



Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias

Edição 2010/2011

Relatório de Projecto

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE LEVOFLOXACINA EM PARTÍCULAS DE
UM BIOMATERIAL ORTOPÉDICO PARA TRATAMENTO DA OSTEOMIELOTE**

Bolseiro: João Miguel de Oliveira Conniot

Faculdade de Farmácia

Curso: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

4º ano

Tutora: Prof.^a Doutora Ana Francisca Bettencourt

Resumo

A osteomielite consiste num processo inflamatório associado à destruição óssea, causado por microrganismos infecciosos. O seu tratamento envolve debridamento cirúrgico, remoção dos corpos estranhos e ainda antibioterapia. A necessidade de se atingirem concentrações parentéricas elevadas de antibióticos para que a terapêutica seja efectiva no tecido ósseo, assim como a duração prolongada do tratamento pode conduzir à toxicidade sistémica induzida pelo antibiótico. Este facto vem sublinhar a importância do desenvolvimento de sistemas de *drug delivery*, de forma a que a libertação dos fármacos no local pretendido, seja feita de modo controlado e por períodos de tempo mais longos.

O poli(metilmetacrilato) (PMMA), tratando-se de um polímero biocompatível com valor reconhecido no âmbito das artroplastias, foi considerado como sistema de transporte para a libertação controlada de um antibiótico: a levofloxacina (LEV). O referido antibiótico é uma fluoroquinolona de 3ª geração geralmente utilizada contra *Staphylococcus aureus*, um dos agentes patogénicos frequentemente associados à osteomielite.

Objectivos: 1) Incorporação de LEV em partículas de PMMA; 2) Comparação das características das partículas obtidas por diferentes métodos.

Métodos: 1) As partículas de PMMA foram preparadas pelo método da dupla emulsão a/o/a com evaporação do solvente (DESE), quer pela via convencional quer por *downscale*. Foram avaliados diversos parâmetros como sejam a morfologia, o rendimento de produção, o tamanho, a eficiência de encapsulação (EE), o *drug loading* (DL), o potencial zeta (PZ) e o perfil de libertação *in vitro*.

Resultados: 1) As partículas apresentaram superfície esférica e regular e tamanhos na gama do micrómetro (μm). Obtiveram-se melhores resultados quer de DL quer de EE, pelo método convencional. Os ensaios de libertação *in vitro* revelaram concentrações inferiores ao da MIC50 para *S. aureus* durante toda a duração do ensaio.

2) As partículas produzidas pelo método convencional destacaram-se especialmente das produzidas por *downscale* no que diz respeito aos seus tamanhos e à dispersão da população.

Conclusões: Os valores alcançados revelaram que tanto para o método convencional como para o de *downscale* é necessário levar a cabo algumas alterações na formulação de forma a melhorar a encapsulação da LEV, a distribuição do tamanho das partículas (essencialmente a nível do *downscale*) e também os perfis de libertação *in vitro*.

Índice

Lista de Abreviaturas	6
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	8
1. Introdução e Objectivos	9
1.1. Introdução	9
1.1.1. Osteomielite	9
1.1.2. Sistema de <i>Drug Delivery</i> para a osteomielite	9
1.1.2.1. O Poli(metilmetacrilato) (PMMA) como veículo	10
1.1.3. Partículas de pequenas dimensões como sistema de libertação controlada	11
1.2. Objectivos	13
2. Materiais e Métodos	13
2.1. Reagentes	13
2.2. Equipamentos	14
2.3. Métodos	14
2.3.1. Preparação de Partículas de PMMA e PMMA/LEV por evaporação do solvente após dupla emulsificação (DESE)	14
2.3.2. Preparação de Partículas de PMMA e PMMA/LEV por evaporação do solvente após dupla emulsificação (DESE) por <i>downscale</i>	15
2.3.3. Determinação do rendimento do processo	15
2.3.4. Análise da distribuição de tamanhos das partículas por difracção laser	15
2.3.5. Determinação do Potencial Zeta das partículas	16
2.3.6. Caracterização da morfologia das partículas	16
2.3.7. Eficiência de encapsulação e capacidade de carga	16
2.3.8. Ensaio de libertação	17

3. Resultados e Discussão	18
3.1. Rendimento de Produção das Partículas de PMMA	18
3.2. Análise da distribuição de tamanhos das partículas	20
3.3. Determinação do Potencial Zeta das partículas	22
3.4. Caracterização da morfologia das partículas	23
3.5. Eficiência de encapsulação e <i>Drug loading</i> Osteomielite	24
3.6. Ensaios de libertação <i>in vitro</i>	26
4. Execução Financeira	27
5. Conclusões	28
6. Bibliografia	29
7. Agradecimentos	32

Lista de abreviaturas

a/o/a	água/óleo/água
DCM	Diclorometano
DDS	<i>Drug delivery system</i>
DESE	Dupla emulsificação com evaporação do solvente
DL	<i>Drug loading</i>
DS	<i>Downscale</i>
EE	Eficiência de Encapsulação
ESE	Emulsificação com evaporação do solvente
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LEV	Levofloxacina
MIC	Concentração mínima inibitória
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NaOH	Hidróxido de sódio
NMR	Ressonância magnética nuclear
PBS	Tampão fosfato
PMMA	Pol(metil metacrilato)
PVA	Álcool polivinílico
PZ	Potencial Zeta
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Microscopia electrónica de varrimento

Índice de Figuras

Figura 1.1.	Estrutura química do PMMA	10
Figura 1.2.	Estrutura química da LEV	11
Figura 2.1.	Representação gráfica da regressão linear correspondente à curva de calibração da LEV obtida por UV a 286 nm	17
Figura 2.2.	Representação gráfica da regressão linear correspondente à curva de calibração da LEV obtida por HPLC	18
Figura 3.1.	Distribuição de tamanhos do lote LC (10%) e do lote DS 10%	22
Figura 3.2.	Fotografias SEM de partículas de PMMA: (a) LC (10%) (2000×) e (b) LC (10%) (7000×)	23
Figura 3.3.	Perfil de Libertação <i>in vitro</i> da LEV (n=2) em %LEV libertada	26
Figura 3.4.	Perfil de Libertação <i>in vitro</i> da LEV (n=2) em µg/mL de LEV	26

Índice de Tabelas

Tabela 2.1.	Resumo descritivo dos reagentes utilizados	13
Tabela 2.2.	Resumo descritivo do equipamento utilizados	14
Tabela 3.1.	Rendimento da produção de partículas de PMMA por <i>downscale</i>	20
Tabela 3.2.	Distribuição dos tamanhos das partículas de PMMA expressos em diâmetro médio de volume \pm desvio padrão para 0,1; 0,5 e 0,9 da população de partículas	21
Tabela 3.3.	Potencial Zeta (PZ) (mV) dos lotes produzidos pelo método convencional	22
Tabela 3.4.	Potencial Zeta (PZ) (mV) dos lotes produzidos por <i>downscale</i>	23
Tabela 3.5.	<i>Drug Loading</i> (DL) e Eficiência de Encapsulação (EE) de partículas de PMMA com LEV preparadas pelo método convencional	25
Tabela 3.6.	<i>Drug Loading</i> e Eficiência de Encapsulação de partículas de PMMA com LEV preparadas por <i>downscale</i>	25
Tabela 4.1.	Resumo da execução financeira do projecto	27

1. Introdução e Objectivos

1.1. Introdução

1.1.1. Osteomielite

A osteomielite é uma doença inflamatória do osso causada pela infecção deste tecido, levando a necrose e destruição, com uma incidência superior a 25% após fracturas (Lew et al., 2004). Afecta indivíduos de várias faixas etárias, envolve qualquer tipo de osso e pode tornar-se uma doença crónica e causar morbidade contínua (Trampuz et al., 2008).

