 9: Espectro Raman da água em cubeta de quartzo. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm^{-1} .

Para desenvolver um modelo de cálculo das concentrações de vancomicina intra-vítrea através dos espectros Raman, foram realizadas diluições de vancomicina em água destilada, posteriormente submetidas ao espectrógrafo. A Figura 10 apresenta os espectros Raman das diferentes concentrações da vancomicina em solução aquosa, acondicionadas na cubeta de quartzo, nas concentrações de: 05 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL e 40 mg/mL. Os espectros foram plotados com um deslocamento no eixo das ordenadas, de maneira a possibilitar a avaliação das diferenças nas intensidades relativas das bandas Raman nas diversas concentrações. Os espectros não tiveram a remoção do ruído de alta frequência (ruído de fóton e ruído eletrônico da CCD), para que se mantivesse a característica original do sinal, visto que a filtragem pode, em alguns casos, introduzir artefatos na forma de picos Raman em posições onde encontram-se tais ruídos.

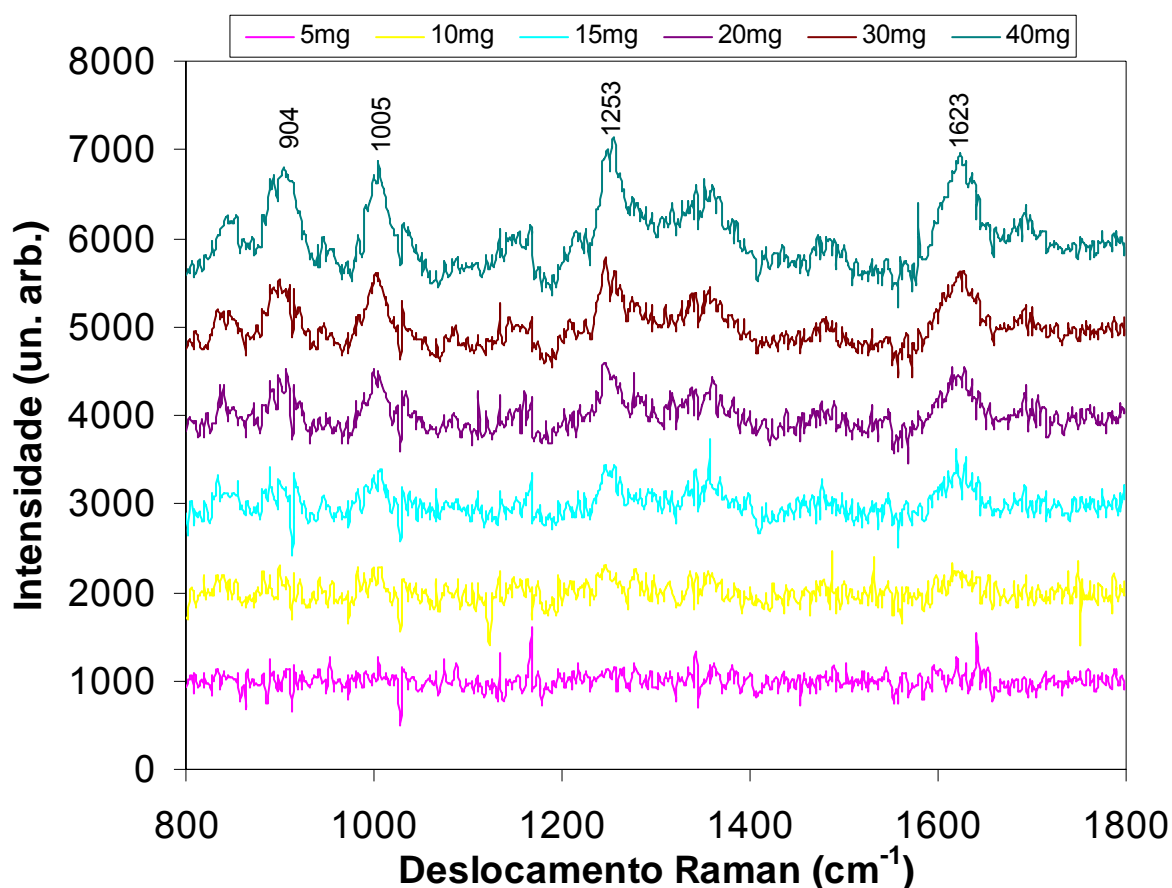


Figura 10: Espectros Raman da vancomicina diluídas em água destilada, em concentrações conhecidas (mg/mL), com o espectro da água subtraído. Potência do laser: 80 mW, comprimento de onda do laser: 830 nm, resolução: 8 cm^{-1} .

A fim de obter-se a quantificação da concentração de vancomicina injetada no vítreo dos animais do estudo, e de posse dos espectros Raman das concentrações conhecidas de vancomicina, foi desenvolvido um modelo de calibração com diluições conhecidas e variáveis de vancomicina em água para o cálculo das concentrações de vancomicina injetadas no vítreo, utilizando a técnica de regressão multivariada PLS (*Partial Least Square*), que emprega toda a informação espectral disponível, na faixa de concentração desde 0 a 40 mg/mL. Isto proporciona melhora significativa na previsão quando comparada a uma regressão univariada (um pico apenas), pois leva em consideração não somente as posições das bandas, mas também larguras, além de toda informação espectral que esteja correlacionada com as variações na intensidade da amostra. Neste caso, a concentração conhecida da vancomicina é representada pelo eixo das abscissas e a concentração prevista pelo modelo PLS aplicado aos espectros Raman está no eixo das ordenadas.

O modelo PLS utilizou um número de variáveis latentes igual a 1, ou seja, apenas a informação espectral de uma variável é suficiente para explicar as variações espectrais encontradas no conjunto de dados, dado que existe apenas a vancomicina na amostra.

Utilizando-se o software Matlab (versão 4.2), construiu-se o modelo PLS conforme descrito na seção Materiais e Métodos, sendo que neste trabalho o número de variáveis latentes foi considerado unitário, já que há somente uma única variável, a vancomicina, a ser considerada nas amostras de vítreo. A validação cruzada, ou seja, a aplicação do modelo nas mesmas amostras utilizadas na sua confecção, foi realizada e as concentrações previstas foram obtidas. A partir dos resultados do modelo PLS, foi plotada a curva de concentração real versus a concentração prevista pelo modelo. Os valores das concentrações calculadas versus as reais estão distribuídos ao longo da reta. Quanto mais próximos os pontos calculados pelo modelo da diagonal da reta das concentrações, menor é o erro da concentração de vancomicina em solução. Com os resultados deste gráfico, foi calculado o erro padrão de calibração (*EPC*) da técnica. O *EPC* tem a função de determinar o quanto o modelo PLS é capaz de prever concentrações a partir dos dados utilizados na construção do modelo. O *EPC* pode ser calculado pela expressão:

$$EPC(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - Ca_i)^2}{\sum_{i=1}^n Ca_i^2}} \times 100 \quad (1)$$

Neste contexto, Ca_i é a concentração real da solução, C_i é a concentração encontrada pelo modelo PLS através do espectro Raman, e n representa o número de amostras.

A Figura 11 apresenta o resultado da concentração calculada pelo PLS aplicada às diluições de vancomicina em água, com a concentração real (eixo x) e a prevista pelo modelo (eixo y). O erro padrão de calibração para o modelo PLS utilizando uma variável latente foi de 1,83 mg/mL.