O tratamento desta patologia é particularmente complicado quando se formam biofilmes de bactérias multiresistentes (Lew et al., 2004; Trampuz et al., 2008). As bactérias *Staphylococcus aureus* são a principal causa microbiana responsável pelo desenvolvimento de osteomielite em mais de 50% dos casos (Trampuz et al., 2008), sendo que o *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) é extremamente comum (Rouse et al., 2006). O tratamento da infecção óssea envolve principalmente técnicas cirúrgicas de debridamento, remoção de corpos estranhos e antibioterapia (Schollossberg et al., 1988). Normalmente levada a cabo com antibióticos por administração intravenosa durante 3 semanas, seguida de 3 semanas com administração de antibióticos por via oral. Contudo, apesar de uma terapêutica tão intensiva, as taxas de recaídas são bastante significativas, havendo como consequências o compromisso da funcionalidade do osso em causa, podendo levar à necessidade de amputação em alguns casos (Campoccia et al., 2010).

Além disso, a necessidade de elevadas doses por via parentérica para atingir concentrações de fármaco com efectividade sobre a infecção, assim como a longa duração do tratamento, podem conduzir a toxicidade sistémica provocada pelo antibiótico (Price et al, 1998). Nesse sentido, é necessário planear estratégias alternativas para ultrapassar estas desvantagens. A terapêutica da osteomielite crónica com libertação local de agente antimicrobiano é uma nova abordagem que permitirá atingir concentrações elevadas no local da infecção sem, contudo, causar toxicidade sistémica (Nandi et al., 2009).

1.1.2. Sistemas de *Drug Delivery* (DDS) no tratamento da osteomielite

Tratamentos baseados na libertação local de antibiótico irão, à partida, apresentar um grande potencial nas estratégias de prevenção da infecção óssea. O grande objectivo ao recorrer a DDS é, não só conseguir que um composto biologicamente activo atinja um dado local infectado de forma controlada (tempo e taxa de libertação), mas também manter o nível de fármaco no organismo dentro da janela terapêutica. Além disso, de acordo com Coelho et al. (2010), é possível direccionar o fármaco para o tecido ósseo (*targeted drug delivery*) (Coelho et al., 2010).

O desenvolvimento de um DDS local ideal tem de ter em consideração quatro principais linhas orientadoras que se interrelacionam mutuamente quando um dado material é implantado no local contendo antibiótico: o tecido e a localização anatómica, o biomaterial como transportador, o fármaco a ser libertado, e a bactéria em questão (Campoccia et al., 2010).

1.1.2.1 O Poli(metilmetacrilato) (PMMA) como veículo

O Poli(metil metacrilato) (Figura 1.1.) faz parte do grupo dos poliacrilatos, sendo um dos principais candidatos como veículos no que toca a DDS aplicados ao osso, devido à sua biocompatibilidade e às suas características físicas e químicas (Lewis et al., 1997; Webb et al., 2007). O facto de ser não-degradável permite a manutenção de um bom suporte mecânico quando perante um extenso período de tempo. (Coelho et al., 2010; Shi et al., 2010).

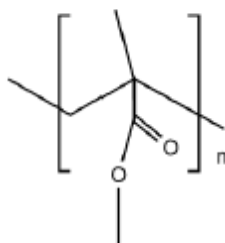


Figura 1.1. - Estrutura química do PMMA.

Em 1970, Buchholz e Engelbrecht introduziram o conceito de libertação local de um antimicrobiano através da encapsulação de gentamicina em PMMA para o tratamento e profilaxia das infecções das próteses articulares (Buchholz et al., 1970). Actualmente, o PMMA é usado sob diversas formas como DDS e a inibição da adesão microbiana com antibióticos encapsulados em PMMA tem sido utilizada como estratégia terapêutica na osteomielite crónica (Alonso et al., 2006; Coelho et al., 2010). Os agentes antimicrobianos incorporados directamente no PMMA e com um espectro adequado para as infecções ortopédicas incluem: cefazolina, ciprofloxacina, gatifloxacina, levofloxacina, linezolida e rifampicina (Alonso et al., 2006).

1.1.2.2. A Levofloxacina como fármaco libertado

A Levofloxacina (LEV, (-)-(S)-fluoro-0-metil-3 (metil-4-piperazinil-1) 10-oxo-7dihidro-2, 3-7H-pirido:1,2,3-de:benzoxazina-1, 4 ácido 6-carboxílico) (**Figura 1.2.**) é a forma-L activa da fluoroquinolona racémica ofloxacina (González et al., 2000; Presterl et al., 2001). O seu espectro de acção engloba microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, pela inibição da sua DNA girase, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*

cloacae, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como alguns anaeróbios (Presterl et al., 2001).

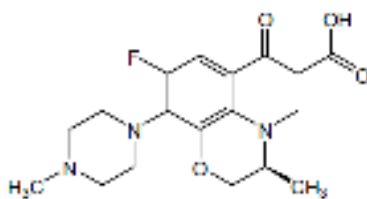


Figura 1.2. – Estrutura química da LEV.

Os grupos funcionais carboxilo e aminopiperazínico nas fluoroquinolonas podem encontrar-se carregados em soluções aquosas, dependendo do pH (Lambert et al., 2007). Portanto, é normalmente assumido que, em água, estas moléculas apresentam um comportamento zwitteriónico a pH próximo de 7. No entanto, é um facto que a LEV apresenta um carácter lipofílico intermédio, enquanto outras fluoroquinolonas são hidrofílicas (ex.: norfloxacin) ou, pelo contrário, fortemente lipofílicas (ex.: pefloxacin) (González et al., 2000).

1.1.3. Partículas de pequenas dimensões como sistema de libertação controlada

A utilização de partículas em DDS e a sua aplicabilidade depende da bioaceitação do polímero de transporte, que, por sua vez, é afectada pelo tamanho das partículas e pelas suas propriedades físico-químicas. Assim, o objectivo terapêutico, juntamente com estes parâmetros, irão influenciar a escolha adequada do polímero, tamanho ideal da partícula e o método de produção.

As micro e nanopartículas apresentam vantagens adicionais quando comparadas com outros veículos coloidais, como sejam a elevada estabilidade quando em contacto com fluidos biológicos e a grande capacidade de encapsulação de fármacos (Roney et al., 2005).

1.1.3.1. Preparação de micro e nanopartículas

A utilização da técnica usada para a produção de micro e nanopartículas depende da natureza do polímero a que se aplica e do fármaco encapsulado, do tipo de sistema de libertação que se pretende e da duração pretendida para a terapêutica.

Para obter partículas com as características físico-químicas desejadas, com a melhor eficiência de encapsulação e as propriedades de libertação do fármaco ideais, devem ter-se em consideração a natureza e solubilidade do fármaco, o tipo de polímero e a sua concentração, o seu peso molecular, a composição dos copolímeros, as concentrações de *drug loading*, o tipo de solvente orgânico e o seu volume, o volume da fase aquosa, o pH, a temperatura, os tipos de tensioactivos utilizados e a velocidade de agitação.

O comportamento *in vitro* e *in vivo* por parte das micro e nanopartículas é influenciado pela suas diversas propriedades: tamanho das partículas, e respectiva distribuição, morfologia da superfície, porosidade, adesão da superfície, potencial zeta e estabilidade do fármaco, assim como a sua EE. Além disso, é de ter em conta a degradação/erosão da superfície, a difusão do fármaco, a cinética de libertação e as propriedades hemodinâmicas das partículas.

As partículas podem ser preparadas ou por dispersão do polímero previamente formado ou pela polimerização *in situ* dos monómeros.

A técnica clássica de emulsificação com evaporação do solvente (ESE) laborado por Bodmeier e McGinity (1987), Ogawa et al. (1988), Jeffery et al. (1991), Iwata e McGinity (1992), assim como diferentes variações recentes, são geralmente utilizadas para encapsular diversas substâncias, designadamente proteínas (Alonso, 1996; Soppimath et al., 2001).

O método ESE envolve duas etapas. A primeira requer que se emulsifique a solução que contém o polímero numa fase aquosa (ESSE simples) ou que se proceda a uma dupla emulsão, por exemplo a/o/a (ESE duplo - DESE). Posteriormente, no segundo passo, o solvente da solução que contém o polímero é evaporado, induzindo a precipitação do polímero sob a forma de partículas esféricas (Reis et al., 2006). A primeira etapa tem especial importância na determinação do tamanho das partículas, enquanto a segunda se relaciona com a morfologia das mesmas e tem uma influência importante na encapsulação do fármaco e no seu perfil de libertação (Rosca et al., 2004).

O polímero é dissolvido em solventes orgânicos voláteis e imiscíveis como a água, o clorofórmio ou o diclorometano (DCM) (Wu, 1995). O fármaco, contido na fase aquosa com um agente tensioactivo (como por exemplo o polivinil álcool (PVA) ou polisorbato 80), é então adicionado a esta solução de polímero e realiza-se o processo de emulsificação utilizando homogeneização de alta energia de forma a obter uma emulsão. O agente tensioactivo estabiliza as gotículas de pequenas dimensões presentes na emulsão, prevenindo a sua coalescência. Para uma estabilização efectiva, as moléculas do tensioactivo terão de revestir a área de interface água/óleo de todas as gotículas (Budhian et al., 2007). O polímero precipita sobre a forma de micro ou nanoesferas em que se encontra disperso o fármaco. O solvente é evaporado pelo aumento da temperatura da formulação ou por agitação contínua (Reis et al., 2006).

As partículas podem ser obtidas posteriormente por centrifugação ou filtração, lavadas e por fim liofilizadas.

A liofilização aparenta ser um processo que confere grande estabilidade às partículas. Envolve o congelamento da suspensão e a subsequente eliminação do conteúdo em água, por sublimação a pressão reduzida. Este último passo é o mais agressivo do processo, especialmente quando estamos perante sistemas coloidais. Assim, é importante melhorar a resistência das

partículas pela adição de um crioprotector para evitar a alteração da suspensão, para assegurar a redispersibilidade, permitir a vitrificação da suspensão durante o arrefecimento ou para evitar a cristalização da suspensão líquida. (Budhian et al., 2007).

1.2. Objectivos

Neste trabalho pretendemos incorporar LEV em partículas, mantendo a sua actividade antibacteriana e produzir um DDS sustentável que poderá ser aplicado posteriormente no tratamento da osteomielite.

Os principais objectivos do estudo são:

- 1) Incorporar LEV em PMMA pelo técnica de DESE, utilizando os métodos convencional e de *downscale* e,
 - caracterizar as propriedades físico-químicas das partículas (morfologia, tamanho, potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulação (EE), *drug loading*(DL) e rendimento de produção)
 - avaliar o perfil de libertação *in vitro* release
 - comparar os resultados obtidos para ambos os métodos
- 2) Investigar os valores de EE e DL para diversas concentrações de LEV presentes na formulação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados são apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Resumo descritivo dos reagentes utilizados.

Reagentes	Fornecedor	Especificações
Água	Laboratório Tecnologia	Purificada (sistema Milli Elix 3)
DCM	Fisher Scientific (UK)	p.a.
LEV em pó	Sigma Aldrich Co. (Espanha)	pó inodoro, ligeiramente amarelo; p.f. 218-220°C; solúvel em etanol, clorofórmio e em água/etanol. Kp (octanol:agua) = 0,6; PM 361,37
NaOH <i>pellets</i> *	Eka Chemical AB (Bohus, Noruega)	PM 40,0
PMMA em pó	Sigma Aldrich Co. (Espanha)	viscosidade reduzida 130–140 cm ³ g ⁻¹ , 20 °C; densidade 1,2 g mL ⁻¹ , 25°C; PM 350 000
PVA	Sigma Aldrich Co. (Espanha)	PM 13000-23000
Sacarose	Laboratórios HiMedia (India)	PM 342,3

*(NaOH) *pellets* usado para preparar uma solução. aq. 5N, para alcalinizar soluções; p.a. – pró-análise.

2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados são apresentados na tabela 2.2.

Outros materiais de laboratório usados foram seringas, pipetas de Pasteur, pipetas automáticas VWRTM (100, 1000 e 5000 μ L), *ependorfs*[®] (1,5 e 2 mL), tubos *falcon* 12 mL), espátulas, gobelés, agitadores magnéticos, *vials* para *freeze drying*, tubos de centrífuga de polipropileno, *cuvettes* de quartzo 2 mL e luvas de latex Romed[®].

Tabela 2.2 – Resumo descritivo dos equipamentos utilizados.

Equipamento	Características
Balança analítica	Kern, modelo ABT220
Balança de precisão	Kern, Modelo EG220-3NM
Banho com agitação	Memmert water bath; Modelo: WNB22
Centrífuga	Sigma Sartorius 1-15pK
Centrífuga de alta velocidade	Allegra 64R (Beckman Coulter Inc., USA)
Homogeneizador	Ultra-turrax T10 (IKA Laboratories, UK)
Homogeneizador	Ultra-turrax T10 (IKA Laboratories, UK)
HPLC	Merck Hitachi LaChrom; bomba L-7100; Detector Diode Array L-7450 A; Autosampler L-7200; software HSM
Liofilizador	Christ Alpha 1-4 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany)
Medidor de Tamanho de Partículas	Malvern ZetaSizer (Malvern Instruments, UK)
Placa de Agitação Multiposições	Komet Multipoint 15, Variomag, USA
Potenciômetro	pH 730, WTW

2.3. Métodos

2.3.1. Preparação de Partículas de PMMA e PMMA/LEV por evaporação do solvente após dupla emulsificação (DESE) – método convencional

Dissolveram-se 250 mg de PMMA em 5 mL de Diclorometano (DCM). A LEV foi dissolvida em 1 mL solução aquosa de PVA 10% (*m/V*) e sujeita a agitação no vórtex por cerca de 5 s. A solução aquosa de LEV foi transferida gota a gota para a solução de PMMA/DCM e emulsificada por homogeneização usando Ultra-Turrax durante 3 min a 29 900 rpm (primeira emulsão a_1/o). Esta por sua vez foi adicionada a 30 mL de solução aquosa de PVA 1,25% (*m/V*) e homogeneizada durante 7 min a 10000 rpm, usando a misturadora.

A emulsão resultante ($a_1/o/a_2$) foi agitada magneticamente à temperatura ambiente durante 2h.

As partículas de PMMA foram recolhidas por centrifugação (22 891 g, 20 min, 16°C) e lavadas uma vez com 1 mL de solução de sacarose 10% (m/V) e 10 mL de água purificada.

Os sobrenadantes foram recolhidos após cada centrifugação e congelados a -20°C para posterior análise.

O *pellet* final foi ressuspensão com 5 mL de uma solução de sacarose a 0,5% (m/m_{PMMA}) e congelado para posterior liofilização.

As partículas vazias foram preparadas da mesma forma, apenas não se dissolveu LEV em 1 mL de solução aquosa de PVA 10%. No entanto, este volume de solução foi adicionado na formulação.

2.3.2. Preparação de Partículas de PMMA e PMMA/LEV por evaporação do solvente após dupla emulsificação (DESE) por *downscale*

As partículas foram preparadas recorrendo precisamente ao mesmo método, porém, as quantidades e volumes utilizados foram a metade dos utilizados no método inicial. Além disso, a LEV em solução aquosa de PVA a 10% (m/V) foi adicionada de uma só vez ao PMMA dissolvido em DCM e após obtenção da primeira emulsão, foi-lhe adicionada solução aquosa de PVA 1,25% (m/V) para a posterior emulsificação e obtenção da emulsão dupla.

2.3.3. Determinação do rendimento do processo

O rendimento do processo foi determinado através da massa de partículas liofilizadas obtidas, em *vials* previamente tarados. Considerou-se que a massa teórica de partículas correspondia ao somatório das massas de PMMA, LEV e sacarose pesadas em cada formulação.

2.3.4. Análise da distribuição de tamanhos das partículas por difracção laser

Este método assenta na premissa de que quanto menor for o tamanho das partículas em suspensão, maior será o seu movimento browniano. Assim, quando as partículas em suspensão são expostas a uma luz LASER, a taxa de flutuação da intensidade da mesma será tanto maior quanto menores forem as partículas.

De cada lote de partículas foi retirada uma amostra, que foi suspensa em água purificada na câmara da amostra.

2.3.5. Determinação do Potencial Zeta das partículas

A determinação do Potencial Zeta foi levada a cabo utilizando o equipamento Malvern ZetaSizer (Malvern Instruments, UK), através da dispersão das partículas em água ultrapurificada. Os resultados do PZ (mV) foram obtidos pela média de três medições executadas \pm desvio padrão.