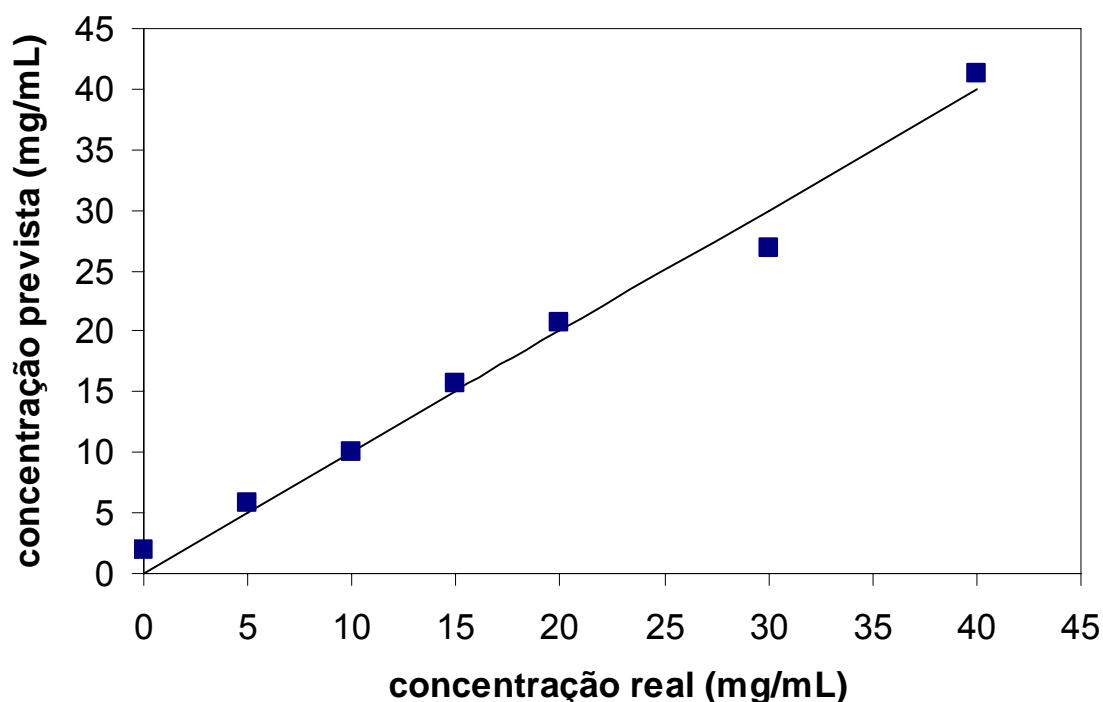


Figura 11: Curva com a comparação entre a concentração real da diluição da vancomicina (abscissa) versus a concentração prevista pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman (ordenada) em solução aquosa, com o número de variáveis latentes igual a 1.

Objetivando demonstrar que a primeira variável latente calculada e utilizada no modelo PLS realmente representam a informação espectral da vancomicina diluída em água, a Figura 12 apresenta a plotagem das duas primeiras variáveis latentes. Observa-

se os picos Raman nas mesmas posições da vancomicina em pó na primeira variável latente, enquanto que na segunda variável observa-se picos não correlacionados com o espectro da droga.

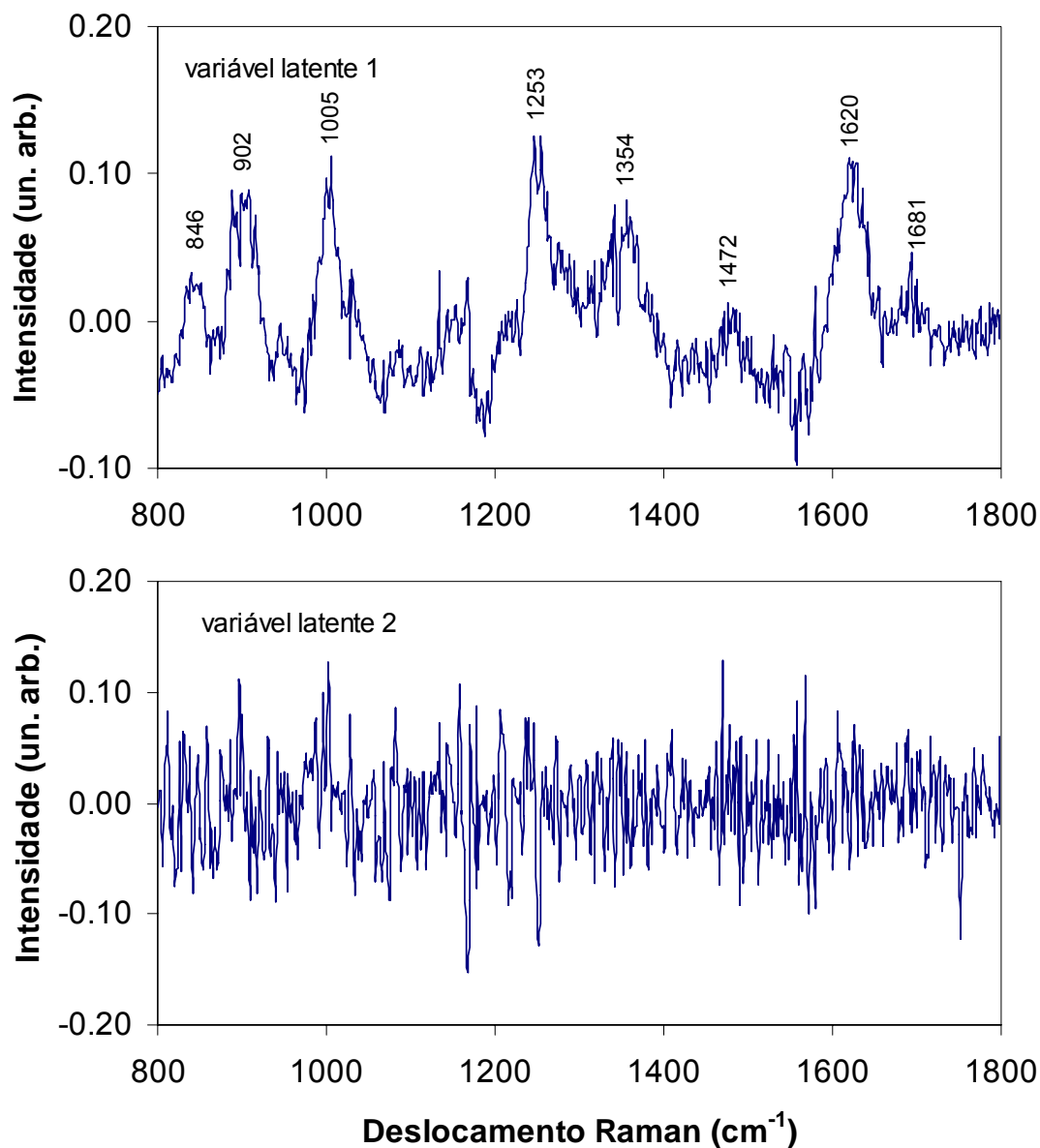


Figura 12: Plotagem das duas primeiras variáveis latentes obtidas pelo modelo PLS aplicado aos espectros de vancomicina diluídas em água.