2.3.6. Caracterização da morfologia das partículas

A morfologia da superfície das partículas foi analisada e fotografada utilizando *scanning electron microscopy* (SEM). As partículas sob a forma de pó seco foram colocadas na lâmina da amostra com o auxílio de fita-cola dupla e revestidas com uma película de ouro (20 nm). O revestimento foi realizado a pressão reduzida (0,001 torr) durante 5 min para aumentar a condutividade, usando um pulverizador iônico.

2.3.7. Eficiência de encapsulação e capacidade de carga

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada indirectamente, subtraindo à quantidade de LEV pesada inicialmente, a quantidade total de LEV presente nos sobrenadantes após as duas centrifugações, que foram sujeitos a diluição adequada antes de se proceder à análise.

A quantidade de LEV foi medida recorrendo a espectrofotometria UV. A absorvância foi determinada no comprimento de onda de máxima absorção 286 nm. A curva de calibração foi obtida com soluções padrão aquosas de LEV de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tendo sido obtida uma equação de regressão linear ($\text{Absorvância} = 0,066[\text{LEV}] - 0,0323$) com um coeficiente de relação elevado ($R^2 = 0,995$), (Figura 2.1). Com a absorvância das várias amostras foi possível calcular a quantidade de antibiótico que não foi incorporado nas partículas, sendo que se fez uma leitura em triplicado para cada uma.

A EE foi expressa como a percentagem de LEV encapsulada nas partículas de PMMA em relação à quantidade inicial desta, usada na formulação das partículas:

$$EE / \% = 100 \times (M_{\text{inicial LEV}} - M_{\text{LEV no sobrenadante}}) / M_{\text{inicial LEV}} \quad \text{Equação 2}$$

em que $M_{\text{inicial LEV}}$ representa a quantidade de LEV usada inicialmente para o ensaio e $M_{\text{LEV no sobrenadante}}$ a quantidade de fármaco não encapsulado, presente no sobrenadante após as duas centrifugações e conseqüente separação das partículas.

O parâmetro *Drug Loading* (DL) foi determinado através da razão entre a quantidade de LEV encapsulada e a quantidade total de partículas produzidas:

$$DL / \% = 100 \times (M_{\text{inicial LEV}} - M_{\text{LEV no sobranadante}}) / M_{\text{partículas}} \quad \text{Equação 3}$$

Em que $M_{\text{partículas}}$ é a massa de partículas com a Levofloxacina incorporada.

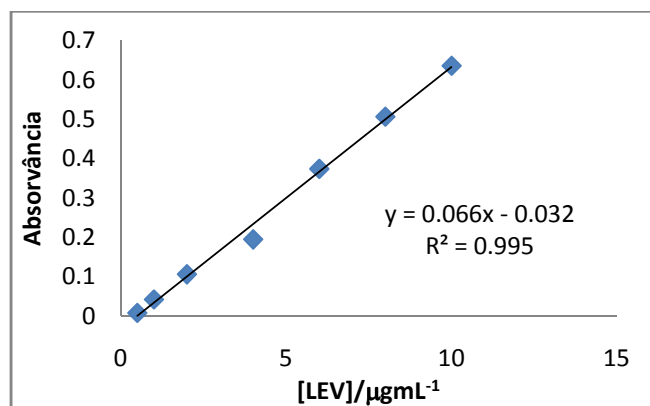


Figura 2.1. - Representação gráfica da regressão linear correspondente à curva de calibração da LEV obtida por UV a 286 nm.

2.3.8. Ensaios de libertação

Foram retirados 10 mg de partículas de PMMA e dispersas em tubos de propileno contendo 10 mL PBS (pH = 7,4) e solução 0,05% de tween 20. Os tubos foram colocados num banho de água com agitação (Memmert water bath; Modelo: WNB22) a 37 °C e com agitação horizontal (130 rpm).

Em tempos pré-estabelecidos de 0 min; 30 min; 1h; 2h; 4h; 6h; 24h; 30h; 72h; 1 e 2 semanas foram recolhidas amostras, posteriormente centrifugadas a 10000 rpm (9167g) durante 10 min a 4 °C, para posterior doseamento da LEV libertada, por HPLC.

Determinação da LEV nos Ensaios de libertação

A quantidade de LEV obtida nos diversos lotes pelo ensaio de libertação foi determinada recorrendo a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), detector no comprimento de onda de máxima absorção 294 nm. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de: Acetonitrilo:H₂O(0,3% TEA; pH=3 com ác. fosfórico), (14:86,v/v) filtrada e desgaseificada a um fluxo de 1,5mL/min.

A curva de calibração foi obtida com soluções padrão aquosas de LEV de 0,6; 0,7; 1,0; 3,0; 8 µg/mL, Utilizou-se o método de Padrão Interno, tendo sido usada a ciprofloxacina para o

efeito. Traçou-se a curva razão (Área LEV/Área PI) em função da concentração dos padrões ($\mu\text{g/mL}$) e obteve-se a seguinte recta (Área Lev/Área PI) = $0,7408 [\text{LEV}] - 0,1391$, com um coeficiente de relação elevado ($R^2 = 0,9997$), (Figura 2.2). Com a área obtida das várias amostras e recorrendo novamente ao método de padrão interno, foi então possível determinar a quantidade de LEV libertada em cada tempo de recolha.

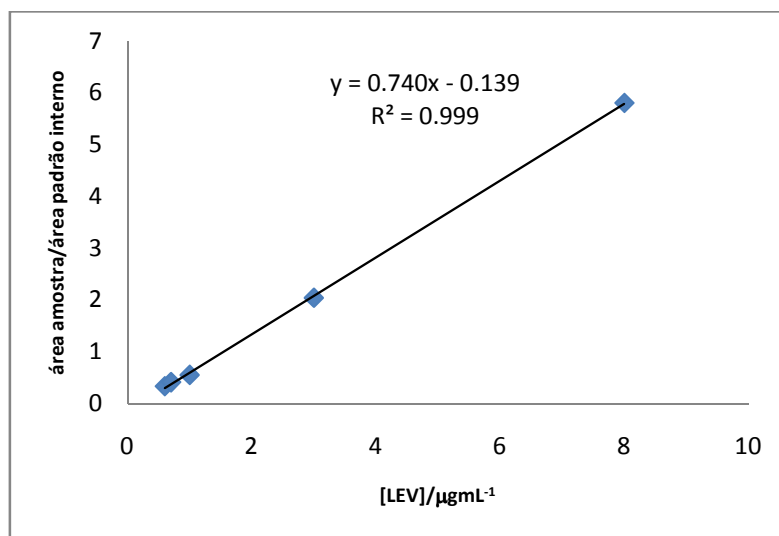


Figura 2.2. - Representação gráfica da regressão linear correspondente à curva de calibração da LEV obtida por HPLC.

3. Resultados e Discussão

A utilização do PMMA como polímero biocompatível na preparação de nano/micropartículas foi descrito pela primeira vez na década de 70 (Buchloz et al., 1970), não tendo vindo, no entanto, a ser muito usado pelo facto de não ser biodegradável. Todavia, dado a sua biocompatibilidade, o PMMA apresenta-se ainda como um relevante biomaterial, com crescente interesse como *drug carrier* (Shi et al., 2010; Coelho et al., 2010).

As partículas de PMMA foram preparadas à temperatura ambiente pelo método ESE dupla emulsão água-óleo-em-água (a/o/a). A LEV e o PMMA foram dissolvidos separadamente numa solução aquosa de PVA e em DCM, respectivamente, sendo posteriormente emulsificadas sob homogeneização, de modo a formar a primeira emulsão a1/o. Por sua vez, esta emulsão foi adicionada a uma segunda fase aquosa de PVA, de modo a formar a emulsão a1/oa2. O DCM foi deixado evaporar lentamente de forma a obter partículas de PMMA em suspensão. Este método baseia-se na emulsificação de uma fase orgânica numa fase aquosa, contendo tensoactivo.