A droga vancomicina foi injetada intra-vítrea nos grupos experimentais conforme segue:

1) Amostras do grupo 8 h: G3

Após permanecer por 8 h com a vancomicina na câmara vítrea, o conteúdo vítreo foi coletado através de micro-cirurgia e acondicionado na cubeta de amostras para ser analisado pelo equipamento Raman. Neste grupo foram obtidas 6 amostras de vítreo com vancomicina. O espectro Raman médio destas amostras é mostrado na Figura 13. A análise PLS mostrou que houve alteração da quantidade da vancomicina intra-vítrea dos olhos que foram inoculados com Vancomicina para os olhos não inoculados.

2) Amostras do grupo 24 h: G2

Após permanecer por 24 h com a vancomicina na câmara vítrea, o conteúdo vítreo foi coletado e acondicionado na cubeta de amostras para ser analisado pelo equipamento Raman. Foram obtidas 6 amostras de vítreo com vancomicina. O espectro Raman médio destas amostras é mostrado na Figura 13. A análise PLS mostrou que também apresentaram variação da quantidade da droga em relação aos olhos controle e ao grupo 8 h.

3) Amostras do grupo 48 h: G1

Após permanecer por 48 h com a vancomicina na câmara vítrea, o conteúdo vítreo foi coletado e acondicionado na cubeta de amostras para ser analisado pelo equipamento Raman. Foram também obtidas 6 amostras de vítreo com vancomicina. O espectro Raman médio destas amostras é mostrado na Figura 13. A análise PLS mostrou que este grupo também apresentou diferenças na quantidade de droga em relação ao grupo controle e aos demais grupos de inoculação.

4) Amostras controle:

Em cada grupo de animais foi separado um coelho onde era aplicada apenas água destilada sem vancomicina no mesmo momento em que era aplicada a medicação nos demais membros do grupo respectivamente. Foram obtidas 4 amostras de vítreo de três animais (duas das amostras foram perdidas).

O espectro Raman médio destas amostras é mostrado na Figura 13.

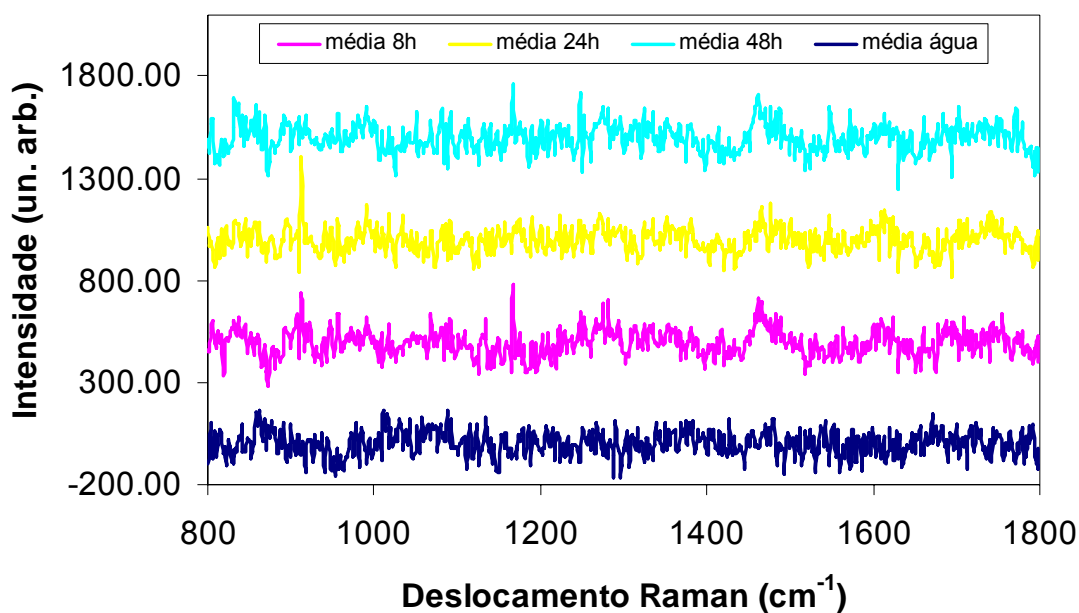


Figura 13: Plotagem dos espectros Raman médios do vítreo das amostras após a injeção de água e vancomicina em 8 h, 24 h, 48 h e média do grupo água.

O modelo PLS utilizando os espectros Raman da droga diluída em água foi então aplicado às amostras de vítreo de coelho com injeção de vancomicina, tendo como resultado novos valores de concentração calculadas pelo modelo com o número de variáveis latentes igual a 1. Como foram obtidos espectros em seis amostras em cada tempo de injeção, foram verificados seis valores de concentrações previstas, e o resultado final da concentração para cada amostra é apresentado na Tabela 3. Uma das amostras apresentou uma discrepância muito alta em relação às demais, ocorre que ao se avaliar o espectro Raman foi observada presença de bandas diferentes das do vítreo, indicando uma possível contaminação provavelmente por resíduos de retina, coróide ou sangue, que não puderam ser removidos da amostra no momento da espectroscopia. A amostra possivelmente contaminada foi retirada do cálculo da média.

Tabela 3: Resultados da aplicação do modelo PLS dos espectros de vancomicina em solução aquosa nos espectros Raman da vancomicina injetada no olho dos coelhos, com subtração do espectro da água.

Amostra	Concentração prevista pelo PLS com uma variável latente
agu08_1	-0,174
agu24_1	-0,117
agu48_1	0,291
agu48_2	0,690
van08_1	0,676
van08_2	1,556
van08_3	3,308
van08_4	2,312
van08_5	2,494
van08_6	2,494
van24_1	3,015
van24_2	3,293
van24_3	0,400
van24_4	3,541
van24_5	0,066
van24_6	1,769
van48_1	2,448
van48_2	22,59*
van48_3	2,603
van48_4	1,747
van48_5	1,734
van48_6	0,366

*Nota: amostra possivelmente contaminada e retirada das análises subsequentes.

A verificação individual de cada amostra pela estimativa do PLS, identificou que a quantificação foi muito baixa em algumas amostras injetadas, como a exemplo das amostras van24_3 e van24_5 e van48_6. As amostras agu08_1, agu24_1, agu48_1 e agu48_2, por tratarem-se de injeção de água, apresentaram quantidade também baixa.

Com os dados individuais de cada amostra, foi calculada a média e desvio padrão dos resultados da previsão do modelo PLS para cada tempo de injeção, visando com isto comparar as concentrações obtidas com as concentrações do medicamento que estão descritas na literatura. Na Figura 14 é apresentada a média e desvio padrão da quantidade de vancomicina em cada tempo decorrido da injeção, onde pode-se avaliar o comportamento geral da concentração calculada pelo modelo PLS. Observou-se um valor muito pequeno da concentração da droga nas amostras com inoculação de água, e a possível identificação da vancomicina nas amostras de vítreo inoculadas com o antibiótico, porém com importante oscilação das medições de concentração verificadas pelo elevado desvio padrão, corroborando com o alto valor do erro padrão de calibração.

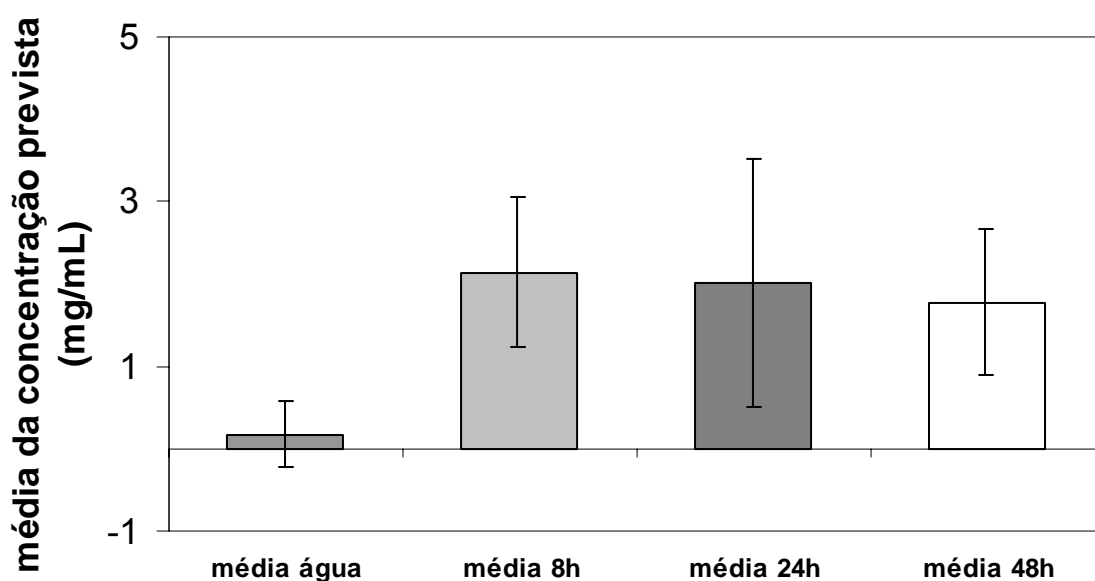


Figura 14: Gráfico de barras com o valor médio da concentração indicado pelo PLS em cada grupo separadamente.

No gráfico da Figura 14, para a obtenção da concentração média no grupo de 48 h, foi subtraída a amostra van48_2 que, como já ressaltado anteriormente, apresentou uma concentração supervalorizada possivelmente em função de contaminação com outros tecidos retinianos.

A aplicação do teste Kolmogorov-Smirnov indicou distribuição normal dos dados. Portanto, utilizou-se o teste ANOVA para indicar possíveis diferenças entre os grupos. O teste ANOVA com nível de significância de 5% nos grupos de injeção

dependendo do tempo de inoculação não indicou diferença significativa entre os grupos água, 8 h, 24h e 48h. Porém, embora o número de amostras não seja muito grande e tenha ocorrido elevado desvio padrão, é possível evidenciar variações entre os grupos. Pelo elevado desvio padrão não é possível quantificar com precisão a concentração da droga no vítreo.

5 DISCUSSÃO

Conforme demonstrado no item Materiais e Métodos, 3 grupos com 3 coelhos Nova Zelândia cada (18 olhos) foram submetidos à injeção individual de 5 mg de vancomicina em cada olho. Através de micro-cirurgia, amostras do corpo vítreo foram coletadas após permanência do antibiótico intra-ocular por períodos distintos: 8 h (G3), 24 h (G2) e 48 h (G1). Em cada um dos grupos foi mantido um animal de controle com injeção de apenas água nos dois olhos.

As amostras foram avaliadas mediante espectroscopia Raman com objetivo principal de determinar oscilações de concentração do antibiótico quando comparado ao seu período de permanência no interior do globo ocular. Em consequência, buscou-se identificar o *clearance* da droga neste intervalo de tempo com o uso da espectroscopia Raman dispersiva no infravermelho próximo.

Pela Figura 7, pode-se destacar que os picos Raman identificados na amostra foram coincidentes com os picos obtidos na literatura, tocante a produtos químicos puros (Sigma- Aldrich). Tal constatação foi evidenciada mediante a comparação entre o espectro obtido no experimento (Figura 7) e o verificado durante a revisão bibliográfica (Figura 5). Neste sentido, o espectro Raman dispersivo apresentou uma relação sinal-ruído alta em virtude de ser material puro, não diluído. A alta qualidade do espectro permitiu uma correta identificação das posições das bandas mais importantes, revelando a viabilidade do experimento.

Considerando que o estudo se concentrou no corpo vítreo, formado por água (99%), por colágeno tipo II e ácido hialurônico (1%), verifica-se na Figura 8, em que foi plotado o espectro do vítreo de um coelho normal (sem a injeção de qualquer droga), que não foram observados picos Raman significativos, apresentando apenas ruído e remanescente das bandas da cubeta de quartzo (na região entre 800 a 1000cm^{-1} e 1000 a 1200cm^{-1}). Assim, a análise das Figuras 8 e 9 revela que o vítreo e a água (em razão de sua semelhantes estruturas moleculares), permitem identificação de alterações em sua composição química, através da espectroscopia Raman. Semelhante constatação foi apresentada por Sebag et al.⁵⁷, que encontraram um sinal Raman muito fraco do vítreo puro, mesmo na forma desidratada, bem como uma dificuldade muito grande em se obter a forma liofilizada do vítreo devido a sua baixa concentração

celular. Fisiologicamente, o mesmo ocorre com a água. Assim, o sinal Raman de vítreo e água é praticamente inexistente e, alguma alteração neste sentido deve ser creditada a substâncias em seu interior.

Na aplicação do modelo PLS para previsão das concentrações, é recomendado que o soluto seja dissolvido no mesmo solvente objeto da avaliação⁸¹, neste caso, seria necessária a diluição das amostras do antibiótico no vítreo. Porém, optou-se pela diluição em água destilada por motivos práticos, o que possivelmente não implicou no resultado (como demonstrado acima), visto que a água é a composição básica do vítreo. O problema em se obter a curva de diluição da concentração do soluto no vítreo implicaria no sacrifício de vários animais para obtenção do volume necessário de vítreo. De outro lado, seria imprópria a diluição do antibiótico em gel vítreo *post mortem*, já que a fisiologia do meio seria diferente daquela encontrada em um globo ocular íntegro, local de fluxo contínuo de líquidos e eletrólitos, além de que a temperatura corpórea do animal poderia implicar no metabolismo.

Analisando a Figura 10, apesar da baixa relação sinal/ruído, é possível observar, a partir de 10 mg/mL, a expressão das bandas Raman da vancomicina em 904, 1005, 1253 e 1623 cm^{-1} . Estas bandas não estão presentes no espectro da água pura e enfraquecem de acordo com a diluição da droga. (quanto menor a concentração, menor a intensidade do sinal Raman). Já Hosseini et al.⁷⁷, com utilização de espectroscopia Raman, obtiveram com facilidade, quantidades de ceftazidima próximas de 0,4 mg em humor aquoso, concentrações estas abaixo das doses indicadas clinicamente em injeções intra-vítrea desta droga (2,5 mg), porém o mesmo estudo não conseguiu se aproximar da identificação da anfotericina B que apresenta concentrações muito menores.

Pela Figura 13, onde os espectros do vítreo com água e os do vítreo inoculado com vancomicina em diferentes tempos: 8 h (G3), 24 h (G2), 48 h (G1), foram pareados num mesmo gráfico, vê-se que os grupos inoculados apresentam um padrão bem diferente de bandas do grupo onde foi injetado apenas água. Destaca-se ainda a grande semelhança nas bandas de maior expressão dos três grupos inoculados, o que não ocorre significativamente no grupo controle. No mesmo sentido, a Tabela 3 revela que nos animais em que foi injetada vancomicina, a aplicação do método PLS no cálculo da concentração da droga, foi eficaz no respectivo diagnóstico percentual. Já

nos animais em que se injetou água destilada, os resultados indicaram baixa quantidade.