Durante o processo, a solução do polímero dispersa-se na fase aquosa, devido à tensão produzida pelo homogeneizador, dando origem à primeira emulsão. Seguidamente, esta emulsão

é adicionada a uma nova fase externa aquosa, na presença de um agente tensioactivo, dando origem à emulsão final. Após este processo, o solvente é evaporado, resultando na precipitação do polímero sob a forma de partículas. O PMMA, polímero hidrofóbico, é solúvel em DCM e não apresenta solubilidade em água, o que favorece a precipitação das gotículas em emulsão, após evaporação do solvente orgânico (Bettencourt et al., 2010). Dada a elevada volatilidade do DCM, este solvente irá apresentar índices residuais muito reduzidos após a sua evaporação durante a preparação das partículas. O DCM é um solvente de Classe 2, de acordo com a classificação da *International Conference on Harmonization (ICH)*, pelo que a concentração residual máxima permitida será de 600 ppm (EMA 2006). Efectivamente em estudos prévios realizados por Florindo et al. (2008), a quantidade residual de DCM presente em partículas poliméricas após liofilização, determinada por ressonância nuclear magnética (NMR), revelou-se abaixo do limite de segurança.

Neste procedimento, após a evaporação do solvente, a suspensão obtida foi centrifugada e lavada de forma a remover o PVA em excesso e a LEV não encapsulada. Foi adicionada sacarose como crioprotector para aumentar a resistência das partículas à liofilização.

A solução aquosa de PVA utilizada actua como tensioactivo, estabilizando as gotículas da emulsão e evitando a sua coalescência e conseqüente quebra da emulsão.

A concentração de PVA necessária para estabilizar a primeira emulsão a1/o é superior (10%) em relação à utilizada como fase externa (1,25%), uma vez que as partículas de menores dimensões formadas, através da homogeneização pelo Ultra-Turrax, aumentam a área de superfície total específica e, conseqüentemente, a quantidade de PVA necessária (Budhian et al., 2007).

Neste estudo, uma vez que a obtenção de partículas inferior a 10 nm não era uma prioridade, recorreu-se ao homogeneizador, que é, à partida recomendado quando se pretende partículas de tamanho superior (>300 nm), o tamanho não é muito crítico e o objectivo é maximizar a concentração de fármaco nas partículas (Budhian et al., 2007).

3.1. Rendimento de Produção das Partículas de PMMA

Os rendimentos de produção das partículas produzidas por *downscale* revelaram que, provavelmente, não terá havido uma liofilização adequada em alguns lotes, dados os valores superiores a 100%, nomeadamente nos DS 5% 1 e 2 e DS 7,5% 2. Quanto aos lotes onde se observaram valores de rendimento menores, isto poderá dever-se a eventuais perdas inerentes à própria técnica de dupla emulsão para a produção de partículas. (Tabela 3.1.).

Não pôde calcular-se o rendimento das partículas preparadas pelo método inicial, visto que não foram tarados os recipientes contendo as partículas finais e, além disso, foram retiradas

amostras desses mesmos frascos, para a realização de ensaios, sem que se registasse o valor da massa retirada.

Tabela 3.1. – Rendimento da produção de partículas de PMMA por *downscale*.

Lote		Rendimento / %
DS vazias	1	79,6
DS vazias	2	63,7
Média ± DP		71,7 ± 11,3
DS 2,5%	1	78,5
DS 2,5%	2	45,8
Média ± DP		62,2 ± 23,1
DS 5%	1	118,2
DS 5%	2	121,2
Média ± DP		119,7 ± 2,1
DS 7,5%	1	84,8
DS 7,5%	2	131,7
Média ± DP		108,2± 33,2
DS 10%	1	82,9
DS 10%	2	91,8
Média ± DP		87,3 ± 6,3
DS 12,5%	1	95,3
DS 12,5%	2	89,3
Média ± DP		92,3± 4,3
DS 15%	1	51,9
DS 15%	2	75,37
Média ± DP		63,6 ± 16,6

3.2. Análise da distribuição de tamanhos das partículas

Neste estudo, a distribuição do tamanho das partículas assenta na gama micrométrica (Tabela 3.2.), assegurando uma elevada superfície específica o que poderá contribuir para um bom perfil de libertação do fármaco. Os tamanhos e a sua distribuição têm um impacto importante nas propriedades físico-químicas, eficácia óptima e toxicidade (Mohanraj et al., 2006).

Tabela 3.2. – Distribuição dos tamanhos das partículas de PMMA expressos em diâmetro médio de volume \pm desvio padrão para 0,1; 0,5 e 0,9 da população de partículas.

	Lote	d (0,1) / μm	d (0,5) / μm	d (0,9) / μm
Método convencional	LA (0%)	1,281 \pm 0,001	2,190 \pm 0,002	3,592 \pm 0,016
	LE (2,5%)	1,379 \pm 0,001	2,379 \pm 0,001	3,972 \pm 0,001
	LB (5%)	1,383 \pm 0,003	2,251 \pm 0,006	3,585 \pm 0,016
	LF (7,5%)	1,379 \pm 0,001	2,378 \pm 0,001	3,968 \pm 0,001
	LC (10%)	1,355 \pm 0,02	2,200 \pm 0,034	3,476 \pm 0,047
	LG (12,5%)	1,388 \pm 0,001	2,492 \pm 0,001	4,317 \pm 0,003
	LD (15%)	1,156 \pm 0,001	1,922 \pm 0,001	3,106 \pm 0,001
Downscale	DS vazias 1	1,615 \pm 0,008	6,062 \pm 0,077	50,472 \pm 0,89
	DS vazias 2	1,686 \pm 0,007	5,195 \pm 0,064	49,990 \pm 2,106
	Média \pm DP*	1,651 \pm 0,039	5,630 \pm 0,479	50,258 \pm 1,463
	DS 2,5% 1	1,756 \pm 0,044	3,406 \pm 0,061	6,096 \pm 0,089
	DS 2,5% 2	1,735 \pm 0,002	3,368 \pm 0,015	6,033 \pm 0,081
	Média \pm DP*	1,746 \pm 0,030	3,387 \pm 0,044	6,063 \pm 0,066
	DS 5% 1	1,492 \pm 0,014	4,993 \pm 0,116	52,058 \pm 0,884
	DS 5% 2	2,03 \pm 0,035	5,367 \pm 0,022	26,691 \pm 0,741
	Média \pm DP*	1,741 \pm 0,273	5,180 \pm 0,094	3,937 \pm 16,317
	DS 7,5% 1	1,706 \pm 0,002	3,338 \pm 0,001	5,977 \pm 0,0035
	DS 7,5% 2	1,777 \pm 0,001	4,819 \pm 0,005	32,643 \pm 0,101
	Média \pm DP*	1,741 \pm 0,039	4,079 \pm 0,811	19,310 \pm 14,606
	DS 10% 1	1,687 \pm 0,167	5,103 \pm 0,100	27,746 \pm 0,984
	DS 10% 2	2,017 \pm 0,005	5,962 \pm 0,058	45,633 \pm 1,129
	Média \pm DP*	1,856 \pm 0,206	5,531 \pm 0,479	36,690 \pm 9,850
	DS 12,5% 1	1,906 \pm 0,004	7,175 \pm 0,013	34,788 \pm 0,242
	DS 12,5% 2	2,03 \pm 0,012	7,005 \pm 0,170	34,755 \pm 0,792
Média \pm DP*	1,968 \pm 0,069	7,092 \pm 0,142	34,776 \pm 0,524	
DS 15% 1	1,660 \pm 0,019	4,058 \pm 0,061	8,008 \pm 0,398	
DS 15% 2	1,448 \pm 0,001	3,065 \pm 0,003	5,478 \pm 0,007	
Média \pm DP*	1,554 \pm 0,117	3,562 \pm 0,545	6,757 \pm 1,424	

*Média \pm desvio padrão, n=6 (considerando os dois lotes de igual formulação); os restantes valores correspondem à Média \pm desvio padrão, n=3 (cada amostra lida 3 vezes pelo equipamento).

As partículas produzidas por *downscale*, comparativamente às preparadas pelo método convencional, apresentam tamanhos semelhantes para as populações de menores dimensões. Todavia, apresentam uma maior dispersão, visto coexistirem com partículas de grandes dimensões, ao contrário do que acontece no que toca ao método convencional (Tabela 3.2.).

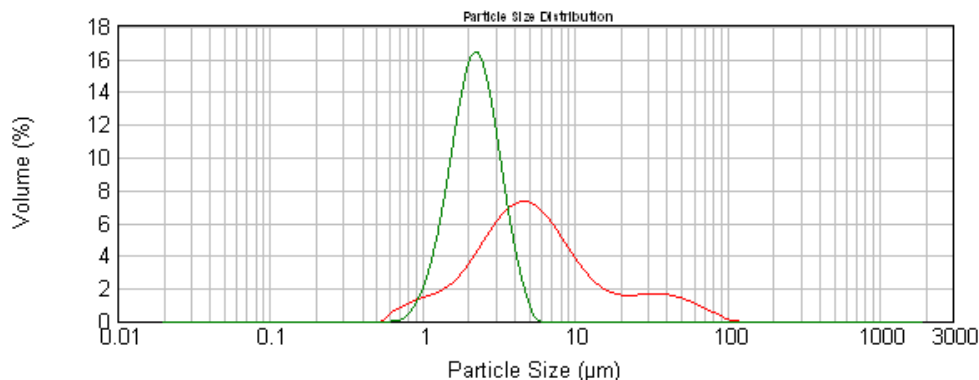


Figura 3.1. – Distribuição de tamanhos do lote LC (10%) (a verde) e do lote DS 10% 1 (a vermelho).

Comparando dois lotes de igual conteúdo em LEV (Figura 3.1.), mas preparados um por *downscale* (a vermelho) e outro pelo método inicial (a verde), observa-se que, enquanto a última população de partículas é monodispersa, a primeira apresenta, além de partículas ligeiramente maiores, uma dispersão da população, nomeadamente na zona dos 30/40 µm, que poderão corresponder aos agregados de partículas já anteriormente citados.

3.3. Determinação do Potencial Zeta das partículas

O resumo dos valores de Potencial Zeta obtidos para os diferentes lotes em estudo encontram-se descritos na Tabela 3.3 e 3.4.

Verifica-se que não ocorrem diferenças substanciais entre os lotes produzidos pelos dois métodos. Dados tratar-se de valores negativos, infere-se que a carga da superfície das partículas será negativa, devido à presença do polímero. Por norma, o PZ consiste num índice que revela a estabilidade das partículas e, na maioria das vezes, quanto maior o seu valor absoluto, maior será a carga à superfície, conduzido a fortes interações repulsivas entre as partículas dispersas e a uma maior estabilidade e uniformidade de tamanhos (Feng and Huang, 2001).

Tabela 3.3. – Potencial Zeta (mV) dos lotes produzidos pelo método convencional.

Lote	Potencial Zeta / mV
LA (0%)	-29,8 ± 1,3
LE (2,5%)	-28,8 ± 4,3
LB (5%)	-33,3 ± 0,3
LF (7,5%)	31,3 ± 0,3
LC (10%)	-33,2 ± 0,4
LG (12,5%)	-29,5 ± 0,2
LD (15%)	-34,7 ± 0,4

Tabela 3.4. – Potencial Zeta (mV) dos lotes produzidos por *downscale*.

Lote	Potencial Zeta / mV
DS vazias 1	-29,9±2,1
DS vazias 2	-26,9±10,0
Média ± DP	-28,4 ± 2,12
DS 2,5% 1	-29,9±2,2
DS 2,5% 2	-32,2±1,2
Média ± DP	-29,9±1,63
DS 5% 1	-25,7±2,3
DS 5% 2	-27,0±1,3
Média ± DP	-26,35±0,92
DS 7,5% 1	-30,2±1,8
DS 7,5% 2	-31,7±1,7
Média ± DP	-30,95±1,06
DS 10% 1	-29,7±3,3
DS 10% 2	-28,3±1,3
Média ± DP	-29,0±0,99
DS 12,5% 1	-24,9±0,8
DS 12,5% 2	-30,1±0,8
Média ± DP	-27,5 ± 3,68
DS 15% 1	-34,1±0,3
DS 15% 2	-33,1±1,1
Média ± DP	-33,6± 0,71

Nota: Os resultados do PZ (mV) foram obtidos pela média de três medições executadas ± desvio padrão. Média ± DP corresponde à média e desvio padrão dos dois valores obtidos para cada um dos lotes considerados.

3.4. Caracterização da morfologia das partículas

A Figura 3.2. mostra que as partículas produzidas convencionalmente são esféricas, com uma superfície regular de polímero, como era esperado.

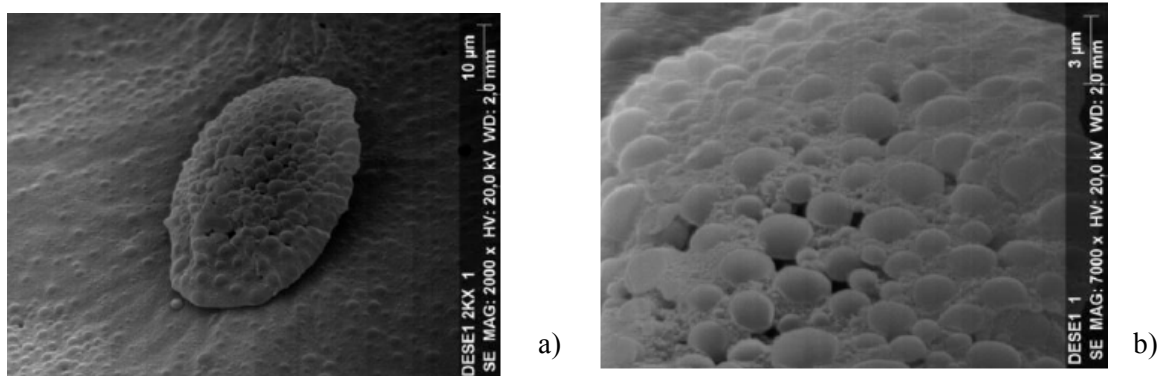


Figura 3.2. – Fotografias SEM de partículas de PMMA: (a) LC (10%) (2000×) e (b) LC (10%) (7000×).

De acordo com Dhana et al. (2010), a superfície das partículas produzidas depende da saturação da solução de polímero. Nestas formulações o polímero encontrava-se completamente saturado na solução e a taxa de difusão do solvente foi mínima, levando à formação de partículas regulares e esféricas, sem evidências de colapso. A superfície regular é um indicador positivo da qualidade das partículas.

3.5. Eficiência de encapsulação e *Drug loading*

A EE é usada para indicar a quantidade de fármaco encapsulada na matriz polimérica e é determinada a partir da razão entre a massa de fármaco encapsulada e a que foi adicionada inicialmente na formulação.

Em muitas situações, quando se recorre ao PMMA como polímero, o método directo de quantificação não é adequado (Sheskey et al., 1994), pelo que a quantidade de fármaco encapsulado foi determinada indirectamente pela subtracção da LEV presente no sobrenadante após a centrifugação à quantidade de LEV inicial. O DL foi determinado pela razão da massa de fármaco encapsulada em relação à quantidade de partículas produzidas.

O método DESE utilizado é frequentemente aplicado na encapsulação de fármacos solúveis em água, mas não de fármacos solúveis no solvente, uma vez que a fase aquosa interna funciona como reservatório na qual o fármaco está dissolvido, enquanto a fase aquosa serve de barreira de dissolução, evitando a saída de fármaco para a fase aquosa externa (Cheow et al., 2010). Além disso, a inclusão de tensioactivo na fase aquosa interna demonstrou melhorar a estabilidade da primeira emulsão (a1/o) e aumentar o tamanho dos poros aquosos das partículas, resultando numa EE e num DL superiores (Mohanraj et al., 2006).

Obtiveram-se melhores resultados quer de DL quer de EE, pelo método convencional, sendo que a maior diferença se prende com o último parâmetro (Tabela 3.5. e Tabela 3.6.). Lembrando o facto das populações produzidas pelo método convencional serem mais homogéneas, poderá ter ocorrido uma melhor incorporação do fármaco nestas partículas, o que não terá acontecido tão eficazmente nas partículas obtidas por *downscale*. Além disso, verificou-se que para baixas concentrações de LEV ocorreu uma fraca encapsulação em ambos os métodos, tendo os melhores resultados de DL sido obtidos para o lote com 10% de LEV, para o método convencional, e os valores mais elevados de EE para os lotes de 7,5% em LEV. Para o método *downscale* tanto o melhor valor de DL como de EE foi observado para o DS 12,5%.

Tabela 3.5. – *Drug Loading* (DL) e Eficiência de Encapsulação (EE) de partículas de PMMA com LEV preparadas pelo método convencional.

Lotes	DL %	EE %
Lote A (vazias)	-	-
Lote E (2,5%)	0,09	0,00
Lote B (5%)	2,10	40,90
Lote F (7,5%)	3,72	50,01
Lote C (10%)	4,42	42,90
Lote G (12,5%)	1,89	15,30
Lote D (15%)	3,69	24,67

Nota: DL e EE resultam do registo de n=3 leituras da Absorvância de amostras dos sobrenadantes das formulações respectivas.

Tabela 3.6. – *Drug Loading* (DL) e Eficiência de Encapsulação (EE) de partículas de PMMA com LEV preparadas por *downscale*.

Lotes	DL %	EE %
DS 1 vazias	-	-
DS 2 vazias	-	-
Média ± DP	-	-
DS 2,5% 1	0,17	5,59
DS 2,5% 2	0,00	0,00
Média ± DP	0,087 ± 0,12	2,80 ± 3,96
DS 5% 1	0,47	9,66
DS 5% 2	0,89	18,38
Média ± DP	0,68 ± 0,30	14,02 ± 6,17
DS 7,5% 1	1,91	26,71
DS 7,5% 2	1,58	20,26
Média ± DP	1,75 ± 0,23	23,49 ± 4,56
DS 10% 1	1,54	15,12
DS 10% 2	2,01	20,42
Média ± DP	1,77 ± 0,33	17,77 ± 3,75
DS 12,5% 1	3,82	33,38
DS 12,5% 2	2,15	15,86
Média ± DP	2,99 ± 1,18	24,62 ± 12,39
DS 15% 1	1,10	7,87
DS 15% 2	2,53	18,65
Média ± DP	1,82 ± 1,01	13,26 ± 7,62

3.6. Ensaio de libertação *in vitro*

A libertação de um antibiótico a partir de um sistema não degradável como o PMMA depende da dissolução do fármaco na sua matriz, que irá permitir a passagem através dos poros das partículas transportadoras. A quantidade libertada de fármaco com fraca solubilidade, como as quinolonas, depende na porosidade da matriz de onde se liberta o fármaco e da dissolução do mesmo na matriz (Allababidi et al., 1998; Mohanraj et al., 2007).

O ensaio de libertação *in vitro* foi realizado durante um período de uma semana (192 h).

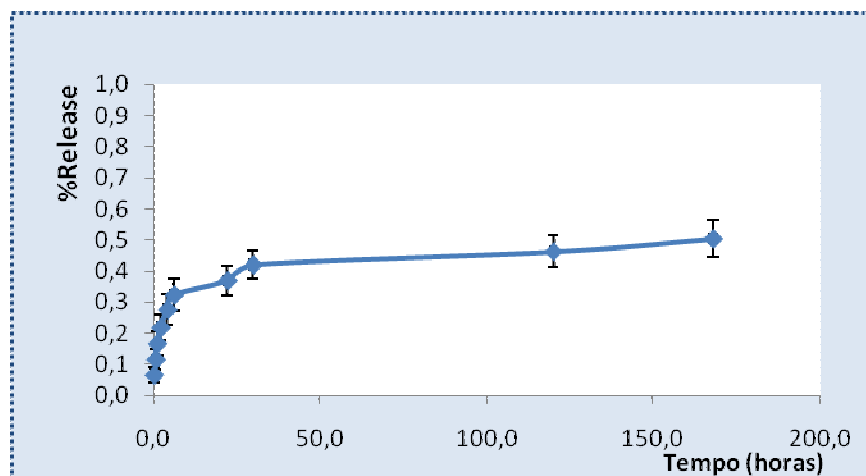


Figura 3.3. – Perfil de Libertação *in vitro* da LEV (n=2) em %LEV libertada.

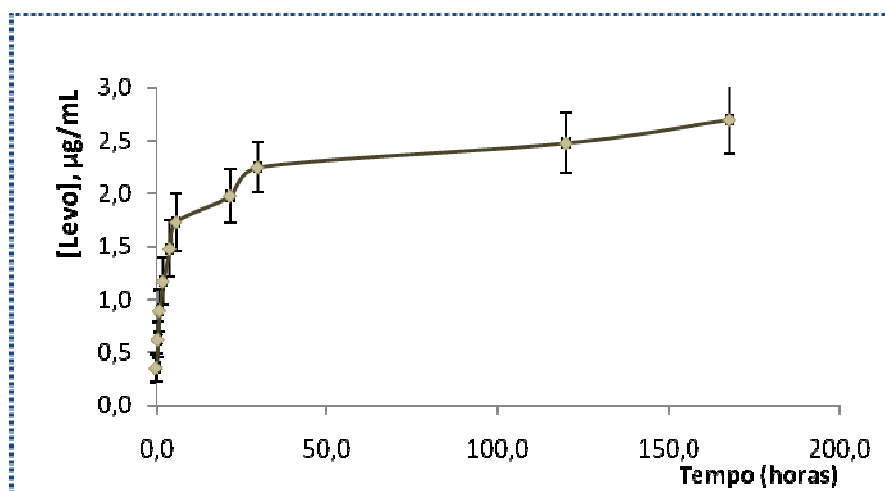


Figura 3.4. – Perfil de Libertação *in vitro* da LEV (n=2) em µg/mL de LEV.

Está extensamente descrito que as partículas preparadas por métodos de evaporação do solvente apresentam uma libertação acentuada devido à presença de fármaco que se encontra na superfície das partículas, visto que, devido ao seu carácter hidrofóbico, o fármaco irá aglomerar-se na superfície das partículas, durante a eliminação do solvente, neste caso o DCM. Esta camada irá contribuir para este *burst* inicial da libertação, enquanto o fármaco presente no

interior das partículas de PMMA será responsável pela libertação prolongada a partir das mesmas (Avinash et al., 2007; Rosca et al., 2010), perfil que pode ser confirmado pela Figura 3.3. e Figura 3.4.

Presterl et al. (2001) reportaram que a LEV apresentou uma MIC50 igual 8 µg/mL e uma MIC90 igual a 16 µg/mL em *S.aureus* ATCC25923. Os valores de MIC50 e de MIC90 são definidos como as concentrações mínimas de um dado agente antimicrobiano que inibiu 50% e 90% dos isolados, respectivamente. Contudo, é de salientar que as concentrações de LEV libertadas, durante todo o período do ensaio, se mantiveram em níveis inferiores ao valor de MIC50 para as células de *S.aureus*, que, efectivamente, consistem nos agentes patogénicos comumente isolados em qualquer tipo de ostiomielite (Trampuz et al., 2008).

Estes valores observados poder-se-ão relacionar com uma libertação incompleta do fármaco a partir das partículas de PMMA, como já havia sido referido por Streubel et al. (2003), o que, possivelmente, se deve ao carácter hidrofóbico do PMMA e a uma menor difusão da LEV através deste polímero. Uma vez que se trata de um fármaco com uma relativamente baixa solubilidade em água, a difusão do mesmo dever-se-á à sua passagem através da matriz polimérica, em vez de pelos poros aquosos desta (Zhu et al., 2006). Yuksel et al. (2010) ultrapassaram esta situação pela adição de plastificantes (como a triacetina) à formulação, o que enfraqueceu as forças intermoleculares entre as moléculas do PMMA, levando ao relaxamento da malha formada e a um maior volume disponível para a difusão do fármaco. (Gutierrez-Villarreal e Rodriguez-Velazquez, 2007).

4. Execução Financeira

O resumo da execução financeira encontra-se descrito na tabela 4.1.

Tabela 4.1. – Resumo da execução financeira do projecto.

	Reagentes	Pré-coluna HPLC	Antibiótico	Cimento ósseo	Material de vidro	TOTAL
<i>Despesas previstas</i>	€ 300	€ 200	€ 180	€ 200	€ 200	€ 1080
<i>Despesas efectivas</i>	€ 200	€ 200	€ 180	€ 0	€ 100	€ 680

Os custos inerentes à realização deste projecto foram suportados pelo financiamento plurianual da FCT.

5. Conclusões

No presente trabalho, a Levofloxacina, uma fluoroquinolona, foi seleccionada para incorporar em PMMA devido à sua actividade contra *S. Aureus*, o agente patogénico mais comumente isolado na osteomielite crónica. O PMMA foi utilizado como veículo devido à sua biocompatibilidade e às características físicas e químicas.

Foi alcançado o objectivo de produzir partículas de PMMA pela técnica de DESE, quer pelo método convencional, quer por *downscale*. As partículas foram caracterizadas em termos de propriedades físico-químicas e perfil de libertação *in vitro*.

Os principais resultados para o método convencional foram os seguintes:

- As partículas de PMMA produzidas apresentaram superfície esférica e regular, apresentando-se tendencialmente em monodispersão com $d(0,5)$ de LA (vazias) igual a $2,190 \pm 0,002 \mu\text{m}$; LE (2,5%) igual a $2,379 \pm 0,001 \mu\text{m}$; LB (5%) igual a $2,251 \pm 0,006 \mu\text{m}$; LF (7,5%) igual a $2,378 \pm 0,001 \mu\text{m}$; LC (10%) igual a $2,200 \pm 0,034 \mu\text{m}$; LG (12,5%) igual a $2,492 \pm 0,001 \mu\text{m}$ e LD (15%) igual a $1,922 \pm 0,001 \mu\text{m}$.
- o melhor valor de DL observado corresponde ao LC (10%) e foi igual a 4,42% enquanto que o melhor resultado de EE foi verificado para DL (10%), tendo sido registado 50,01%;
- os valores de potencial zeta situaram-se todos no intervalo $[-28,8 \pm 4,3; -34,7 \pm 0,4] \text{ mV}$;
- para os ensaios de libertação *in vitro*, os níveis de LEV revelaram-se inferiores ao valor de MIC50;

Para o método de *downscale*, as principais conclusões foram as seguintes:

As partículas de PMMA produzidas apresentaram-se tendencialmente polidispersas, com $d(0,5)$ de DS (vazias) igual a $5,630 \pm 0,479 \mu\text{m}$; DS (2,5%) igual a $3,387 \pm 0,044 \mu\text{m}$; DS (5%) igual a $5,180 \pm 0,094 \mu\text{m}$; DS (7,5%) igual a $4,079 \pm 0,811 \mu\text{m}$; DS (10%) igual a $5,531 \pm 0,479 \mu\text{m}$; DS (12,5%) igual a $7,092 \pm 0,142 \mu\text{m}$ e DS (15%) igual a $3,562 \pm 0,545 \mu\text{m}$, sendo, portanto, em geral, de maiores dimensões que as produzidas pelo método convencional.

- o melhor valor de DL e de EE observados correspondem ao lote DS (12,5%) e foi igual a $2,99 \pm 1,18$ e $24,62 \pm 12,39$, em percentagem, respectivamente. Os valores foram inferiores aos obtidos pelo método convencional.
- para os valores de potencial zeta foram registados resultados no intervalo de $[-24,9 \pm 0,8; -34,1 \pm 0,3] \text{ mV}$.

6. Bibliografia

Alonso AP, Rouse MS, Kerry E. Piper KE, Jacofsky DJ, Osmon DR, Patel R. Comparative Study of Antimicrobial Release Kinetics from Polymethylmethacrylate. *Clinical Orthopaedics and related research* 445 (2006) 239-244.

Avinash B, Steven JS, Karen I. Controlling the in-vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 346 (2008) 1:87–92.

Bettencourt A, Florindo HF, Ferreira IFS, Matos A, Monteiro J, Neves C, Lopes P, Calado A, Castro M, Almeida AJ. Incorporation of tocopherol acetate-containing particles in acrylic bone cement. *Journal of Microencapsulation* 27 (2010) 6: 533–541.

Bodmeier R, Mc Ginity JW. The preparation and evaluation of drug-containing poly(dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Pharmaceutical Research* 4 (1987) 465–471.

Buchholz HW, Engelbrecht H. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg.* 41 (1970) 511–515.

Budhian A, Siegel JS, Winey KI. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics* 336 (2007) 367–375.

Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials* 31 (2010) 6363-6377.

Cheow WS, Chang MW, Hadinoto K. Antibacterial Efficacy of Inhalable Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles Against E. coli Biofilm Cells: The Effect of Antibiotic Release Profile. *Pharmaceutical Research* 27 (2010).

Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Góis JR, Gil MH. Drug delivery systems: Advanced Technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal* 1 (2010) 164-209.

Dhana lekshmi UM, Poovi G, NarraKishore, Neelakanta P. In vitro characterization and in vivo toxicity study of repaglinide loaded poly(methylmethacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 396 (2010) 194-203.

Gonzalez JAO, Mochon MC, Rosa FJB. Spectrofluorimetric determination of levofloxacin in tablets, human urine and serum. *Talanta* 52 (2000) 1149–1156.

Iwata M, McGinity JW. Preparation of multi-phase microspheres of poly(d,l-lactic acid) and poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) containing a W/O emulsion by a multiple emulsion solvent evaporation technique. *Journal of Microencapsulation* 9 (1992) 201–214.

Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles: I. Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics* 77 (1991) 169–175.

Lambert A, Vains RJB, Lopez RMF. Structure of levofloxacin in hydrophilic and hydrophobic media: Relationship to its antibacterial properties. *Chemical Physics Letters* 442 (2007) 281–284.

Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 364 (2004) 9431: 369-379.

Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 (2006) 1:561-573.

Nandi SK, Mukherjee P, Roy S, Kundu B, De DK, Basu D. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 2478-2485.

Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H, Yashiki T, Shimamoto T. A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 36 (1988) 1095–1103.

Presterl E, Mueller-Uri P, Grisold A, Georgopoulos A, Graninger W. Ciprofloxacin-and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Susceptible to Moxifloxacin, Levofloxacin, Teicoplanin, Vancomycin and Linezolid. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 20 (2001) 486–489.

Reis C, Ribeiro A. Nanoencapsulation I: Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2 (2006) 8-21.

Roney C, Kulkarni P, Arora V. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release* 108 (2005) 2–3:193–214.

Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal of Controlled Release* 99 (2004) 271–280.

Rouse MS, Piper KE, Jacobson M, Jacofsky DJ, Steckelberg JM, Patel R. Daptomycin treatment of *Staphylococcus aureus* experimental chronic osteomyelitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (2006) 2:301-305.

Shi M, Kretlow JD, Nguyen A, Young S, Baggett LS, Wong ME, Kasper FK, Mikos AG. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control. *Biomaterials* 31 (2010) 4146–4156.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* 70 (2001) 1– 20.

Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. Multiple unit gastroretentive drug delivery systems: a new preparation method for low density microparticles. *Journal of Microencapsulation* 20 (2003) 329–347.

Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Current Infectious Diseases Report* 10 (2008) 5:394-403.

Villarreal GMH, -Velazquez RJ. The effect of citrate esters as plasticizers on the thermal and mechanical properties of poly(methylmethacrylate). *J. Appl. Poly. Sci.* 105 (2007) 2370–2375.

Wu XS. Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. in: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, et al., eds. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. New York, Marcel Dekker (1995) 1151–1200.

Zhu Y, Mehta KA, McGinity JW. Influence of plasticizer level on the drug release from sustained release film coated and hot-melt extruded dosage forms. *Pharmaceutical Development Technology* 11 (2006) 285–29.

Agradecimentos

-Prof. Doutora Ana Francisca Bettencourt

-Prof. Doutor António Almeida

-Doutora Lídia Gonçalves

-Dra. Ana Matos

-Dra. Ana Salgado

-Dra. Inês Ferreira

-Fundação Amadeu Dias

-Universidade de Lisboa