Naqueles onde a droga foi introduzida: van08_1, van08_2, van08_3, van08_4, van08_5, van08_6, van24_1, van24_2, van24_4, van24_6, van48_1, van48_3, van48_4 e van48_5, houve uma concentração próxima da esperada, ou seja, abaixo de 5 mg/mL, decorrente da deposição de 5 mg de medicamento no interior de um globo ocular estimado de 1 cm³ (1 mL). A variação apresentada compreendeu uma concentração de 0,67 a 3,54 mg/mL.

O erro padrão de calibração (*EPC*), para variável latente no presente modelo de PLS foi de 1,83 mg/mL, considerado elevado para uma avaliação de concentração próxima de 5 mg/mL. Este erro pode explicar o valor significativo da barra de erro (desvio padrão) que os resultados da concentração intra-vítrea apresentaram. Tal fato impediu que se afirmassem as diferenças de concentrações da substância presente no interior do vítreo.

A Tabela 3 demonstrou que, apesar de se destacarem das amostras que continham apenas injeção de água, as amostras com 8 h, 24 h e 48 h possuem uma oscilação grande nos resultados da concentração da droga calculada pelo PLS, inclusive, em um mesmo grupo. A título de exemplo, as amostras: van24_3, van24_5 e van48_6, apresentaram resultado de concentração muito baixo. Já a amostra van48_2 expressou uma concentração acima de 22 mg/mL, impossível de ser alcançada em razão da quantidade injetada no olho do animal (apenas 5 mg/mL), Provavelmente o valor elevado foi decorrente de uma contaminação com outros tecidos oculares, não presentes na calibração do PLS. O fato é que se esperava concentrações semelhantes nas amostras submetidas ao antibiótico pelo mesmo período de tempo (8 h, 24 h e 48 h). Disto surgem duas possibilidades: 1) o laser foi focado em locais do vítreo com concentração insuficiente de vancomicina; 2) ocorreu uma difusão não regular do medicamento no interior do vítreo. Sobre este último ponto, ressalte-se que a dose de vancomicina foi aplicada em bolo em uma única injeção no corpo vítreo, e a partir deste aglomerado, o medicamento deveria difundir-se para o restante do corpo vítreo. Já em estudos no humor aquoso presente em câmara anterior, onde não há compartimentalização dos fluidos esta fator pode ser desconsiderado^{69,74,77}.

Estudos prévios demonstraram que a difusão de medicamentos no vítreo é semelhante a da água⁸⁴. Porém, sabe-se que o vítreo é dividido em segmentos e estes

podem apresentar diferentes comportamentos de acordo com a localização da injeção primária^{5, 23}. Ao se considerar tal fato, é possível que em algumas localizações vítreas sejam encontrados valores superiores ou inferiores ao esperado para a diluição, pois a precipitação local poderia expressar uma concentração aparentemente equivocada neste segmento. Neste aspecto, ressalta-se que a homogeneização do vítreo e da medicação não foi procedida nas amostras para que não fosse influenciado, mesmo no *pós mortem*, a difusão do medicamento no vítreo, isto se justifica pelo fato de que na prática, também não seria possível misturar mecanicamente os elementos.

Quanto à focalização do laser na amostra de vítreo dentro da cubeta, neste experimento não foi possível a determinação do ponto exato em que o laser incidia no corpo vítreo, visto que o material foi todo acondicionado na cubeta. Desta forma, as médias apresentaram-se mais úteis que os valores individuais, como visto na Figura 14. Assim uma maior quantidade de amostras poderia ter uma melhor previsibilidade, diminuindo a variação estatística.

Na prática oftalmológica, com o uso de miras a laser e lentes de aumento como as encontradas nas lâmpadas de fenda (equipamento básico de consultório), seria possível uma maior previsibilidade da zona a ser excitada pelo Raman. Isto significa que no uso clínico o posicionamento do feixe de excitação poderia ser mais preciso, o que não pode ser feito neste experimento.

Considerando isso, e a fim de melhorar a relação sinal-ruído dos espectros Raman do vítreo e potencializar a confiabilidade dos resultados das concentrações previstas pelo modelo PLS, há a possibilidade de se aumentar a potência do laser de excitação, com o conseqüente aumento da intensidade do espalhamento Raman. Há também a hipótese de se utilizar um laser de comprimento de onda menor, visto que o espalhamento aumenta com a diminuição do comprimento de onda. O inconveniente a ser considerado é que um menor comprimento de onda teria o efeito de fluorescência mais intenso, não desejado para o sinal Raman⁶⁹.

A par disso, alguns autores demonstraram que lasers de comprimento de ondas menores como o verde (514,5 nm proveniente do laser de argônio), poderiam ser utilizados para aumentar a relação sinal/ruído do espectro Raman, como visto por Sideroudi et al.⁸⁵, porém com este comprimento de onda penetrar-se-ia menos nos tecidos oculares, o que, na hipótese de infecção (endoftealmite), resultaria inócuo, pois os meios intra-oculares apresentam-se com opacidade intensa⁶.

É bem verdade que, comprimentos de ondas maiores, próximos de 830 nm alcançariam uma penetração maior. O ideal é que se pudesse: 1) combinar uma fonte excitadora com o comprimento de onda curto, para amplificar estímulos em moléculas diluídas, com uso em meios transparentes; 2) aplicar comprimentos de onda mais longos para uso em meios mais opacos⁶⁹.

Diante do exposto, a técnica Raman pode se tornar um instrumento de grande valia para a prática clínica oftalmológica, mas para que isso ocorra deve-se priorizar estudos de melhora dos resultados obtidos, em especial, na identificação quantitativa de substâncias intra-oculares.

6 CONCLUSÃO

Em função dos resultados encontrados no desenvolvimento deste trabalho, é possível concluir que:

- A espectroscopia Raman dispersiva com fonte de laser excitador de 830 nm foi capaz de reproduzir o espectro Raman da vancomicina liofilizada (desidratada), de acordo com a comparação do espectro apresentado por uma companhia fornecedora da droga.

- A espectroscopia Raman dispersiva é capaz de identificar a presença de vancomicina no gel vítreo no *post mortem* imediato. A vancomicina foi melhor identificada em solução aquosa através da espectroscopia Raman dispersiva com uso de laser no infra-vermelho próximo (830 nm) em concentrações superiores a 10 mg/mL.

- A espectroscopia Raman dispersiva com laser excitador de 830nm não se mostrou sensível para identificação de vancomicina em concentrações próximas de 05mg/mL no vítreo dos coelhos.

- A técnica PLS, utilizando o modelo de calibração da droga diluída em água, foi capaz de apontar uma concentração intra-vítrea da vancomicina próxima da esperada (em torno de 5 mg/mL), porém com grande desvio padrão.

REFERÊNCIAS

- 1- KANSKI, J.J. **Clinical Ophthalmology**. 3. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1994. 514p.
- 2- RYAN, S.J. et al. **Retina**. 3.ed. St.Louis Missouri: Mosby, 2001. 874p.v.1
- 3- ALVES, A.A. et. al. **Refracção**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Medica, 1994. 532p.
- 4- BOYD, B. F. et. al. **Retinal and Vitreoretinal Surgery**. 1. ed. Panama: Highlights of Ophthalmology, 2002. 565p.
- 5- BALAZS, E.A. The Vitreous. Intern. **Ophthalmol. Clin.**, v.13, p.169-187, 1973.
- 6- MEREDITH, T.A. Vitrectomy for Infectious Endophthalmitis. In: RYAN et. al. **Retina**. 3.ed. St.Louis Missouri: Mosby, 2001. v. 3. p 2242- 2263.
- 7- ALVES, A.A. Refracção do olho. In: **Refracção**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Medica, 1994. p.73-78.
- 8- WEITER, J.J. Optics of Laser Irradiation. In: RYAN et. al. **Retina**. 3.ed. St.Louis Missouri: Mosby, 2001. v. 1, p 499-509.
- 9- MILLER, R.F. The Physiology and Morphology of the Vertebrate Retina. In: RYAN et. al. **Retina**. 3.ed. St.Louis Missouri: Mosby, 2001. v.1. p 138- 170p.
- 10- PEREIRA, C.M. Laser em Oftalmologia. In: Alves et. al. Refracção. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Medica, 1994. p.352-355.
- 11- BOETTNER, E.A.; WOLTER, R. Transmission of the ocular media. **Investigative Ophthalmology**, v.11, n.6, p.776-783, December 1962.
- 12- GREEN,W.R.; SEBAG, J. Vitreoretinal Interface. In: RYAN et. al. **Retina**. 3.ed. St.Louis Missouri: Mosby, 2001. vol. 3., p 1882-1960.
- 13- DUCK-ELDER, S.W. The nature of the vitreous body. **Brit J Ophthalmol**, v.14, suppl. 4, p.6, 1930.
- 14- ENDOPHTHALMITIS Vitrectomy Study Group. Microbiologic factors and visual outcome in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. **Am J Ophthalmol**,. v.122, p.830–846, 1996.
- 15- LEMLEY, C.A.; HAN, D.P. Endophthalmitis: A Review of Current Evaluation and Management. **Retina**, v.27, n.6, p.662-680, July/August 2007.
- 16- ENGELBERT, M.; MIÑO DE KASPAR, H.; THIEL, M.; GRASBON, T.; TA, C.N.; SCHULZE-SCHWERING, M.; KLAUSS, V.; KAMPIK, A. Intravitreal

vancomycin and amikacin versus intravenous imipenem in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. **Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.**, v.242, n.4, p.313-20, Apr 2004.

17- KWOK, A.K.H.; HUI, M.; PANG, C.P.; CHAN, R.C.Y.; CHEUNG, S.W.; YIP, C.M.S.; LAM, D.S.C.; CHENG, A.F.B. An In Vitro Study of Ceftazidime and Vancomycin Concentrations in Various Fluid Media: Implications for Use in Treating Endophthalmitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science.**, v.43, n.4, p.1182-88, April 2002.

18- ERCKENS, R.J.; WICKSTED, J.P.; MARCH, W.F.; MOTAMEDI, M. Raman spectroscopy for non-invasive characterization of ocular tissue: Potential for detection of biological molecules. **J Raman Spectroscopy.**, v.28, p.293-9, 1997.

19- ERCKENS, R.J.; JONGSMA, F.H.M.; WICKSTED, J.P.; HENDRIKSE, F.; MARCH, W.F.; MOTAMEDI, M. Raman spectroscopy in Ophthalmology: From Experimental Tool to Applications in Vivo. **Laser Medical Science.**, v.16, p.236-252, 2001.

20- TASMAN, W. Endotalmites Pós-Operatória. In: WILLS EYE HOSPITAL. **Manual das Doenças Oculares.** 2.ed. Phyladelphia: J B Lippincott Company, 1998. p. 394-399.

21- LEITE, E.H.M. Endoftalmites. In: LAVINSKY et.al. **Doenças Prevalentes da Retina e Vítreo.** 1.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002. p 205-216.

22- COCO, R.M.; LOPEZ, M.I.; PASTOR, J.C. Pharmacokinetics of 0.5 mg of a single and a multiple dose of intravitreal vancomycin in infected rabbit eyes. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.16, n.4, p.373-81, Aug 2000.

23- LEE, V.H.L.; HOSOYA, K. Drug Delivery to the Posterior Segment. In: RYAN et.al. **Retina.** 3 ed. St. Louis Missouri: Mosby, p.2270-2285. 2001. v.3.

24- MEREDITH, L. Vitrectomy for Infecçiosas Endophthamitis. In: RYAN et.al. **Retina.** 3 ed. St. Louis Missouri: Mosby, 2001.v.3., p.2242-2263.

25- MALERBI, K.M.; ANDRADE, R.E.A;FARAH, M.E. OCT no diagnóstico por imagem. In: FARAH et. al. **Tomografia de Coerência Óptica Texto e Atlas.** 1 ed. Rio de Janeiro RJ. Cultura Médica, 2006. p 01-08.

26- SEBAG, J. Imaging Vítreous. **Eye**,v.16, p 429-439, 2002.

27- BOYD, S. Fundus Examination Techniques. In: BOYD et. al. **Retinal and Vitreoretinal Surgery.** 1. ed. Panama: Highlights of Ophthalmology, 2002. p05-15.

28- BENCHIMOL, R. Refração Automatizada. In: ALVES et. al. **Refração.** 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Medica, 1994. p.215-222.

- 29- DREXLER, W.; FUJIMOTO, J.G.; State-of-the-art retinal optical coherence tomography. **Prog Retin Eye Res**;v.27, n.1, p.45-88, Jan 2008.
- 30- ALGVERE, P.V.; TORSTENSSON, P.L.; TENGROTH,B.M. Light Transmittance of Ocular Media in Living Rabbit Eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.34, n.2, p.349-54, February 1993.
- 31- BORNFIELD, N. Laser Treatment of Coroidal Melanoma. In: RYAN et. al. **Retina**. 3.ed. St.Louis Missouri: Mosby, 2001. p 785-797.v.1.
- 32- <http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/raios-laser/raios-laser.php>
- 33- WEITER, J.J. retinal Laser Surgery: Principles and Techniques. In: RYAN et. al. **Retina**. 3.ed. St.Louis Missouri: Mosby, 2001. p 1025-1031. v. 2.
- 34- PUEYO V; POLO V; LARROSA JM; FERRERAS A; PABLO LE; HONRUBIA FM. Diagnostic ability of the Heidelberg retina tomograph, optical coherence tomograph, and scanning laser polarimeter in open-angle glaucoma. **J Glaucoma**; v.16, n.2, p.173-177, 2007 Mar
- 35- SEELIGER MW; BECK SC; PEREYRA-MUÑOZ N; DANGEL S; TSAI JY; LUHMANN UF; VAN DE PAVERT SA; WIJNHOLDS J; SAMARDZIJA M; WENZEL A; ZRENNER E; NARFSTRÖM K; FAHL E; TANIMOTO N; ACAR N; TONAGEL F. In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. **Vision Res**; v.45, n.28,p.3512-3519, 2005 Dec.
- 36- FRAMME C; SCHUELE G; KOBUCH K; FLUCKE B; BIRNGRUBER R; BRINKMANN R. Investigation of selective retina treatment (SRT) by means of 8 ns laser pulses in a rabbit model. **Lasers Surg Med**; v.40, n.1, p.20-7, 2008 Jan.
- 37- ITAYA M; SAKURAI E; NOZAKI M; YAMADA K; YAMASAKI S; ASAI K; OGURA Y. Upregulation of VEGF in murine retina via monocyte recruitment after retinal scatter laser photocoagulation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; v.48, n.12, p.5677-5683, 2007 Dec.
- 38- BORCHERT, M.; LAMBERT, J.; SLINEY, D. Validation of ICNIRP estimates of toxicity thresholds for NIR (785 nm) light in the retinas of pigmented rabbits. **Health Phys**. v.90, n.1, p.3-10, Jan 2006.
- 39- GEERAETS, W.J.; WILLIAMS, R. C.; CHAN, G.; HAM, W. T. JR.; DUPONT GUERRY, H.I.; SCHMIDT, F.H.. The Relative Absorption of Thermal Energy in Retina and Choroids. **Investigative Ophthalmology**; v.1, n.3, p.340-347, June 1962.
- 40- SCOTT, I.U.; FLYNN, H.R.JR.; Reducing de risc of endophthalmitis following intravitreal injection. **Retina**.; v.27, n.1, p.10-12, January 2007.
- 41- ENDOPHTHALMITIS Vitrectomy Study Group.Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study: A Randomized Trial of Immediate Vitrectomy and of Intravenous

Antibiotics for the Treatment of Postoperative Bacterial Endophthalmitis. **Arch Ophthalmol.** v.113, p.1479-1496, 1995.

42- AL-OMRAM, A.M.; ABBOUD, E.B.; ABU EL ASRAR, A.M.; Microbiologic Spectrum and visual outcome of posttraumatic endophthalmitis. **Retina.** v.27, n.2, p.236-242. February 2007.

43- RAJU, B.; THIAGARAJAN, G.; DAS, T.; Hyderabad Endophthalmitis Research Group. Modified high-performance liquid chromatography technique for detection of vancomycin in human vitreous. **Ophthalmic Res.** v.36, n.1, p.55-61, Jan-Feb 2004.

44- GUPTA, R.; SHARMA, S.; RAO, D.V.; DAS, T.; Endophthalmitis Research Group. Applicability of rapid antibiotic susceptibility testing in the management of bacterial endophthalmitis. **Retina.** v.24, n.3, p.391-398, Jun 2004.

45- SNYDER, R.W.; GLASSER, D.B. Antibiotic therapy for ocular infection. **West J Med.** v.161, n.6, p.579-584, December 1994.

46- PFLUGFELDER, S.C.; HERNANDEZ, E.; FLIESLER, S.J.; et al. Intravitreal vancomycin: retinal toxicity, clearance, and interaction with gentamicin. **Arch Ophthalmol.** v.105, p.831-837, 1987.

47- FISHER, J.P.; CIVILETTO, S.E.; FORSTER, R.K. Toxicity, efficacy, and clearance of intravitreally injected of cefazolin. **Arch Ophthalmol.** v.100, n.4, p.650-652, Apr 1982.

48- COCO, R.M.; LÓPEZ, M.I.; PASTOR, J.C.; NOZAL, M.J. Pharmacokinetics of intravitreal vancomycin in normal and infected rabbit eyes. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.14, n.6, p.555-563, Dec 1998.

49- CAMPOCHIARO, P.A.; GREEN, W.R.; Toxicity of intravitreal ceftazidime in primate retina. **Arch Ophthalmol.** v.110, p.1625-1629, 1992.

50- GAN, I.M.; UGAHARY, L.C.; VAN DISSEL, J.T.; VAN MEURS, J.C.; Effect of intravitreal dexamethasone on vitreous vancomycin concentrations in patients with suspected postoperative bacterial endophthalmitis. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** v.243, n.11, p.1186-1189, Nov 2005.

51- GAN, I.M.; UGAHARY, L.C.; VAN DISSEL, J.T.; FERON, E.; PEPPERKAMP, E.; VECKENEER, M.; MULDER, P.G.; PLATENKAMP, G.J.; VAN MEURS, J.C. Intravitreal dexamethasone as adjuvant in the treatment of postoperative endophthalmitis: a prospective randomized trial. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** v.243, n.12, p.1200-1205, Dec 2005.

52- OZKIRIS, A.; EVEREKLIOGLU, C.; ESEL, D.; AKGÜN, H.; ERKILIÇ, K. The efficacy of intravitreal piperacillin/tazobactam in rabbits with experimental Staphylococcus epidermidis endophthalmitis: a comparison with vancomycin. **Ophthalmic Res.** v.37, n.3, p.168-174, May-Jun 2005.

- 53- GAN, I.M.; VAN DISSEL, J.T.; BEEKHUIS, W.H.; SWART, W.; VAN MEURS, J.C. Intravitreal vancomycin and gentamicin concentrations in patients with postoperative endophthalmitis. **Br J Ophthalmol**. v.85, n.11, p.1289-1293, Nov 2001.
- 54- HAIDER, S.A.; HASSETT, P.; BRON, A.J. Intraocular vancomycin levels after intravitreal injection in post cataract extraction endophthalmitis. **Retina**. v.21, n.3, p.210-213, 2001
- 55- SILVEIRA L; SATHAIAH S; ZÂNGARO RA; PACHECO MT; CHAVANTES MC; PASQUALUCCI CA. Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers Surg Med**; v.30, n.4,p. p.290-297, 2002.
- 56- Rocha R; SILVEIRA L; VILLAVARDE AB; PASQUALUCCI CA; COSTA MS; BRUGNERA A; PACHECO MT Use of near-infrared Raman spectroscopy for identification of atherosclerotic plaques in the carotid artery. **Photomed Laser Surg**; v.25, n.6, p.482-486, 2007 Dec.
- 57- SEBAG, J.; NIE, S.; REISER, K.; CHARLES, M.A.; YU, N. Raman Spectroscopy of Human Vítreous in Proliferative Diabetic Retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.35, p.2976-2980, June 1994.
- 58- JOSEPHINE, V.; GLENN, J.; BEATTIE, R.; BARRETT, L.; FRIZZELL, N.; THORPE, S.R.; BOULTON, M.E.; MCGARVEY, J.J.; STITT, A.W. Confocal Raman microscopy can quantify advanced glycation end product (AGE) modifications in Bruch's membrane leading to accurate, nondestructive prediction of ocular aging. **The FASEB Journal**. v.21, p.3542-3552. 2007.
- 59- BERNSTEIN, P.S.; ZHAO, D.Y.; ERMAKOV, I.N.; MC CLANE, R.W.; GELLERMENN, W. Ressonance Raman Measurement of macular pigment levels in the living human retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.41, abstract3185:S600,2000.
- 60- BERNSTEIN, P.S.; YOSHIDA, M.D.; KATZ, N.B.; MC CLANE, R.W.; GELLERMENN, W. Raman detection of macular carotenoid pigments in intact human retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.39, p.2003-2011, 1998.
- 61- OBANA, A.; HIRAMITSU, T.; GOHTO, Y.; OHIRA, A.; MIZUNO, S.; HIRANO, T.; BERNSTEIN, P.S.; FUJII, H.; ISEKI, K.; TANITO, M.; HOTTA, Y. Macular carotenoid levels of normal subjects and age-related maculopathy patients in a Japanese population. **Ophthalmology**. v.115, n.1, p.147-157, Jan 2008.
- 62- GLENN, J.V.; BEATTIE, J.R.; BARRETT, L.; FRIZZELL, N.; THORPE, S.R.; BOULTON, M.E.; MCGARVEY, J.J.; STITT, A.W. Confocal Raman microscopy can quantify advanced glycation end product (AGE) modifications in Bruch's membrane leading to accurate, nondestructive prediction of ocular aging. **FASEB J**. v.21, n.13, , Nov 2007.

- 63- HOGG, R.E.; ANDERSON, R.S.; STEVENSON, M.R.; ZLATKOVA, M.B.; CHAKRAVARTHY, U. In vivo macular pigment measurements: a comparison of resonance Raman spectroscopy and heterochromatic flicker photometry. **Br J Ophthalmol.** v.91, n.4, p.485-490, Apr 2007.
- 64- NIE, S.; BERGBAUER, K.L.; KUCK, J.F.R.JR.; YU NT. Near infrared fourier transform Raman spectroscopy in human lens research. **Exp Eye Res.** v.51, p.619-623, 1990.
- 65- SCHACHAR, R.A.; SOLIN, S.A.; The microscopic protein structure of the lens with a theory for cataract formation as determined by Raman spectroscopy of intact bovine lenses. **Invest Ophthalmol.** v.14, p.380-396, 1975.
- 66- BAUER, N.J.C.; WICKSTED, J.P.; JONGSMA, F.H.M.; MARCH, W.F.; HENDRIKSE, F.; MOTAMEDI, M. Noninvasive Assessment of the Hydration Gradient across the Cornea Using Confocal Raman Spectroscopy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science.** v.39, n.5, p.831-835, April 1998.
- 67- FISHER, B.T.; MASIELLO, K.A.; GOLDSTEIN, M.H.; HAHN, D.W. Assessment of transient changes in corneal hydration using confocal Raman spectroscopy. **Cornea.** v.22, n.4, p.363-370, May 2003.
- 68- WANG, S.Y.; HASTY, C.E.; WATSON, P.A.; WICKSTED, J.P.; STITH, R.D.; MARCH, W.F. Analysis of metabolites in aqueous solutions by using laser Raman spectroscopy. **Appl Opt.** v.49, p.987-993, 1993.
- 69- WICKSTED, J.P.; ERCKENS, R.J.; MOTAMEDI, M.; MARCH, W.F. Raman spectroscopy studies of metabolic concentrations in aqueous solutions and aqueous humor specimens. **Appl Spectrosc.** v.49, p.987-993, 1995.
- 70- KATZ, A.; KRUGER, E.F.; MINKO, G.; LIU, C.H.; ROSEN, R.B.; ALFANO, R.R. Detection of glutamate in the eye by Raman spectroscopy. **J Biomed Opt.** v.8, n.2, p.167-172, Apr 2003.
- 71- SMIT, E.E.; ERCKENS, R.J.; HENDRIKSE, F.; MOTAMEDI, M.; WICKSTED, J.P.; MARCH, W.F. Identification of intraocular lens materials using confocal Raman spectroscopy. **J Cataract Refract Surg.** v.25, p.1498-504, 1999.
- 72- BERTOLUZZA, A.; FAGNANO, C.; MONTI, P.; SEMERANO, G.; GARCIA-RAMOS, J.; CARAMAZZA, R. et al. Raman spectra of intraocular lenses before and after implantation in relation to their biocompatibility. **J Raman Spectrosc.** v.18, p.151-152, 1987.
- 73- ERCKENS, R.J.; MARCH, W.F.; JONGSMA, F.H.; WICKSTED, J.P.; HENDRIKSE, F.; SMIT, E.E.; MOTAMEDI, M. Noninvasive Raman spectroscopic identification of intraocular lens material in the living human eye. **J Cataract Refract Surg.** v.27, n.7, p.1065-70, Jul 2001.

- 74- SIDEROUDI, T.; PHARMAKAKIS, N.; TYROVOLAS, A.; PAPTHEODOROU, G.; CHRYSIKOS, G.D.; VOYIATZIS, G.A. Non-contact detection of ciprofloxacin in a model anterior chamber using Raman spectroscopy. **J Biomed Opt.** v.12, n.3. p.:34-5, May-Jun 2007.
- 75- LA VIA, W.V.; LAMBERT, J.L.; PELLETIER, M.J.; MOROOKIAN, J.M.; SIRK, S.J.; MICKIENE, D.; WALSH, T.J.; BORCHERT, M.S. Measurement of amphotericin B concentration by resonant Raman spectroscopy--a novel technique that may be useful for non-invasive monitoring. **Med Mycol.** v.44, n.2, p.169-74, Mar 2006.
- 76- HOSSEINI, K.; MARCH, W.; JONGSMA, F.H.; HENDRIKSE, F.; MOTAMEDI, M. Noninvasive detection of ganciclovir in ocular tissue by Raman spectroscopy: implication for monitoring of drug release. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.18, n.3, p.277-85, Jun 2002.
- 77- HOSSEINI, K.; JONGSMA, F.H.; HENDRIKSE, F.; MOTAMEDI, M. Non-invasive monitoring of commonly used intraocular drugs against endophthalmitis by Raman spectroscopy. **Lasers Surg Med.** v.32, n.4, p.265-70, 2003.
- 78- BAUER, N.J.; MOTAMEDI, M.; WICKSTED, J.P.; MARCH, W.F.; WEBERS, C.A.; HENDRIKSE, F. Non-invasive assessment of ocular pharmacokinetics using Confocal Raman Spectroscopy. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.15, n.2, p.123-34, Apr 1999.
- 79- BAUER, N.J.; MOTAMEDI, M.; HENDRIKSE, F.; WICKSTED, J.P. Remote temperature monitoring in ocular tissue using confocal Raman spectroscopy. **J Biomed Opt.** v.10, n.3:031109, May-Jun 2005.
- 80- FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Quim. Nova.** v.22 n.5 Sept./Oct. 1999
- 81- CUNHA JR, A.P.; DA CUNHA, V.P.P.; SILVEIRA JR, L.; MARTIN, A.A. Modelo de calibração da concentração de metilmetacrilato em solução aquosa utilizando espectroscopia de absorção no ultravioleta. **Quim. Nova.** v.26, n.6, p.850-854, 2003
- 82- VALDERAMA, P. Avaliação de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada na Determinação de Parâmetros de Controle de Qualidade em Indústria Alcooleira por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. **Dissertação** (Mestrado em Química Analítica) – UNICAMP, Campinas, 2005.
- 83- FIDÊNCIO, P.H. **Análises de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos.** Tese (Doutorado em Ciências-Química Analítica). Universidade de Campinas, Campinas, SP. 2001.

84- MAURICE, D.M. The Exchange of Sodium Between the Vitreous Body and the Blood and aqueous Humor. **J. Physiol.** v.137. p.110-125, 1957.

85- SIDEROUDI, T.I.; PHARMAKAKIS, N.M.; PAPTAEODOROU, G.N.; VOYIATZIS, G.A. Non-invasive detection of antibiotics and physiological substances in the aqueous humor by Raman spectroscopy. **Laser in Surg. and Med.** v.38 p.395-703, 2006.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º **A086/CEP/2007**, sobre
“Avaliação da Vancomicina diluída em humor vítreo com Espectroscopia Raman” sob a responsabilidade de **Roney Carlos Lora** foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 02 de agosto de 2007.



PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap