

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA PROF. DELBY
FERNANDES MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RENATA KELY DE PAULO MOURA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERAÇÃO
DE INDOMETACINA A PARTIR DE DISPOSITIVOS OCULARES
IMPLANTÁVEIS**

João Pessoa - PB

Agosto de 2010

RENATA KELY DE PAULO MOURA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERAÇÃO
DE INDOMETACINA A PARTIR DE DISPOSITIVOS OCULARES
IMPLANTÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

João Pessoa – PB

Agosto de 2010

RENATA KELY DE PAULO MOURA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERAÇÃO DE
INDOMETACINA A PARTIR DE DISPOSITIVOS OCULARES IMPLANTÁVEIS**

Dissertação aprovada em 31 / 08 / 2010

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Universidade Federal da Paraíba - Orientador

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Interno

Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Externo

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Universidade Federal de Pernambuco – Examinador Externo

Dedico este trabalho ao Padre José Sinfrônio de Assis Filho (*in memoriam*), vigário de Itaporanga por mais de 50 anos, grande incentivador da educação e idealizador do Cristo Redentor da minha terra natal.

“A primeira tarefa da educação é ensinar a ver”

Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Eduardo de Jesus de Oliveira pelo apoio neste trabalho e por todos os ensinamentos.

Ao Dr. Ricardo Azevedo Pontes de Carvalho (3T Biopolímeros) pela colaboração e pela cessão das amostras.

Ao Professor Dr. Fábio Santos de Souza pela disponibilidade, encorajamento e pelas análises de DSC.

Ao Professor Dr. Frederico Barbosa de Sousa do Departamento de Morfologia pelas análises no microscópio com luz polarizada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos técnicos e funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

A todos os colegas de turma do mestrado.

A Monica pelo apoio nos desafios que enfrentamos e pela amizade.

Aos amigos Kiriaki, Paloma, Roberto, Antônio, Stanley, Luís César, Corrinha, Sócrates, Fábio, Karine, Antonilêni, Ana Débora, Camila por todos os momentos de aprendizagem e lazer.

A Ionaldo pela compreensão, carinho e por estar ao meu lado sempre.

A toda minha família, em especial à minha mãe que sempre me encorajou e que representa para mim um referencial de força e superação.

Agradeço a DEUS, pai misericordioso, pela oportunidade de existir e “ver” o mundo e por ter colocado todas essas pessoas no meu caminho.

RESUMO

A anatomia e fisiologia do olho e suas barreiras protetoras representam um desafio para o desenvolvimento de sistemas de transporte de drogas oftálmicas efetivos. O tratamento farmacológico de doenças oculares tem se limitado às formas convencionais de administração que não são satisfatórias para o tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do bulbo do olho. O transporte de doses terapêuticas para os tecidos do segmento posterior do olho, que minimize os efeitos colaterais sistêmicos e locais, é o principal objetivo no tratamento de doenças oculares. Visando atingir este objetivo, estudos têm sido feitos no sentido de desenvolver novos sistemas de liberação de fármacos para o olho, entre estes estão os implantes. Esses implantes são preparados a partir de diferentes polímeros, os quais podem ser biodegradáveis ou não biodegradáveis. Os polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico têm se revelado bastante promissores devido, principalmente, às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Neste trabalho, dois diferentes implantes de indometacina formulados a partir do copolímero ácido láctico / ácido glicólico (PLGA 50:50) e do polímero derivado do ácido D,L-láctico (PLA), através de liofilização da mistura polímero-fármaco, foram fornecidos pela empresa 3T Biopolímeros (São Paulo - SP) e avaliados através de DSC, estudos de liberação *in vitro* usando aparato de dissolução e estudos de difusão através de esclera de coelho utilizando câmaras de Franz. Os resultados da validação do método CLAE para quantificação da indometacina apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (Resolução RE 899, 2003, ANVISA). As análises de DSC mostraram a ausência aparente de interações químicas e físicas entre o fármaco e os polímeros, sendo sugerido que o desaparecimento do pico de fusão da indometacina tenha ocorrido pela amorfização do fármaco durante o processo de liofilização ou pela diluição do fármaco no polímero. Os estudos preliminares de liberação *in vitro* demonstraram um perfil trifásico para os implantes formulados com PLGA e um perfil bifásico para aqueles formulados com PLA. Os implantes formulados com PLGA promoveram uma liberação mais rápida da indometacina (103,64%) quando comparado com os implantes formulados com PLA (49,9%) durante os trinta dias de experimento. O perfil de liberação da indometacina foi determinado pela velocidade de degradação dos polímeros, que também determinou a difusão escleral da indometacina a partir do PLGA e do PLA ($1,7 \times 10^{-5}$ cm/s e $0,24 \times 10^{-5}$ cm/s, respectivamente). Os estudos de difusão escleral mostraram que a esclera de coelho é permeável à indometacina e a microscopia de luz polarizada mostrou que a estrutura das fibras colágenas da esclera não foram significativamente alteradas durante o estudo de difusão nas câmaras de Franz. Os sistemas de liberação de fármacos avaliados foram capazes de liberar a indometacina de forma prolongada, servindo como um modelo para formulação de implantes de indometacina que podem ser futuramente utilizados para tratamento de doenças como edema macular cistóide.

Palavras-chave: Implantes oculares, Indometacina, PLA, PLGA.

ABSTRACT

The anatomy and physiology of the eye, together with its protective barriers represent challenges to effective ocular drug delivery systems. The pharmacological treatment of eye diseases had been limited to conventional drug formulations, which are not satisfactory for diseases affecting the posterior segment of the eye. The delivery of therapeutic doses at tissues from the posterior segment in order to minimize adverse systemic and regional effects is the main goal in the treatment of ocular diseases. With this aim, several studies have been conducted to develop new ocular drug delivery systems, such as those involving ocular implants. These implants are prepared using a variety of different polymers that can be either biodegradable or non-biodegradable. Polymers derived from lactic and glycolic acid have revealed to be promising materials for the formulation of ocular implants, mainly due to their biocompatibility and biodegradability. In this study, two different biodegradable indomethacin implants formulated based on a copolymer of lactic/glycolic acid (PLGA 50:50) and D,L-lactic acid (D,L-PLA) were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), *in vitro* release using dissolution apparatus and scleral diffusion (from rabbit's eye) using Franz chambers. The study was done in collaboration with 3T Biopolymers (São Paulo, Brazil) that provided samples of the polymers and implants for analyses. The results of the validation of the HPLC method for indomethacin quantification were within the limits set forth by Brazilian legislation (RE 899, 2003, ANVISA). The results of DSC analysis revealed absence of any evidence of physico-chemical interactions between the drug and polymer. The suppression of the indomethacin melting peak is probably due to changes from the crystalline to the amorphous state of the drug following lyophilization or by dilution effects. Preliminary *in vitro* release data revealed a triphasic profile for indomethacin release from the PLGA-based implants and a biphasic one for the PLA implants. The implants formulated with PLGA promoted a faster release of indomethacin (103.64%) compared with implants formulated with PLA (49.9%) during the thirty days of the experiment. The release profile of indomethacin was determined by the rate of degradation of polymers, which also determined the scleral diffusion of indomethacin from PLGA and PLA (1.7×10^{-5} cm / s and 0.24×10^{-5} cm / s, respectively). The scleral diffusion experiments using Franz diffusion chambers have shown that the rabbit sclera is permeable to indomethacin and polarized light microscopy revealed that the structure of the scleral collagen fibers were not significantly altered during the diffusion experiments. The drug-release systems studied were able to release indomethacin in a sustained fashion, serving as a model for the formulation of indomethacin implants that could be used in the future for the treatment of ocular diseases such as the cystoid macular edema.

Keywords: ocular implants, indomethacin, PLA, PLGA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os segmentos anterior e posterior do olho	19
Figura 2. Farmacocinética ocular.....	26
Figura 3. Classificação dos polímeros usados em sistemas de transporte de drogas	32
Figura 4. Estrutura química dos polímeros do ácido glicólico (PGA), do ácido láctico (PLA) e do copolímero do ácido láctico e glicólico (PLGA).....	36
Figura 5. Síntese do polímero Poli (lático-co-glicólico).....	37
Figura 6. Processo de difusão (A) e erosão (B) em matriz polimérica.....	40
Figura 7. Curva típica de DSC.....	46
Figura 8. Estrutura química da indometacina.....	47
Figura 9. Foto do implante escleral.....	56
Figura 10. Esquema representando a localização do implante no olho. (A) Implante suturado no globo ocular; (B) Silicone.....	56
Figura 11. Representação da cuba utilizada nos ensaios de liberação em aparato de dissolução. Dimensões da cuba: altura: 131 mm, largura: 65 mm e diâmetro do colar superior: 130 mm	58
Figura 12. Representação esquemática da Célula de Franz utilizada no estudo.....	59
Figura 13. Cromatograma do implante de PLGA contendo indometacina no meio solução tampão fosfato pH 7,4.....	64
Figura 14. Cromatograma do implante de PLGA contendo indometacina em BSS.....	64

Figura 15. Cromatograma do PLA sem indometacina em solução tampão fosfato pH 7,4 após 7 dias sob agitação a 40°C.....	64
Figura 16. Cromatograma do PLGA sem indometacina em solução tampão fosfato pH 7,4 após 7 dias sob agitação a 40°C.....	65
Figura 17. Cromatograma do PLA sem indometacina em BSS após 7 dias sob agitação a 40°C.....	65
Figura 18. Cromatograma do PLGA sem indometacina em BSS após 7 dias sob agitação a 40°C.....	65
Figura 19. Cromatograma da indometacina em BSS após 7 dias sob agitação a 40°C.....	66
Figura 20. Regressão linear da curva de calibração média no meio solução tampão fosfato pH 7,4.....	67
Figura 21. Gráfico de resíduos referentes aos dados de linearidade da Figura 20.....	68
Figura 22. Regressão linear da curva de calibração média no meio BSS.....	69
Figura 23. Gráfico de resíduos referentes aos dados de linearidade da Figura 22.....	69
Figura 24. Curvas de DSC da indometacina padrão em diferentes razões de aquecimento: (A) razão 5 °C/min; (B) razão 10 °C/min e (C) razão 20 °C/min..	74
Figura 25. Curvas de DSC da indometacina matéria-prima em diferentes razões de aquecimento: (A) razão 5 °C/min; (B) razão 10 °C/min e (C) razão 20 °C/min.....	74
Figura 26. Curvas de DSC: (A) PLA; (B) PLGA, mostrando suas Tgs	77
Figura 27. Curvas de DSC: (A) curva da indometacina; (B) Curva de indometacina + PLGA 50:50 liofilizados na proporção (1:2); (C) Curva de	

indometacina + PLA liofilizados na proporção (1:2); (D) Curva do PLA; (E) Curva do PLGA 50:50.....	78
Figura 28. Liberação cumulativa de indometacina a partir dos implantes de PLGA 50:50 em aparato de dissolução (Os valores são representados como média \pm DP, n=3).....	80
Figura 29. Comparação entre o modelo criado e os dados experimentais de liberação de paclitaxel a partir de filmes de PLGA.....	82
Figura 30. Esquema das barreiras de difusão da indometacina: polímero-esclera e esclera-BSS.....	84
Figura 31. Concentração cumulativa de indometacina (média \pm DP, n= 3), a partir dos implantes formulados com PLGA e PLA, no compartimento receptor das células de Franz de acordo com o tempo de difusão.....	85
Figura 32. Fotomicrografias da esclera de coelho pigmentado antes (A) e após (B) dos ensaios nas câmaras de Franz. (Aumento de 50x).....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios das áreas obtidas para as concentrações de indometacina no meio solução tampão fosfato pH 7,4 utilizando o EQUIPAMENTO.....	68
Tabela 2. Valores médios das áreas obtidas para as concentrações de indometacina no meio BSS utilizando o EQUIPAMENTO 2	69
Tabela 3. Repetibilidade (dias 1, 2 e 3) e Precisão intermediária no meio tampão fosfato de potássio pH 7,4 para as concentrações 1, 10 e 20µg/mL, utilizando o equipamento 1 nos dias 1 e 2 e o equipamento 2 no dia 3.....	71
Tabela 4. Repetibilidade (dias 1, 2 e 3) e Precisão intermediária no meio BSS para as concentrações 0,5, 10 e 50µg/mL, utilizando o equipamento 2 nos dois primeiros dias e o equipamento 2 no terceiro dia.....	72
Tabela 5. Ensaio de exatidão para as concentrações baixa, média e alta no meio solução tampão fosfato pH 7,4	73
Tabela 6. Ensaio de exatidão para as concentrações baixa, média e alta no meio BSS	73
Tabela 7. Resultados de DSC da indometacina matéria-prima e padrão de referência nas razões de aquecimento 5, 10 e 20 °C/min.	76
Tabela 8. Teor médio de indometacina presente nos implantes de PLA e PLGA 50:50	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Condições cromatográficas adotadas 52

Quadro 2. Temperatura de transição vítrea de PLGA 50:50 e do D,L-PLA 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% p/p – porcentagem peso por peso

% v/v – porcentagem volume por volume

ACN - acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSS – (Balanced Salt Solution) – Solução salina balanceada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMVR - retinite por citomegalovírus

CV% - Coeficiente de Variação

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

EUA – Estados Unidos da América

EVA – Acetato de vinil etileno

FDA – Food and Drug Administration

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGA – Poli (ácido glicólico)

PLA - Poli (ácido lático)

PLGA – Poli (ácido lático-co-glicólico)

PVA – Poli álcool vinílico

PVP – Polivinilpirrolidona

rpm – Rotações por minuto

Tf – Temperatura de fusão

Tg – Temperatura de transição vítrea

USP – United States Pharmacopeia

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Anatomia do Olho Humano.....	18
2.1.1. Segmento Anterior do Olho.....	19
2.1.2. Segmento Posterior do Olho.....	22
2.2. Doenças do Segmento Posterior do Olho.....	24
2.3. Farmacocinética Ocular e Vias de Administração de Fármacos Oftalmológicos.....	25
2.4. Recentes Desenvolvimentos em Sistemas de Liberação de Fármacos Oculares.....	28
2.5. Polímeros Utilizados no Preparo de Implantes Oculares.....	30
2.6. Estudos com Implantes Oculares Produzidos com Polímeros Biodegradáveis.....	34
2.7. Polímeros e Co-polímeros Derivados do Ácido Lático e Glicólico.....	36
2.8. Estudos de Liberação <i>in vitro</i>	39
2.9. Estudos de Difusão Escleral de Fármacos.....	44
2.10. Técnicas de Caracterização Físico-Química.....	45
2.11. Indometacina.....	46
2.11.1. Propriedades físico-químicas.....	46
2.11.2. Propriedades farmacológicas.....	47
3. OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Materiais.....	49
4.2. Métodos.....	49
4.2.1 Validação da Metodologia Analítica.....	49

4.2.1.1.	Seletividade.....	52
4.2.1.2.	Linearidade.....	53
4.2.1.3.	Exatidão e Precisão.....	53
4.2.1.4.	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	54
4.2.1.5.	Análise Estatística.....	55
4.2.2.	Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	55
4.2.3.	Estudos de liberação <i>in vitro</i> e Difusão Escleral	55
4.2.3.1.	Amostras.....	55
4.2.3.2.	Determinação da quantidade de Indometacina presente nos implantes.....	57
4.2.3.3.	Experimentos de Liberação <i>in vitro</i> Utilizando Aparato de Dissolução.....	57
4.2.3.4.	Estudo da Difusão Escleral da Indometacina.....	59
4.2.4.	Quantificação dos Fármacos.....	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1.	Validação da Metodologia Analítica.....	62
5.1.1	Seletividade.....	62
5.1.2.	Linearidade.....	66
5.1.3.	Repetibilidade e Precisão intermediária.....	70
5.1.4.	Exatidão.....	71
5.1.5.	Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	73
5.2.	Calorimetria Exploratória Diferencial.....	73
5.3.	Determinação do teor de Indometacina presente nos Implantes.....	79
5.4.	Estudos de Liberação <i>in vitro</i>	80
5.5.	Difusão Escleral da Indometacina.....	83
6.	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

Estimativas baseadas na população mundial de 2002 referentes à cegueira e baixa visão, divulgadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), indicam que o número de pessoas com distúrbios visuais era de 161 milhões, sendo 37 milhões de indivíduos cegos e 124 milhões com baixa visão. No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Censo 2000 contabilizou 148 mil pessoas cegas, sendo 57 mil só no nordeste.

As doenças do segmento posterior do bulbo do olho são responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível no mundo inteiro (GEROSKI; EDELHAUSER, 2001).

O olho apresenta características anatômicas e fisiológicas que dificultam a penetração de fármacos, principalmente em seu segmento posterior. Por este motivo, as vias de administração convencionais utilizadas na prática clínica para o tratamento de doenças oculares posteriores, tais como a via tópica (através de colírios), via sistêmica, via periocular e intra-ocular (sendo estas duas últimas através de injeções), apresentam limitações para o tratamento de doenças que acometem o olho posterior (ELJARRAT-BINSTOCK et al., 2010).

Por causa das razões acima descritas e motivados pelo avanço na ciência de biomateriais, estudos têm sido feitos no sentido de desenvolver novos sistemas de liberação de fármacos oculares.

Uma forma promissora de veiculação de fármacos no tratamento de doenças do segmento posterior do olho constitui a disponibilização do fármaco no interior do olho por meio de implantes oculares (dispositivos implantáveis) preparados com materiais poliméricos biocompatíveis.

Os dispositivos implantáveis visam à obtenção de níveis terapêuticos adequados de fármacos no segmento posterior do olho por período prolongado. Esta tecnologia terá repercussões nos resultados do tratamento e adesão ao tratamento de doenças que levam à cegueira através da inflamação de estruturas nobres do olho, como a retina e coróide, e outras doenças dificilmente tratadas pelas vias de administração convencionais.

O trabalho em questão objetivou a avaliação de dispositivos oculares implantáveis contendo a indometacina como modelo de fármaco e o poli (ácido D,L-lático) (PLA) e o poli (ácido D,L-lático-co-glicólico) na proporção 50:50

(PLGA) como materiais poliméricos. Foi feita uma caracterização do fármaco, dos polímeros e dos implantes finais e uma avaliação da ocorrência de possível interação entre o polímero e o fármaco através de Calorimetria Exploratória Diferencial e avaliou-se o perfil de liberação *in vitro* das formulações e a difusão escleral da indometacina a partir dos implantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANATOMIA DO OLHO HUMANO

O globo ocular está situado em uma cavidade óssea do crânio chamada órbita, que apresenta a principal função de protegê-lo. É um órgão que possui características muito específicas e orientadas para a realização do fenômeno visual. Assim, tem uma forma aproximadamente esférica, estando suspenso na cavidade óssea orbitária por uma série de músculos. O globo ocular está envolvido por uma membrana, a conjuntiva, e é formado por três camadas teciduais concêntricas chamadas de túnicas oculares. A mais externa é formada pela córnea e pela esclera e é fibrosa, tendo a função principal de proteção. A túnica média é vascular e consiste de íris, corpo ciliar e coróide, que juntos formam a camada uveal ou trato uveal. A túnica mais interna, também chamada de túnica nervosa corresponde à retina (CSILLAG, 2005).

O Olho é anatomicamente dividido em dois segmentos principais: segmento anterior e o segmento posterior. O primeiro é formado pela córnea, câmaras anterior e posterior, íris, corpo ciliar e lente; o segmento posterior é composto pela esclera, coróide, retina, humor vítreo, e nervo óptico (Figura 1) (OGURA, 2001; GAUDANA et al, 2008).

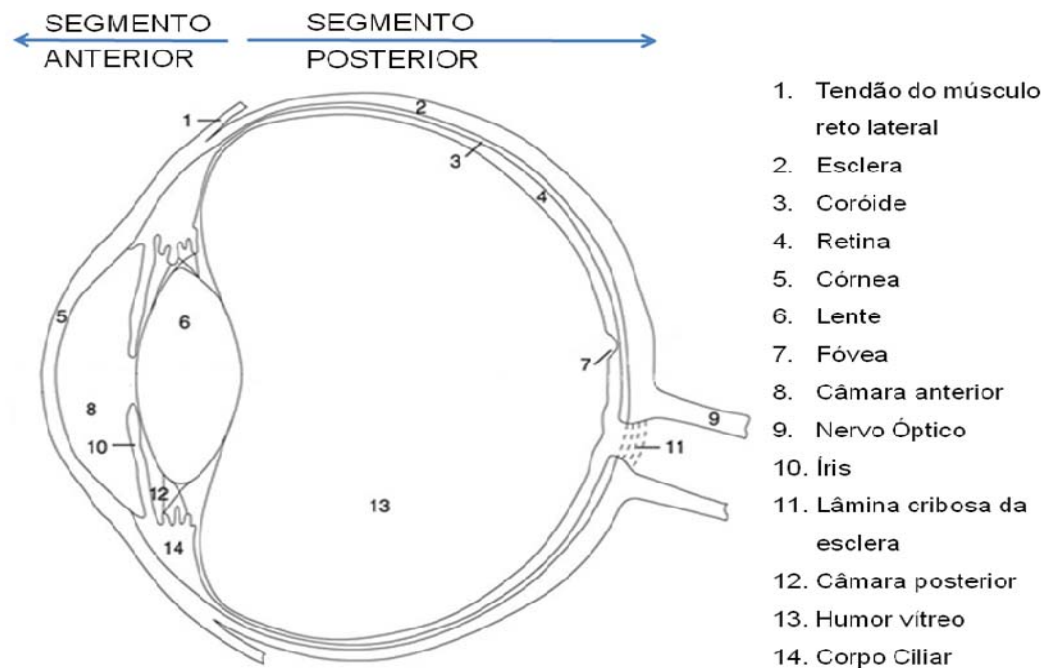


Figura 1. Os segmentos anterior e posterior do olho.

Fonte: Adaptado de CSILLAG, 2005.

2.1.1. SEGMENTO ANTERIOR DO OLHO

Córnea

A córnea é uma estrutura transparente no centro da parte visível do bulbo ocular, representando o principal meio refrativo do olho. A transição com a estrutura adjacente (esclera), chamada limbo, não é brusca: a delicada e regular distribuição das fibrilas colágenas, em seu estroma, desorganiza-se progressivamente para formar a esclera. No limbo, situam-se a trama trabecular e o canal de Schlemm, que representam a principal rota de drenagem do humor aquoso (REMINGTON, 2005).

Um importante fator que contribui para a transparência da córnea é a sua avascularização e essa transparência é mantida principalmente através da contínua lubrificação pelo fluido lacrimal (CSILLAG, 2005).

A córnea é formada por cinco camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O estroma representa cerca de

90% da espessura da córnea e é caracterizado pela presença de lâminas colágenas altamente organizadas (GOODMAN & GILMAN'S, 2006).

As câmaras do olho

O bulbo do olho é formado por duas câmaras: câmara anterior e câmara posterior, que são separadas pela íris e preenchidas por humor aquoso. A câmara anterior contém aproximadamente 250 μ L de humor aquoso e é limitada na parte frontal pela córnea e posteriormente pela face anterior da íris, pela face anterior do corpo ciliar e pela lente. A câmara posterior, que contém aproximadamente 50 μ L de humor aquoso, é definida pelos limites dos processos do corpo ciliar, da superfície posterior da íris e da superfície da lente. As duas câmaras se comunicam entre si através da pupila (CSILLAG, 2005; GOODMAN & GILMAN'S, 2006).

O humor aquoso é produzido pelos processos ciliares e possui composição semelhante à da linfa. Tem não só a função de nutrir córnea e lente, como a de manter uma pressão hidrostática conveniente para o olho (valores normais em torno de 12 a 19 mmHg). Constantemente produzido, o humor aquoso passa da câmara posterior para a câmara anterior e daí sai pelo ângulo cameral (formado na junção da córnea com a raiz da íris) filtrando-se por uma estrutura porosa (o trabeculado) ao canal de Schlemm (que circunda toda a córnea, sob o limbo), em seguida é drenado para um plexo venoso episcleral e para a circulação sistêmica (BICAS, 1997). Uma falha no processo de drenagem do humor aquoso leva a um aumento da pressão intraocular, condição conhecida como glaucoma (CSILLAG, 2005).

Íris

A íris é um diafragma circular que divide os compartimentos aquosos (preenchidos pelo humor aquoso) em câmaras anterior e posterior. Prende-se, periféricamente ao corpo ciliar e centralmente é livre, limitando uma abertura conhecida como pupila (CSILLAG, 2005).

A superfície anterior da íris é uma estrutura pouco organizada que contém melanócitos, vasos sanguíneos, músculos lisos e nervos simpáticos e

parassimpáticos. A cor da íris depende da disposição e do tipo do pigmento e da estrutura do estroma. Na parte posterior do estroma, próximo à pupila, está um músculo liso disposto concentricamente chamado esfíncter da pupila, que é inervado por fibras parassimpáticas e cuja contração resulta na constrição da pupila ou miose. Radialmente, aparecem as fibras de outro músculo liso, este inervado pelo sistema nervoso simpático e que realiza a dilatação da pupila (midríase), o dilatador da pupila. Desta forma, a pupila possui a função principal de controlar a entrada de luz que incide sobre a retina (BICAS, 1997; GOODMAN & GILMAN'S, 2006).

Corpo Ciliar

É constituído por duas porções básicas: os processos ciliares, onde se produz o humor aquoso e o músculo ciliar, responsável pelo processo de acomodação. Os processos ciliares são pregas de tecido conjuntivo frouxo, ricas em novelos vasculares (principalmente venosos), dispostas como franjas radiais (aproximadamente 70). A eles estão presos os delicados filamentos que se prendem a lente. O músculo ciliar é a porção mais externa (periférica) do corpo ciliar, logo abaixo da esclera. As fibras são lisas, circulares e radiadas, mas há descrições de disposições mais complexas (BICAS, 1997).

O corpo ciliar juntamente com a íris e a coróide formam o trato uveal. As doenças inflamatórias do trato uveal são conhecidas como uveítes (DURRANI et al., 2004).

Lente

A lente é uma estrutura transparente biconvexa, sem vasos e sem nervos, suspensa pelos processos ciliares via ligamentos suspensórios das zônulas ciliares. Juntamente com a córnea, o humor aquoso e o corpo vítreo formam o meio refrativo ocular, porém a lente é o único componente ajustável do meio refrativo do olho (BICAS, 1997; CSILLAG, 2005).

Com o tempo, a flexibilidade do cristalino se reduz e o processo de acomodação vai, progressivamente, perdendo sua capacidade (presbiopia).

Além disso, a transparência pode também se degradar resultando em catarata (BICAS, 1997).

2.1.2. SEGMENTO POSTERIOR DO OLHO

Esclera

É uma continuação da córnea e também está presente no segmento anterior do olho. Apresenta-se como um revestimento de tecido conjuntivo resistente que forma uma cápsula protetora em torno dos tecidos mais delicados do globo ocular. A parte visível da esclera (coberta pela conjuntiva) é conhecida como o branco do olho (CSILLAG, 2005).

Os principais componentes da esclera são fibras colágenas, uma escassa população de fibroblastos, proteoglicanos e poucas fibras elásticas. Colágeno é o componente majoritário da esclera, constituindo cerca de 75% do peso seco da esclera, predominando as fibras colágenas tipo I (GEROSKI et al., 2001).

A estrutura da esclera é semelhante à da córnea, no entanto, as fibras colágenas da esclera possuem diâmetro menos uniforme e organização menos regular do que as da córnea (CSILLAG, 2005).

A esclera é hipocelular e por isso tem poucas enzimas proteolíticas ou sítios de ligação de proteínas que podem degradar fármacos. Sua permeabilidade não declina com a idade (OLSEN et al., 1995) o que é um fator muito importante no tratamento de doenças do segmento posterior que afetam pessoas idosas.

Coróide

É um tecido altamente vascularizado presente entre a retina e a esclera. Forma a parte posterior do trato uveal e consiste em três partes: (a) uma camada de vasos, consistindo de veias e artérias; (b) uma camada de coriocapilares, consistindo de um sistema de capilares fenestrados densos e finos; e (c) membrana de Bruch, que está em contato direto com o epitélio pigmentar da retina (MACHA, 2003).

A principal função da coróide é fornecer nutrientes para a retina e é uma saída para catabólitos da retina, além disso, absorve o excesso de luz que passa pelo epitélio pigmentar da retina (REMINGTON, 2005).

Retina

A retina é a camada mais interna do olho e está localizada entre a coróide e o vítreo. Estende-se da borda circular do disco óptico até a *ora serrata*. Consiste em duas partes principais: uma camada externa, o epitélio pigmentar da retina (EPR) e uma interna, a retina neural. O EPR é uma camada única de células que está aderida à coróide. A retina neural é formada pelas demais camadas da retina, que ao todo são 10 camadas (REMINGTON, 2005).

O epitélio pigmentar da retina possui diversas funções: a *zonula occludens* (junção intercelular composta por uma série de fusões da membrana de duas células adjacentes) do EPR é uma importante parte da barreira hemato-retiniana, que controla o movimento de substâncias dos coriocapilares para a retina; o EPR metaboliza e armazena vitamina A, que é usada na formação de moléculas de fotopigmentos e é o local onde ocorrem processos bioquímicos necessários para a renovação dessas moléculas (REMINGTON, 2005).

A retina neural se subdivide numa porção periférica e numa região central. A retina central ou mácula lútea se entende nasalmente da fóvea central até o disco óptico. Nessa região, as células ganglionares possuem mais de uma camada de núcleos. A fóvea central é a área onde se encontram exclusivamente cones e a sua área mais profunda é a fovéola. Na retina periférica, as células fotorreceptoras são exclusivamente bastonetes e os segmentos dos cones são mais finos do que na retina central (BICAS, 1997).

Corpo vítreo

É uma estrutura gelatinosa, transparente e incolor. O corpo vítreo dá forma ao globo ocular e pressiona a retina contra as paredes da coróide. É

composto basicamente de água (99% de sua massa de cerca de 3,9 g), de ácido hialurônico e colágeno (BICAS, 1997).

O corpo vítreo é uma área de armazenamento para metabólitos para a retina e lente e fornece um caminho para o movimento destas substâncias no interior do olho. Por conta de suas propriedades viscoelásticas atua como um “amortecedor” protegendo a retina durante movimentos oculares rápidos e durante atividade física extenuante (REMINGTON, 2005).

2.2. DOENÇAS DO SEGMENTO POSTERIOR DO OLHO

Estimativas baseadas na população mundial de 2002 referentes à cegueira e baixa visão, divulgadas pela Organização Mundial de Saúde, indicam que o número de pessoas com distúrbios visuais era de 161 milhões, sendo 37 milhões de indivíduos cegos e 124 milhões com baixa visão (RESNIKOFF et al., 2004). No Brasil, segundo o IBGE, o censo de 2000 contabilizou 148 mil pessoas cegas e 2,4 milhões com grande dificuldade de enxergar. Do total de cegos, 77.900 eram mulheres e 70.100, homens. A região Nordeste, apesar de ter população inferior ao Sudeste, concentrava o maior número de pessoas cegas: 57.400 cegos no Nordeste contra 54.600 no Sudeste. São Paulo é o estado com o maior número de cegos (23.900), seguido da Bahia (15.400) (CENSO DEMOGRÁFICO 2000, IBGE).

As doenças do segmento posterior do bulbo do olho são responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível no mundo inteiro (GEROSKI et al., 2001).

Doenças tais como degeneração macular relacionada à idade, uveítes posteriores, retinopatia diabética, retinites e outras doenças que acometem o segmento posterior do olho podem causar dano à retina e ao nervo óptico e são as causas mais prevalentes de perda visual e cegueira (ELJARRAT-BINSTOCK et al., 2010). A retinite por citomegalovírus (CMVR) é a infecção ocular mais comum e a maior causa de perda de visão em pacientes que apresentam a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (YASUKAWA et al., 2004).

O tratamento de doenças do segmento posterior do olho tem sido um problema devido à dificuldade de penetração dos fármacos nesse segmento.

Muitas dessas doenças não podem ser tratadas efetivamente com os métodos convencionais (URTTI, 2006).

Este cenário estimula o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento para degenerações retinianas e doenças do segmento posterior do bulbo do olho. Neste contexto, o desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos diretamente para o interior do olho torna-se tão ou mais importante do que a descoberta de novos fármacos.

2.3. FARMACOCINÉTICA OCULAR E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS OFTALMOLÓGICOS

Embora princípios farmacocinéticos clássicos determinem a disponibilização de fármacos no olho, as barreiras oculares e vias alternativas de administração de medicamentos introduzem outras variáveis ao se estudar a farmacocinética ocular (MACHA, 2003).

As principais rotas de administração e eliminação de fármacos do olho estão representadas esquematicamente na Figura 2. Os números se referem aos seguintes processos: (1) representa a permeação trans-corneana a partir do fluido lacrimal para a câmara anterior; (2) demonstra a permeação não-corneana através da conjuntiva e esclera para a úvea anterior; (3) a distribuição do fármaco a partir do fluxo sanguíneo através da barreira hemato-aquosa para a câmara anterior (4) a eliminação de fármaco da câmara anterior através da circulação do humor aquoso para a trama trabecular e canal de Schemm (5) a eliminação do fármaco do humor aquoso para circulação sistêmica através da barreira hemato-aquosa; (6) a distribuição do fármaco do sangue para o segmento posterior através da barreira hemato-retiniana; (7) administração intravítrea, (8) eliminação do fármaco do vítreo via rota posterior através da barreira hemato-retiniana; (9) eliminação do fármaco do vítreo via rota anterior (DEL AMO; URTTI, 2008). A figura 2 também mostra as principais barreiras oculares que estão representadas em azul e vermelho (epitélio corneano, epitélio conjuntival, barreira hemato-aquosa e barreira hemato-retiniana).

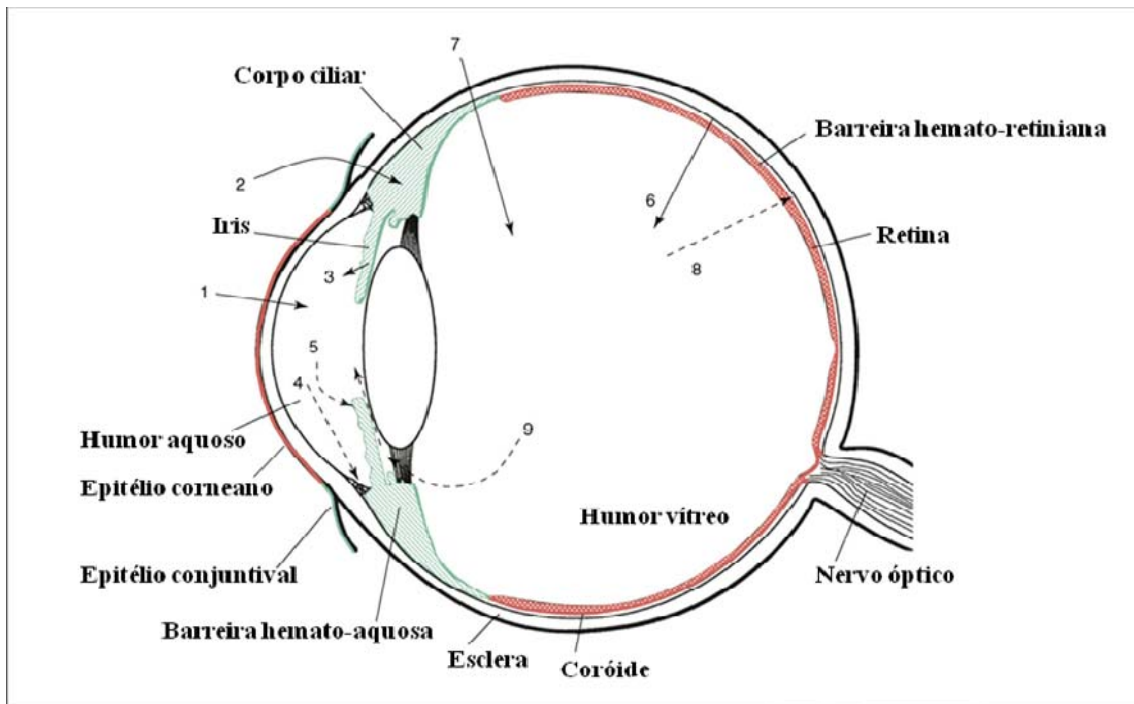


Figura 2. Farmacocinética ocular.

Fonte: Adaptado de DEL AMO; URTTI, 2008.

Os tecidos oculares podem ser alcançados por administração local ou sistêmica. As barreiras oculares, no entanto, limitam o acesso de fármacos aos seus alvos farmacológicos (URTTI, 2006).

A córnea e a conjuntiva formam uma barreira que cobre a superfície ocular. A barreira hemato-aquosa, composta por capilares endoteliais da úvea e epitélio ciliar, limita o acesso dos componentes da circulação sistêmica para a câmara anterior, enquanto que a barreira hemato-retiniana limita a difusão de substâncias da circulação sistêmica para a retina e vice-versa. A barreira hemato-retiniana é formada pelo epitélio pigmentado da retina e células endoteliais das paredes dos capilares retinianos (DEL AMO; URTTI, 2008) (Figura 2).

Na prática clínica, o tratamento de doenças oculares é baseado em vias de administração convencionais, tais como, administração tópica, injetável (através de injeção periocular ou intra-ocular) e sistêmica (ELJARRAT-BINSTOCK et al., 2010). No entanto, devido às características fisiológicas e anatômicas do bulbo ocular, essas vias de administração não têm sido

satisfatórias para o tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho.

A administração tópica, principalmente na forma de colírios, é a forma mais comumente usada para tratamento de doenças oculares por conta da facilidade de aplicação e boa aceitação do paciente. No entanto, os colírios sofrem rapidamente drenagem nasolacrimonial ficando pouco tempo em contato com o tecido ocular para ser absorvido e com isso a biodisponibilidade dessa forma farmacêutica é muito baixa (DEL AMO; URTTI, 2008). A relativa impermeabilidade do epitélio corneano, a eficiente barreira hemato-aquosa e a dinâmica lacrimal também contribuem para a baixa biodisponibilidade das preparações tópicas oculares. Muitos estudos têm mostrado que aproximadamente 5% ou menos da dose aplicada topicamente é absorvida através da córnea, atingindo os tecidos intra-oculares, grande parte da dose é absorvida para a circulação sistêmica através dos vasos sanguíneos nasal e conjuntival (MACHA, 2003).

Para atingir o segmento posterior do olho, são utilizadas na prática clínica injeções perioculares ou injeções intra-oculares, gerando elevadas concentrações intra-oculares do fármaco com o mínimo de efeitos sistêmicos. Para minimizar o número de injeções, o ideal seria que a concentração terapêutica do fármaco fosse mantida por um período prolongado, no entanto, este é um grande desafio, porque a droga injetada é rapidamente eliminada do olho pela via anterior, através do fluxo do humor aquoso, ou posteriormente, através da retina para a circulação sistêmica (ELJARRAT-BINSTOCK et al., 2010). Por isso, no tratamento utilizando a via injetável é necessário que sejam aplicadas repetidas injeções, o que por sua vez leva à baixa adesão dos pacientes devido à dor e ao desconforto. Além disso, injeções múltiplas estão associadas com complicações como catarata, aumento da pressão intra-ocular, hemorragias intra-oculares, aumento de chance de infecções, endoftalmite e a possibilidade de deslocamento de retina (DEL AMO; URTTI, 2008).

Fármacos também podem atingir os tecidos posteriores do olho através da circulação sanguínea sistêmica. No entanto, somente uma pequena fração do fluxo sanguíneo circula através do segmento posterior ocular. Conseqüentemente, altas doses são necessárias para se atingir o efeito terapêutico e efeitos adversos sistêmicos são comuns. Por este motivo,

fármacos com baixo índice terapêutico não são utilizados de forma sistêmica para o tratamento de doenças oculares (DEL AMO; URTTI, 2008). As barreiras hemato-aquosa e hemato-retiniana limitam o acesso de fármacos da circulação sistêmica para o segmento posterior (FELT-BAEYENS et al., 2006).

A anatomia e fisiologia única do olho e suas barreiras protetoras oferecem muitos desafios para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de fármacos oftalmológicos. No entanto, o crescente entendimento da farmacocinética ocular e os rápidos avanços na ciência de biomateriais têm oferecido novas possibilidades para o tratamento de doenças oculares (ELJARRAT-BINSTOCK et al., 2010).

Pesquisas têm sido realizadas no sentido de desenvolver sistemas de administração oculares que permitam liberar concentrações terapêuticas das drogas por um período prolongado, minimizando os efeitos colaterais locais e sistêmicos e possibilitando o tratamento efetivo de doenças que levam à cegueira através da inflamação de estruturas nobres do olho, como a retina e coróide, e outras doenças dificilmente tratadas pelas vias de administração convencionais.

2.4. RECENTES DESENVOLVIMENTOS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS OCULARES

O desenvolvimento de sistemas que viabilizem o acesso de fármacos ao tecido-alvo e mantenham sua concentração em níveis satisfatórios por tempo determinado pode ser tão importante quanto o desenvolvimento de novos princípios ativos terapêuticos.

Diferentes sistemas de transporte de drogas para o tratamento de doenças vitreoretinianas têm sido desenvolvidos visando contornar as desvantagens das vias de administração convencionais.

As microesferas, os lipossomas, a iontoforese e os implantes são exemplos destes sistemas (FIALHO; CUNHA JÚNIOR, 2007; DEL AMO; URTTI, 2008).

As microesferas baseiam-se no encapsulamento de fármacos em micropartículas ou nanopartículas. São tipicamente preparadas a partir de

polímeros e são usualmente administrados através de injeções intravítreas (HSU, 2007).

Lipossomas são vesículas lipídicas biocompatíveis e biodegradáveis. Fármacos hidrofílicos e lipofílicos podem ser encapsulados nas paredes lipídicas ou na solução aquosa interna, respectivamente (DEL AMO; URTTI, 2008).

A utilização das microesferas e dos lipossomas é limitada devido à complexidade dos métodos de preparação e à dificuldade de esterilização. Além disso, os riscos inerentes da administração de injeções intra-oculares e a possibilidade de turvação intra-ocular, causada pelas partículas presentes nessas formulações suspensas na cavidade vítrea são desvantagens desses sistemas (OGURA, 2001; FIALHO; CUNHA JÚNIOR, 2007).

A iontoforese é um método não invasivo de transferência de fármacos ionizados através de membranas biológicas pelo uso de uma corrente elétrica de baixa intensidade (MYLES et al., 2005). No entanto, para doenças que necessitem de tratamento prolongado, a iontoforese ainda não apresenta viabilidade, já que o paciente necessita de repetidas administrações, o que traz desconforto e reduz a adesão (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2004).

Implantes capazes de promover a liberação prolongada de fármacos no interior do olho têm sido desenvolvidos para o tratamento de diferentes doenças intra-oculares e também para aplicação em cirurgias de catarata (SANBORN et al., 1992; FIALHO; CUNHA JÚNIOR, 2007). Os implantes são preparados a partir de diferentes polímeros que controlam a liberação do fármaco veiculado.

2.5. POLÍMEROS UTILIZADOS NO PREPARO DE IMPLANTES OCULARES

A aceleração na pesquisa e desenvolvimento de materiais poliméricos contribuiu para o progresso de diversas tecnologias de liberação controlada. Nas últimas décadas, houve um considerável aumento no interesse por essa tecnologia, como verificado através do aumento no número de publicações e patentes na área de sistemas de liberação usando materiais poliméricos.

O olho representa uma área ideal para o uso de sistemas poliméricos de liberação controlada por ser um órgão de fácil acesso e visível para observação, o que facilita a implantação e/ou remoção destes sistemas.

Os implantes oculares podem ser preparados a partir de diferentes polímeros reconhecidamente biocompatíveis, que podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis (DASH et al., 1998) (Figura 3).

Os biodegradáveis são aqueles que sofrem degradações imediatamente ou após o período de aplicação. A sua aplicabilidade na medicina vem sendo estudada desde a década de 60, como materiais utilizados na fabricação de fios de sutura (ATHANASIOU et al., 1996). Os não biodegradáveis, por sua vez, são definidos como sendo aqueles que requerem um tempo maior para serem degradados, muito além do tempo de sua aplicação (SALIBA, 2007).

Os sistemas poliméricos de transporte de fármacos, como os implantes, podem ainda ser classificados como matriciais (ou monolíticos) e reservatórios (DASH et al., 1998).

No sistema matricial, a droga se encontra dispersa na matriz polimérica e a liberação do fármaco ocorre por difusão lenta através desta matriz quando o polímero é não-biodegradável, enquanto que quando o polímero é biodegradável, a liberação do fármaco ocorre por difusão do fármaco, por degradação do polímero ou uma combinação destes dois fatores. No sistema do tipo reservatório, a droga se encontra em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica, cuja espessura e propriedades de permeabilidade controlam a taxa de liberação do fármaco quando o polímero é não-biodegradável ou biodegradável, no entanto, neste último caso a membrana polimérica degrada a uma velocidade menor do que a taxa de difusão da droga através da membrana (DASH et al., 1998; KIMURA et al., 2001).

Implantes preparados a partir de sistemas poliméricos podem ser aplicados em diferentes regiões do olho (FIALHO et al., 2003). Para isto, sejam biodegradáveis ou não-biodegradáveis, estes sistemas devem ser biocompatíveis, isto é, devem ser não-carcinogênicos, hipoalergênicos, mecanicamente estáveis e não causadores de resposta inflamatória no local de aplicação. Além disso, o tecido local não deve modificar as características químicas e físicas do material (ATHANASIOU et al., 1996).

Os polímeros normalmente usados para implantes não-biodegradáveis são o álcool polivinílico (PVA), o poli(etileno-co-acetato de vinila) (EVA) e silicone (ELJARRAT-BINSTOCK et al., 2010).

Os polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos têm sido estudados como componentes em sistemas de liberação de fármacos. Os naturais, no entanto, apresentam uso restrito por conterem pureza questionável e, em alguns casos, atividade antigênica marcante (FIALHO et al., 2003). Os sintéticos, por sua vez, têm apresentado crescente interesse na aplicação como sistemas de liberação de drogas.

Os poliésteres são os polímeros biodegradáveis sintéticos mais utilizados atualmente. A poli(ϵ -caprolactona), o poli(ácido D,L-lático) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico (PLGA) são exemplos de poliésteres, sendo o PLA e o PLGA mais amplamente utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos (KIMURA et al., 2001).

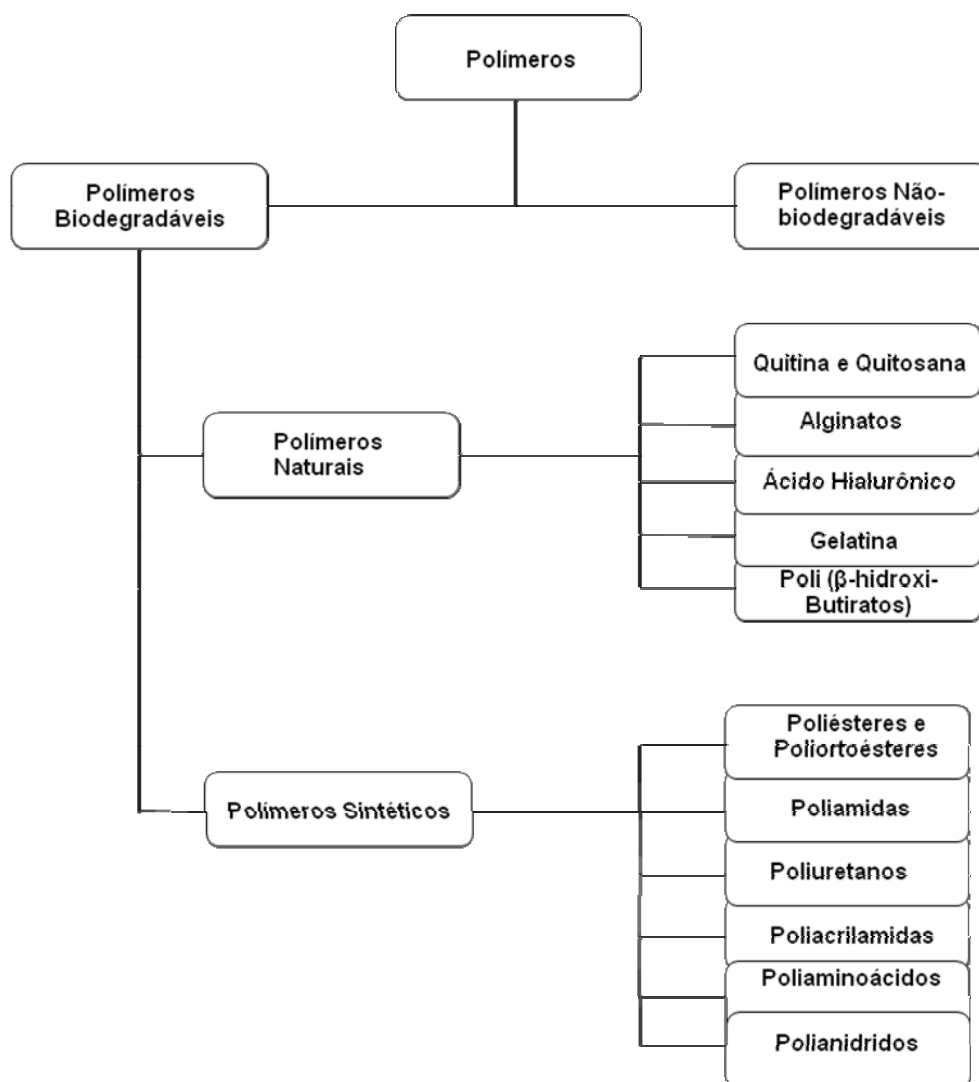


Figura 3. Classificação dos polímeros usados em sistemas de transporte de drogas.

Fonte: Adaptado de GALAEV; MATTIASSON, 2008.

Existem disponíveis no mercado atualmente três sistemas de liberação de fármacos implantáveis que utilizam polímeros como veículo, sendo todos preparados com polímeros não-biodegradáveis, são eles: O Ocusert[®], o Vitrasert[®] e o Retisert[®] (KIMURA et al., 2001; DEL AMO et al., 2008).

O primeiro implante ocular usado clinicamente foi o Ocusert[®] (Alza, EUA), introduzido no mercado em 1970 para o tratamento de glaucoma. Introduzido abaixo da pálpebra inferior, esse sistema liberou pilocarpina por uma semana através de membrana de EVA para o segmento anterior do olho (DASH et al., 1998; DEL AMO et al., 2008), não sendo utilizado para tratar doenças do segmento posterior do olho.

O Vitrasert[®] foi o primeiro dispositivo de transporte de ganciclovir implantável e foi aprovado pelo FDA em 1996. Os polímeros EVA e o PVA controlam a liberação do ganciclovir. Este implante intravítreo tem sido usado em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) para o tratamento de retinite por citomegalovírus (BOURGES et al., 2006; DEL AMO et al., 2008; JAFFE et al., 2006). Retisert[®] foi o primeiro implante contendo fluocinolona disponível no mercado e é indicado para tratamento de uveíte não infecciosa crônica que afeta o segmento posterior do olho e foi aprovado pelo FDA em 2005 (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2010).

Embora estes dispositivos demonstrem uma taxa de liberação relativamente constante, eles precisam ser removidos após liberação completa do fármaco.

Sistemas de liberação de fármacos com polímeros biodegradáveis apresentam vantagem em relação aos não-biodegradáveis por não precisarem ser removidos, uma vez que são absorvidos pelo organismo (KIMURA et al., 2001).

Há dois dispositivos implantáveis preparados com polímeros biodegradáveis em estudos de fase clínica III nos Estados Unidos. São eles: o Surodex[®] e o Posurdex[®] (DEL AMO; URTTI, 2008). O Surodex[®] (Oculex Pharmaceuticals, Inc, EUA) é um implante de PLGA contendo 60µg de dexametasona, que libera o fármaco por um período de aproximadamente 7 a 10 dias. Estudos mostraram que este implante foi seguro e efetivo na supressão de inflamação pós-operatória de cirurgia de catarata (KIMURA et al., 2001).

O Posurdex[®] (Allergan, EUA) foi desenvolvido para o tratamento de edema macular, edema macular diabético e uveítes através da liberação sustentada de dexametasona no segmento posterior do olho.

A preparação de sistemas biodegradáveis é mais complexa do que de não-biodegradáveis, pois é necessário controlar um maior número de variáveis, uma vez que muitos fatores podem interferir na cinética de degradação do polímero (DASH et al., 1998).

2.6. ESTUDOS COM IMPLANTES OCULARES PRODUZIDOS COM POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

É crescente na literatura o número de estudos que utilizam polímeros biodegradáveis como sistemas de transporte de fármacos oculares. Há também um grande número de patentes nessa área.

Estão descritos a seguir alguns estudos envolvendo implantes intra-oculares baseados em polímeros biodegradáveis.

Um implante escleral biodegradável foi desenvolvido para liberar ganciclovir no interior do olho e foram testados em coelhos para o tratamento de retinite por citomegalovírus (KUNOU et al., 1995). Os implantes foram preparados com PLA e PLGA com diferentes concentrações de ganciclovir. Os resultados *in vitro* mostraram que a liberação do fármaco a partir dos polímeros é influenciada pela composição dos polímeros, pelo seu peso molecular e pela concentração do fármaco no implante. Os implantes de PLA liberaram o fármaco nos estudos *in vitro* por cerca de 6 meses, no entanto, não foram utilizados nos estudos *in vivo* por terem apresentado um longo período de latência. Os resultados *in vivo* para implantes preparados com PLGA 75:25 mostraram que a concentração de ganciclovir foi mantida dentro da faixa terapêutica para o tratamento de retinite por citomegalovírus humana por cerca de três meses no vítreo e por cerca de 5 meses na retina/coróide. O estudo de biodegradação mostrou que todos os fragmentos do implante desapareceram do vítreo e do espaço subconjuntival cinco meses após a implantação.

Miyamoto e colaboradores (1997) avaliaram a viabilidade do uso de um implante polimérico biodegradável a base de PLGA, contendo fluconazol, um agente antifúngico, como um potencial sistema de liberação controlada do fármaco no interior do vítreo para o tratamento de endoftalmite fúngica. Os resultados *in vitro* mostraram uma liberação controlada do fármaco por quatro semanas para os implantes contendo 10, 20 e 30% do fármaco, e de cerca de uma semana para os implantes com 50% de fluconazol. A concentração do fármaco no vítreo permaneceu dentro da concentração inibitória para *Candida albicans* por três semanas após a implantação.

Kunou e colaboradores (2000) desenvolveram novos sistemas à base de misturas de PLA de peso molecular alto e baixo com a finalidade de melhorar o perfil de liberação dos implantes desenvolvidos pelo mesmo grupo em 1995. Os resultados *in vitro* mostraram uma melhora no perfil de liberação quando comparado com o estudo anterior, uma vez que a liberação foi lenta e controlada durante todo o estudo, não havendo uma liberação excessiva no final do perfil. Os resultados *in vivo* mostraram que a concentração do ganciclovir no corpo vítreo foi mantida por cerca de 24 semanas.

Um implante intra-escleral à base de PLA foi desenvolvido e avaliado quanto à viabilidade para liberação intra-ocular de fosfato de betametasona (OKABE et al., 2003). Os estudos *in vitro* demonstraram que os implantes liberaram betametasona por oito semanas. A concentração do fármaco no vítreo e na retina-coróide foi mantida dentro da concentração capaz de suprimir a resposta inflamatória por mais de oito semanas. Não se observou reação tóxica na retina e o implante apresentou boa biocompatibilidade.

Dong e colaboradores (2006) avaliaram a eficácia da implantação intravítrea de um sistema biodegradável de liberação de ciclosporina A para tratamento de uveíte crônica em coelhos. Os implantes foram preparados com ácido láctico-co-glicólico-co-policaprolactona. Os resultados mostraram que os implantes reduziram efetivamente a inflamação intraocular nos olhos dos coelhos e não apresentaram toxicidade.

Um grupo de pesquisadores brasileiros da Universidade Federal de Minas Gerais desenvolveu um implante intraocular baseado em PLGA e ciclosporina A para tratamento de uveíte posterior (SALIBA, 2008). Foi observada uma lenta e prolongada liberação *in vitro* do fármaco por cerca de 23 semanas. O mesmo grupo desenvolveu um implante biodegradável intravítreo contendo dexametasona. Dados de estudos *in vitro* mostraram uma liberação de 93% da dexametasona em 25 semanas. Os estudos pré-clínicos realizados mostraram uma liberação do fármaco, em quantidades adequadas, por um período de 8 semanas. Além disso, alterações nas estruturas oculares e na anatomia da retina não foram notadas durante o período de avaliação (FIALHO et al., 2005).

2.7. POLÍMEROS E CO-POLÍMEROS DERIVADOS DO ÁCIDO LÁTICO E GLICÓLICO

A família de homo e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico tem recebido considerável atenção desde cerca de 1973 como excipientes para o transporte da fármacos. Características como biocompatibilidade, previsibilidade da cinética de biodegradação, a facilidade de fabricação e da aprovação regulatória em aplicações de sutura comercial atraiu a atenção de pesquisadores quanto às possíveis aplicações destes polímeros em tecnologia farmacêutica (LEWIS, 1990).

Entre os primeiros relatos sobre o uso desses polímeros para liberação controlada de fármacos estão os trabalhos de Wise e colaboradores (1976), intitulado “Liberação sustentada de uma droga antimalárica usando um copolímero de ácido lático/glicólico” e de Becke e colaboradores (1979) cujo título era “Novo sistema contraceptivo de microcápsula de longa duração injetável” (LEWIS, 1990). Para sistemas de transporte de fármacos oculares, os materiais poliméricos têm sido extensivamente investigados nas duas últimas décadas (FIALHO et al., 2005).

Os poliésteres, representados principalmente pelo PLA e PLGA são os mais largamente utilizados como componentes de sistemas de liberação controlada de fármacos oculares.

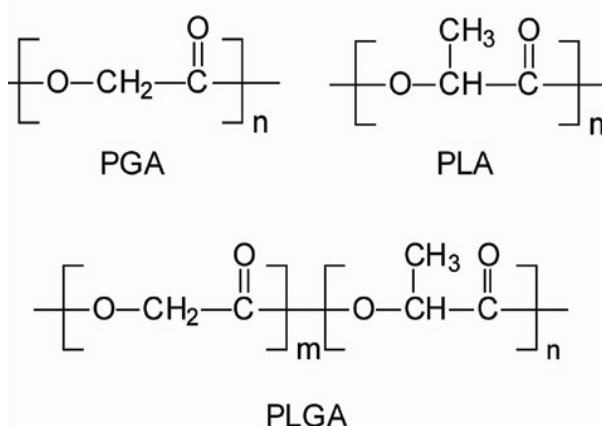


Figura 4. Estrutura química dos polímeros do ácido glicólico (PGA), do ácido lático (PLA) e do copolímero do ácido lático e glicólico (PLGA).

Os polímeros e copolímeros derivados do ácido lático e glicólico são sintetizados por uma reação de condensação, através da abertura do anel dos dímeros cíclicos (ácido lático e/ou glicólico) (JAIN et al., 1998). A Figura 5 mostra a síntese do PLGA.

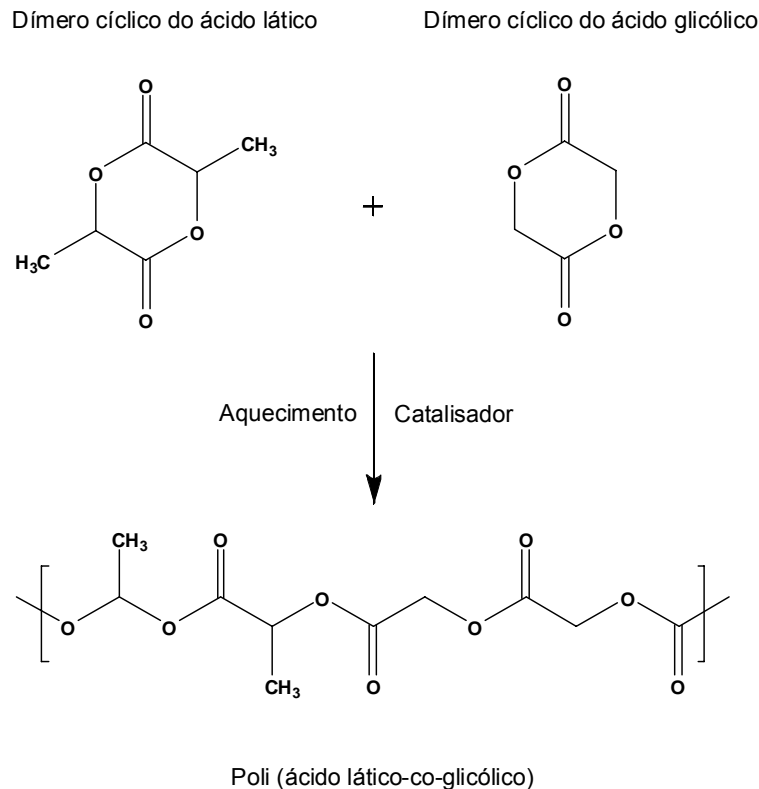


Figura 5. Síntese do polímero poli (ácido lático-co-glicólico).

Fonte: Adaptado de UCHEGBU; SCÄTZLEIN, 2006.

A degradação desses polímeros ocorre por erosão, através da hidrólise das ligações éster. Os monômeros liberados são eliminados pelo organismo através do ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (ATHANASIOU et al., 1996).

A presença de um carbono assimétrico na estrutura do ácido lático permite a obtenção das formas levóginas (L-PLA), dextróginas (D-PLA) ou racêmicas (D,L-PLA). O arranjo das cadeias poliméricas do PLA na forma racêmica é menos regular do que das formas levóginas e dextróginas, e essa desorganização aumenta ainda mais com a introdução do ácido glicólico. Por este motivo, o (D,L-PLA) e o PLGA são estruturas amorfas, enquanto (L-PLA) e o (D-PLA) são semicristalinos (UCHEGBU; SCÄTZLEIN, 2006).

A hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade dos polímeros são determinadas pela proporção de ácido láctico e ácido glicólico na sua constituição. Devido à presença do grupo metila (CH_3) no polímero derivado do ácido láctico (PLA) (Figura 4), este apresenta maior hidrofobicidade do que o polímero derivado do ácido glicólico (PGA) (LEWIS, 1990). Assim, quanto maior a proporção de ácido láctico, maior será a hidrofobicidade do copolímero e menor será o tempo de degradação (FIALHO et al., 2003).

O tamanho da cadeia e a massa molecular dos polímeros também interferem no perfil de degradação e de liberação de substâncias incorporadas, como mostrado por Kunou e colaboradores (2000) ao avaliar a variação no perfil de liberação do fármaco ganciclovir a partir de sistemas a base do polímero PLA com diferentes massas moleculares.

A degradação desses polímeros pode também ser influenciada por fatores físicos e químicos tais como pH, força iônica, temperatura, cristalinidade e a presença de fármacos. No caso dos implantes, o método de preparo interfere na velocidade de degradação do sistema e no perfil de liberação dos fármacos neles incorporados, uma vez que diferentes métodos de preparação fornecem implantes com diferentes estruturas de microporos (FIALHO et al., 2005).

A transição vítrea (T_g) é uma importante propriedade dos polímeros amorfos. Para o PLGA a T_g aumenta com o aumento do peso molecular e conteúdo de ácido láctico. Fisicamente, os polímeros existem em um “estado vítreo” (estrutura relativamente rígida) abaixo da T_g e acima da T_g apresentam-se como “borrachas” (UCHEGBU; SCÄTZLEIN, 2006). A T_g dos polímeros PLA e PLGA encontram-se acima da temperatura fisiológica (37°C), ou seja, nessa temperatura os polímeros se apresentam como uma estrutura rígida que lhes proporciona uma força mecânica significativa e permite que eles sejam usados como sistemas de liberação controlada de fármacos. O PGA por sua vez é inadequado para uso em sistemas de liberação de fármacos por ser bastante hidrofílico e conseqüentemente bastante sensível à hidrólise e, além disso, apresentam T_g muito próxima da temperatura corporal (FIALHO et al., 2003).

De acordo com estas informações, entende-se que diversos fatores interferem na velocidade de degradação dos polímeros e conseqüentemente nos perfis de liberação dos fármacos incorporados nos sistemas poliméricos.

2.8. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os implantes envolvidos nesse estudo representam um sistema matricial, onde o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz polimérica ou adsorvido na superfície, e a sua liberação ocorre por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos (Figura 6).

Difusão

Quando a degradação do polímero é muito mais lenta do que a difusão do fármaco, a liberação inicial deste depende da difusão da droga através do polímero.

A difusão é o processo pelo qual a matéria é transportada de um local para outro situado no interior do próprio sistema e resulta de movimentos moleculares aleatórios, que ocorrem em pequenas distâncias (MANADAS *et al.*, 2002 apud COSTA; LOBO, 1999).

A velocidade de difusão obedece à lei de Fick, ou seja, a velocidade de variação de concentração de material dissolvido com o tempo é diretamente proporcional à diferença de concentração entre os dois lados da camada de difusão (AULTON, 2005). A equação matemática que traduz a lei de Fick está representada a seguir:

$$\frac{dQ}{dt} = -D \frac{dC}{dX}$$

Onde dQ/dt representa a velocidade de difusão, Q , a massa de fármaco transportada, t , o tempo, C , a concentração da substância que se difunde, X , a coordenada espacial medida perpendicularmente à seção e D , o coeficiente de difusão. O sinal negativo indica que o fluxo está na direção de redução de concentração, ou seja, diminuindo o gradiente de concentração.

A difusão em muitos polímeros não é adequadamente descrita pela lei de Fick ou por expressões dela derivadas, expressões essas dependentes da

concentração e com condições de fronteira constantes. Isto se verifica principalmente quando a substância penetrante provoca no polímero grande aumento de volume, como é o caso dos plastômeros (“glassy polymers”), que apresentam comportamento não-Fickiano ou anômalo. Pelo contrário, nos elastômeros (“rubbery polymers”) a difusão segue geralmente a lei de Fick (MANADAS et al., 2002 apud COSTA; LOBO, 1999).

Degradação/Erosão

A degradação é definida como um processo que leva ao rompimento de cadeias oriundas da sua clivagem, formando oligômeros e, posteriormente, monômeros. A erosão é conceituada como sendo a saída da porção clivada para o meio externo, levando a desestruturação da matriz.

Os diferentes modos como a erosão ocorre condicionam fortemente o perfil de liberação do fármaco (MANADAS et al., 2002). Quando o fármaco está bem imobilizado na matriz polimérica de modo que a sua difusão seja mínima e a erosão da matriz é relativamente rápida, a liberação do fármaco pode ser controlada pela erosão do polímero (KIMURA et al., 2001).

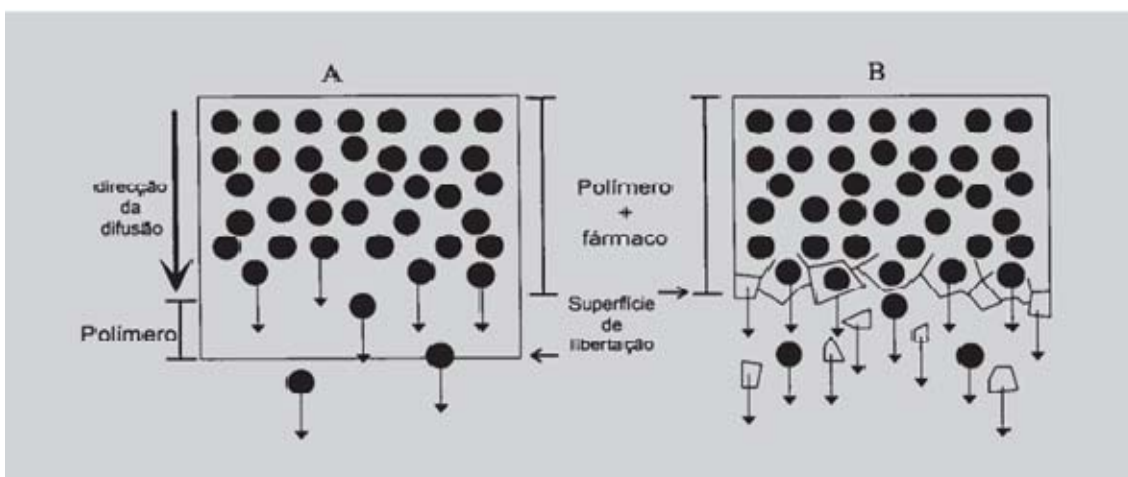


Figura 6. Processo de difusão (A) e erosão (B) em matriz polimérica.

Fonte: MANADAS et al., 2002.

Lao e colaboradores (2008) criaram modelos matemáticos para prever a liberação de fármacos a partir de polímeros biodegradáveis. Os seus resultados mostraram que a liberação de fármacos de polímeros biodegradáveis segue basicamente uma seqüência de três passos:

- 1) O solvente penetra no interior da matriz;
- 2) Ocorre um relaxamento das cadeias poliméricas dependente da degradação que cria mais volume livre para dissolução do fármaco;
- 3) Ocorre uma remoção do fármaco para o meio circundante pelo processo de difusão.

O perfil de liberação exato varia e depende de fatores tais como a natureza do fármaco, taxa de degradação do polímero, permeabilidade da água e interação fármaco-matriz polimérica. Os passos mais lentos tornam-se o fator limitante e controlam a taxa de liberação (LAO et al., 2008).

A liberação do fármaco de uma formulação é o primeiro passo para a atividade terapêutica de um medicamento.

O ensaio físico que prevê a liberação de um fármaco para uma determinada área numa determinada quantidade em relação ao tempo é a dissolução (MANADAS et al., 2002).

Os ensaios de dissolução são uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento farmacêutico e no controle de qualidade (LOPES et al., 2005).

O estudo de dissolução em formulações de liberação controlada ou modificada vem sendo expandido devido à variedade de novas formas farmacêuticas tais como suspensões, supositórios, comprimidos de desintegração oral, preparações tópicas semisólidas, adesivos transdérmicos, comprimidos mastigáveis, implantes, formulações injetáveis de micropartículas, lipossomas, entre outras.

Para produtos de administração oral e liberação imediata, o teste costumeiro é chamado teste de dissolução, enquanto que para formas farmacêuticas de liberação modificada ou não convencionais, como é o caso dos implantes em estudo, o termo liberação *in vitro* é mais adequado do que o termo dissolução. Diferentes procedimentos, aparatos e técnicas são empregados, caso a caso (SIEWERT et al., 2003).

Os princípios que norteiam o teste de dissolução para formas sólidas orais também podem ser aplicados no desenvolvimento de um ensaio de liberação *in vitro* de formas farmacêuticas especiais (SIEWERT et al., 2003).

Os ensaios de dissolução/liberação *in vitro* evoluem à medida que surgem novas formas farmacêuticas. O método do cesto rotativo foi o primeiro a ser aceito oficialmente, pouco tempo depois um outro método foi também aceito, sendo descrito como o método das pás. À medida que novos fármacos e novas formas farmacêuticas são desenvolvidos, novos problemas e desafios também surgem e novos métodos para avaliação da dissolução/liberação *in vitro* são desenvolvidos.

A Farmacopéia Americana (USP) reconhece 7 aparatos para estudo de dissolução/liberação *in vitro*. O tipo de forma farmacêutica é o parâmetro primário na seleção do tipo de aparato.

Classificação dos aparatos de acordo com a USP:

Aparato 1; cesta rotatória

Aparato 2: pá agitadora

Aparato 3: cilindros recíprocos

Aparato 4: célula de fluxo contínuo

Aparato 5: pá sobre disco

Aparato 6: cilindro rotatório

Aparato 7: disco recíproco

Os aparatos 1 e 2 são os mais amplamente utilizados em todo o mundo, principalmente porque eles são simples, robustos, devidamente padronizados e possuem amplo uso experimental. Por causa dessas vantagens, eles são geralmente a primeira escolha para o ensaio de dissolução *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas (tanto de liberação imediata, bem como de liberação modificada). O número de monografias encontrado na USP para o aparato 2 agora é superior à do aparato 1 (DRESSMAN; KRÄMER, 2005).

Hoje, com uma grande variedade de formas farmacêuticas sendo produzidas, principalmente de liberação modificada, tais como os implantes, os aparatos 1 e 2 não abrangem todos os estudos de dissolução desejados (DRESSMAN; KRÄMER, 2005).

O aparato 4 (célula de fluxo contínuo) e suas modificações tem sido descrita como um método para avaliar a liberação *in vitro* a partir de implantes e de outras formas tais como supositórios, semi-sólidos, pós, grânulos, formulações microparticuladas, entre outras (SIEWERT et al., 2003).

A célula de fluxo contínuo é considerada como um instrumento promissor para as formulações como os implantes e outras formas farmacêuticas de liberação prolongada, bem como para formas de liberação imediata de compostos pouco solúveis e continua a crescer em termos de aceitação e aplicação na indústria farmacêutica (DRESSMAN; KRÄMER, 2005). No entanto há uma grande variedade de implantes sendo desenvolvidos e já presentes no mercado, como por exemplo, os implantes contraceptivos subdérmicos, com variadas formas, funções diversas e diferentes locais de aplicação, não existindo um único aparato que avalie a liberação a partir desta forma farmacêutica. Além disso, devido às peculiaridades do olho e ao caráter inovador dos implantes oculares, ainda não existe um aparato e um método oficial que abranja a liberação *in vitro* dos implantes oculares.

Os estudos sobre liberação de fármacos oculares a partir de implantes utilizam técnicas adaptadas, uma vez que ainda não existe uma metodologia oficial. Alguns exemplos são os estudos de Okabe e colaboradores (2003) que utilizaram para a avaliação *in vitro* de fosfato de betametasona a partir de implantes intra-esclerais preparados com PLA a seguinte metodologia: o implante foi colocado em frasco fechado contendo 2 mL de tampão salina pH 7,4 e incubado à temperatura de 37°C sob agitação. Em intervalos de tempo pré-determinados todo o meio era coletado e 2 mL de meio fresco era adicionado nos frascos. A quantidade de fosfato de betametasona liberado no meio foi quantificada por CLAE. Saliba e colaboradores (2008) utilizaram metodologia semelhante para avaliar a liberação de ciclosporina A de implante intra-ocular baseado em PLGA.

2.9. ESTUDOS DE DIFUSÃO ESCLERAL DE FÁRMACOS

As células de difusão vertical tipo Franz são um aparato não oficial (não farmacopéico), mas extensamente utilizado para estudos de liberação *in vitro* de formas tópicas semi-sólidas, tais como cremes, pomadas e géis de aplicação cutânea (SIEWERT et al., 2003).

As células de Franz consistem basicamente de um compartimento doador e um compartimento receptor, que são separados por uma membrana

(biológica ou sintética). O produto a ser testado fica no compartimento doador sobre a membrana, enquanto que no compartimento receptor fica o meio de liberação. A liberação do fármaco é avaliada pela quantificação das amostras coletadas no meio de liberação presente no compartimento receptor. Para experimentos de liberação, normalmente se utilizam membranas artificiais para separar fisicamente o compartimento doador do receptor. O meio receptor deve ser agitado para garantir uniformidade da difusão e homogeneidade da concentração. Como a difusão é influenciada pela temperatura, o meio receptor deve permanecer a uma temperatura constante (KLIMUNDOVA et al, 2006). Para estudos de permeabilidade e difusão *in vitro* geralmente se utilizam membranas biológicas.

Células de Franz modificadas têm sido utilizadas para estudo de permeabilidade transcorneal de formas farmacêuticas oculares tópicas (TEGTMEYER et al, 2001; REICHL et al., 2004; REICHL et al., 2005; GUPTA et al, 2010).

Mora e colaboradores (2005) avaliaram a difusão escleral do acetato de triancinolona através de células de difusão tipo Franz, utilizando esclera humana. Os resultados mostraram a viabilidade da esclera durante todo o estudo, não se observando nenhuma alteração histológica significativa na esclera após os 7 dias de estudo.

2.10. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O perfil de liberação de um determinado fármaco está relacionado com modificações do sistema como um todo. Essas modificações são determinadas pelas propriedades físico-químicas do material polimérico empregado e do fármaco presente no sistema. Desta forma é de grande importância avaliar essas propriedades, uma vez que elas irão definir o perfil de liberação do fármaco a partir do implante polimérico desenvolvido.

Diversas técnicas, tais como análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X e espectroscopia no infravermelho, são descritas na literatura para caracterização e para estudos de interação fármaco-polímero.

As técnicas termoanalíticas (análise térmica) têm sido amplamente utilizadas para caracterização de materiais farmacêuticos. Esta técnica pode ser útil para obter informações sobre as interações polímero-droga, para investigar o efeito do processo de produção nessas interações e realizar estudos de pré-formulação das formas farmacêuticas (SILVA-JÚNIOR et al., 2008).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC - do inglês "Differential Scanning Calorimetry") é uma das técnicas termoanalíticas mais utilizadas. Esta técnica tem sido aplicada na área farmacêutica na determinação de pureza, no estudo de estabilidade térmica e oxidativa, no estudo de polimorfismo de fármacos, na caracterização de materiais amorfos, no estudo de processos físico-químicos de polímeros, no estudo de interação fármaco-polímero, entre outras aplicações (BERNAL et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A DSC é uma técnica que mede a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e um material de referência durante o processo de aquecimento/resfriamento.

Nesta técnica, a amostra a ser investigada e um material de referência são colocados em dois cadinhos dispostos sobre uma base de um metal altamente condutor, geralmente platina, e sob temperatura controlada e são aquecidos concomitantemente. Um sistema de controle aumenta imediatamente a energia fornecida para a amostra ou para referência, dependendo do processo envolvido ser endotérmico ou exotérmico, com a finalidade de manter a amostra e referência com a mesma temperatura (LUCAS et al., 2001).

A Figura 7 mostra uma curva típica de DSC, onde as áreas sob os picos são proporcionais às variações de entalpia que ocorrem em cada transformação. Três tipos básicos de transformações podem ser detectados: transformações endotérmicas (por exemplo: temperatura de fusão T_f), transformações exotérmicas (por exemplo: temperatura de cristalização T_c), e transições de segunda ordem. Um exemplo de transição de segunda ordem é a transição vítrea, T_g , na qual a entalpia não sofre variação, mas o calor específico sofre uma mudança repentina (LUCAS et al., 2001).

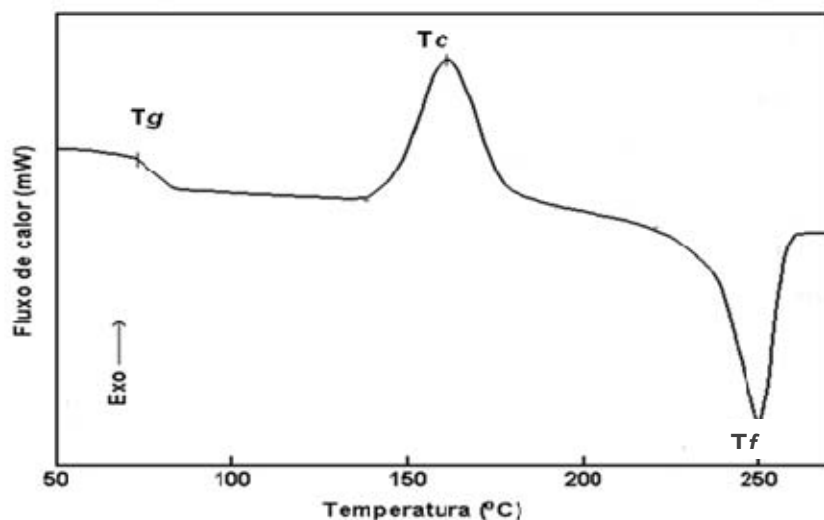


Figura 7. Curva típica de DSC.

Fonte: LUCAS et al., 2001.

2.11. INDOMETACINA

2.11.1. Propriedades físico-químicas

A indometacina é estruturalmente um ácido indolacético metilado de nome químico ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metóxi-2-metilindol-3-il]acético (Figura 8). Apresenta peso molecular 357,8 e caracteriza-se como um pó cristalino, inodoro, de coloração branco-amarelada (REYNOLDS, 1993).

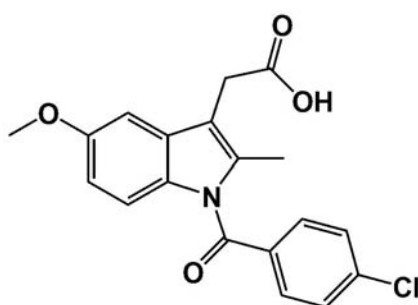


Figura 8. Estrutura química da indometacina.

São descritas duas formas polimórficas principais para a indometacina: a forma α (forma polimórfica I) e a forma γ (forma polimórfica II) (SLAVIN et al., 2002). A forma γ é termodinamicamente mais estável, como demonstrado por

dados de DSC obtidos por Hancock e Parks (2000) onde a forma γ apresentou ponto de fusão de 162°C e a forma α apresentou ponto de fusão de 156°C.

A indometacina é muito pouco solúvel em água, sendo esta solubilidade dependente de pH e sua constante de dissociação (pKa) é 4,5 (ZHU et al., 2006). Apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, pertencendo à classe II do sistema de classificação biofarmacêutica, considerando-se a permeabilidade gastrintestinal.

2.11.2. Propriedades farmacológicas

A indometacina é um antiinflamatório não esteróide que inibe a síntese das prostaglandinas e apresenta conhecida eficácia na diminuição da irritação intra-ocular e no tratamento e prevenção de edema macular cistóide após extração de catarata (FRONZA et al., 2004).

Miyake e colaboradores (1980) encontraram significativa melhora da acuidade visual em pacientes tratados com indometacina por dois meses após cirurgia de catarata quando comparado a pacientes não tratados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar as características de liberação e a difusão escleral de indometacina, antiinflamatório não-esteroidal, a partir de implantes oculares, utilizando abordagens *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Validação da metodologia analítica de quantificação da indometacina nos meios de liberação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Caracterização térmica da indometacina, dos polímeros e dos implantes por meio de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).
- Avaliação *in vitro* do perfil de liberação de indometacina dos implantes biodegradáveis através de aparato de dissolução 1 (cesta) e avaliação da difusão escleral a partir dos implantes utilizando células de difusão tipo Franz;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

- Indometacina (substância química de referência), teor de pureza mínimo de 99% (Sigma Aldrich);
- Indometacina matéria-prima (Galena Química e farmacêutica);
- Poli(ácido D,L-lático) (PLA) (Resomer[®] R 202 S, Boehringer Ingelheim, Alemanha);
- Poli (ácido D,L-lático-co-glicólico) (PLGA) na proporção de 50:50 (Resomer[®] RG 502 H, Boehringer Ingelheim, Alemanha);
- Solução salina balanceada (Accosol, Acco[®]) (Ver composição no item 3.2.1);
- Fosfato de potássio monobásico (Dinâmica)
- Ácido fórmico 85% (Dinâmica);
- Acetonitrila grau CLAE (Tedia, EUA);
- Água ultra pura (Purelab Option-Q, Elga);

4.2. MÉTODOS

4.2.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de UV foi o método escolhido para a quantificação da indometacina nas amostras dos implantes e nos meios de liberação. Esta técnica foi escolhida por apresentar seletividade e sensibilidade adequada à aplicação do método e para adequá-la posteriormente para os ensaios *in vivo*.

Meios utilizados na validação

A validação para quantificação da indometacina foi realizada em dois meios:

- Solução tampão fosfato pH 7,4

- Solução Salina Balanceada (BSS – Balanced Salt Solution)

Estes meios foram empregados nos estudos de liberação *in vitro* em aparato de dissolução e de difusão escleral em células de Franz, respectivamente.

A solução tampão fosfato foi preparada com água ultra pura e fosfato de potássio monobásico, ajustando-se o pH para 7,4 com solução de hidróxido de sódio.

A solução salina balanceada usada foi uma solução comercial estéril utilizada para irrigação de tecidos intra-oculares, apresentando pH de aproximadamente 7,4 e a seguinte composição:

- Cloreto de sódio - 0,64%
- Cloreto de potássio - 0,075%
- Cloreto de cálcio - 0,048%
- Cloreto de magnésio - 0,03%
- Acetato de sódio - 0,39%
- Citrato de sódio - 0,17%
- Água para injeção

Equipamentos e condições cromatográficas

A validação da metodologia para quantificação da indometacina foi realizada em dois cromatógrafos.

Para o meio solução tampão fosfato pH 7,4 utilizou-se cromatógrafo líquido da Shimadzu, equipado com duas bombas modelo LC – 6AD, injetor Rheodyne, detector de arranjo de diodo modelo SPD – M10AVP, controlador do sistema modelo SCL – 10AVP, programa CLASS VP (EQUIPAMENTO 1).

As análises para validação no meio solução salina balanceada (BSS) foi realizada em cromatógrafo líquido da Shimadzu equipado com uma bomba (LC-10AD) e válvula solenóide (FCV-10ALvp), detector de UV-Vis (SPD-10AVvp), degaseificador modelo DGU-14h, forno para coluna (CTO-10ASvp), auto-injetor (SIL-10ADvp) e controlador do sistema (SCL-10Avp) (EQUIPAMENTO 2).

A separação cromatográfica em ambos os equipamentos foi realizada com uma coluna de fase reversa do tipo C-18 de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partícula de 5 μ m (Gemini[®], Phenomenex, EUA).

As condições cromatográficas mais adequadas para a quantificação da indometacina em ambos os meios estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1. Condições cromatográficas adotadas

Fase móvel	ACN: Ácido fórmico 0,1% (60:40 % v:v)
Volume de injeção	20 μ L
Fluxo da fase móvel	1mL/min
Modo do fluxo	Isocrático
Comprimento de onda no UV	250nm

A fase móvel foi acidificada para aumentar o tempo de retenção do fármaco e melhorar a simetria do pico. A fase orgânica (acetonitrila) foi degaseificada por 20 minutos em banho de ultrassom e a fase aquosa (ácido fórmico 0,1%) foi submetida à filtração à vácuo em membrana de poro de 0,45 μ m e degaseificada por 10 minutos em banho de ultrassom.

Preparo da solução padrão

Os parâmetros de validação foram determinados pela análise de soluções do padrão de indometacina preparadas a partir de diluições da solução-mãe. A solução-mãe foi preparada a partir da massa exata de aproximadamente 25,0 mg de indometacina padrão primário dissolvida em 25 mL de acetonitrila, de forma a se obter uma solução de concentração de 1mg/mL.

Parâmetros de validação

A validação da metodologia foi realizada segundo as recomendações da Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e de detecção.

4.2.1.1. Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente o composto desejado na presença de outros compostos, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas das matrizes isentas do fármaco e das matrizes contendo o fármaco, ou seja, avaliou-se os cromatogramas dos implantes de PLGA e PLA contendo a indometacina e isentos de indometacina nos dois meios de liberação (Solução tampão fosfato PH 7,4 e BSS). Para isto, solubilizou-se os polímeros PLA e PLGA sem indometacina e contendo indometacina em acetonitrila e depois diluiu-se nos meios de liberação. No caso dos polímeros contendo indometacina a concentração teórica final foi de 10µg/mL.

Além disso, para se avaliar possíveis produtos de degradação, foram analisados os cromatogramas dos polímeros PLA e PLGA (adicionados aos meios solução tampão fosfato pH 7,4 e BSS numa concentração de 2,5mg/mL) e da indometacina (adicionada ao BSS numa concentração de 0,5mg/mL) submetidos à 40°C sob agitação constante por uma semana. Após esse período, as soluções dos polímeros foram filtradas em membrana de 0,45µm de poro e injetados no CLAE. A solução de indometacina, após uma semana, foi diluída para 25µg/mL e injetada no cromatógrafo.

4.2.1.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

A linearidade foi determinada pela análise de 6 concentrações diferentes em triplicatas. As concentrações para o meio tampão fosfato pH 7,4 foram preparadas através de diluições da solução-mãe neste mesmo meio, obtendo-se as seguintes concentrações: 0,25, 1, 2,5, 5, 10 e 20 µg/mL e para o meio BSS, alíquotas da solução foram diluídas em BSS, obtendo-se as seguintes concentrações: 0,5, 1, 5, 10, 30 e 50 µg/mL. A linearidade foi avaliada pelo valor do critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r^2) que deve ser maior ou igual a 0,99 para métodos analíticos, de acordo com a RE nº 899 da ANVISA.

4.2.1.3. Exatidão e precisão

A exatidão é a determinação da proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão: } \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A precisão é a determinação da proximidade dos resultados obtidos de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

A precisão foi avaliada em dois níveis: (1) repetibilidade (precisão intra-corrida ou intra-dia) é a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; (2) precisão intermediária (precisão inter-corridas ou inter-dia) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes, indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos. A precisão foi expressa como desvio

padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula abaixo, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

Para a avaliação da precisão e da exatidão, foram preparadas três concentrações (BAIXA, MÉDIA e ALTA) da indometacina padrão de referência: 1, 10 e 20 µg/mL para o meio tampão fosfato de potássio pH 7,4 e 0,5, 10 e 50 µg/mL para BSS. Cada concentração foi preparada em triplicata e foram analisadas em três dias diferentes. A quantificação das concentrações preparadas foi feita através da equação da reta da curva de calibração do padrão de referência.

4.2.1.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectada, mas não quantificada, enquanto que o LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O LD foi expresso como:

$$LD = \frac{Dpa}{IC} \times 3$$

O LQ foi determinado através da equação:

$$LQ = \frac{Dpa}{IC} \times 10$$

Onde:

- *DPa* é o desvio padrão do intercepto obtido dos coeficientes lineares das equações da reta de três curvas de calibração.
- *IC* representa a média dos coeficientes angulares das curvas.

4.2.1.5. Análise Estatística

As análises estatísticas descritas nos resultados de validação do método analítico foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 4.00 (GraphPad Inc, EUA). O nível de significância considerado foi de 95% ($p < 0,05$).

4.2.2. ANÁLISES DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas de DSC da indometacina padrão de referência e matéria-prima, dos polímeros PLGA 50:50 e PLA e das misturas liofilizadas dos polímeros e indometacina na proporção polímero:fármaco (2:1) foram obtidas através de um Calorímetro SHIMADZU, modelo DSC-50, calibrado com padrão índio.

Para esta análise, 2 mg de cada amostra foram pesados, selados em cadinho de alumínio e aquecidos até 200 °C numa razão de 10 °C/minuto para os polímeros e misturas liofilizadas do polímero + fármaco e de 5, 10 e 20 °C/minuto para a indometacina padrão e matéria-prima. As amostras foram analisadas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min sob atmosfera de Nitrogênio (50 mL/min). As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.3. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E DIFUSÃO ESCLERAL

4.2.3.1. AMOSTRAS

As amostras dos implantes utilizadas nos estudos de liberação *in vitro* e de difusão escleral foram fornecidas pela empresa 3T Biopolímeros.

Os polímeros utilizados no desenvolvimento dos implantes foram o PLA e o PLGA. Os sistemas desenvolvidos com os dois polímeros apresentavam 33,3% p/p de indometacina, ou seja, a proporção polímero: fármaco em ambas as formulações era de 2:1 p/p. Os sistemas foram produzidos de acordo com protocolos desenvolvidos por De Carvalho e colaboradores (2006).

O processo de obtenção dos implantes foi a liofilização. As misturas do fármaco e polímero foram liofilizadas no interior de dispositivos de silicone, que em conjunto com o liofilizado formam os implantes. Os silicones possuem uma curvatura adequada à curvatura ocular (Figura 9).

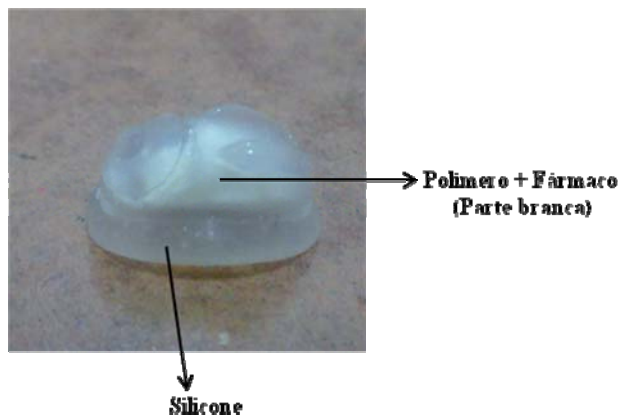


Figura 9. Foto do implante escleral

Os implantes utilizados no presente estudo foram formulados com polímeros biodegradáveis e desenvolvidos para serem implantados sobre a esclera (Figura 10). A função do silicone é garantir a fixação do implante na esclera e permitir uma liberação unidirecional do fármaco, evitando que ocorra uma exposição excessiva do tecido circunjacente (no caso do olho, o tecido periocular) ao fármaco, quando este não é o alvo ou sequer hospedeiro do processo patológico.

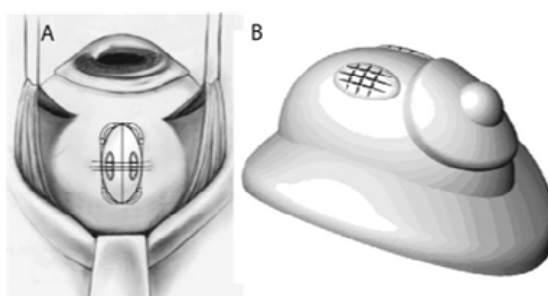


Figura 10. Esquema representando a localização do implante no olho.

(A) Implante suturado no globo ocular; (B) Silicone.

Fonte: De Carvalho et al., 2006.

4.2.3.2. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE INDOMETACINA PRESENTE NOS IMPLANTES

Antes dos estudos de liberação *in vitro* e de difusão escleral foi determinado o teor de indometacina presente nas amostras dos implantes contendo PLA e PLGA.

Para esta análise três implantes produzidos com PLA e três produzidos com PLGA foram pesados e dissolvidos em 10 mL de acetonitrila separadamente. As soluções obtidas foram diluídas, filtradas e quantificadas por CLAE através de curva de calibração do padrão de indometacina. Os valores foram reportados com Média \pm DP da massa de indometacina presente nos implantes.

4.2.3.3. EXPERIMENTOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO APARATO DE DISSOLUÇÃO

Essa etapa foi realizada em Dissolutor Vankel, Carry 50, Varian. As condições de teste foram as seguintes:

Meio de Dissolução: Tampão Fosfato de Potássio pH 7,4

Aparato 1: Cesta

Volume: 150 mL

Temperatura: 37°C \pm 0,5°C

Velocidade: 50rpm

Tempo: Indeterminado

Foram adaptadas ao dissolutor cubas com capacidade para 250 mL. As dimensões das cubas estão mostradas na Figura 11 e estão expressas em milímetros.

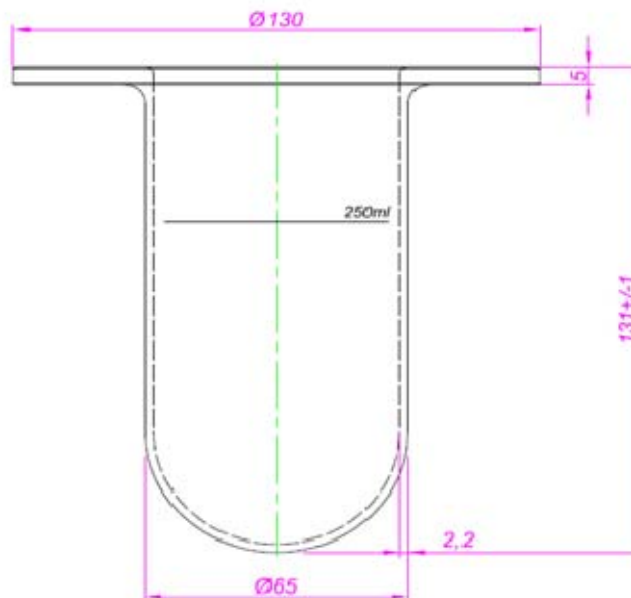


Figura 11. Representação da cuba utilizada nos ensaios de liberação em aparato de dissolução. Dimensões da cuba: altura: 131 mm, largura: 65 mm e diâmetro do colar superior: 130 mm.

Três implantes de cada formulação (PLA + indometacina 2:1 e PLGA + indometacina 2:1) foram pesados e transferidos para 3 cestas contendo 150 mL de solução tampão fosfato pH 7,4. As cestas ficaram imersas no meio de dissolução sendo agitadas a uma velocidade constante de 50 rpm em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Em intervalos de tempo pré-determinados (a cada 24h), todo o meio de liberação era coletado e uma alíquota era filtrada em membrana de $45\mu\text{m}$ de poro para posterior quantificação por CLAE. Após cada coleta, 150 mL de meio de mesma constituição eram repostos.

Os dados foram reportados como média \pm desvio padrão da porcentagem de liberação cumulativa.

4.2.3.4. ESTUDO DA DIFUSÃO ESCLERAL DA INDOMETACINA

Neste estudo foram utilizadas células de difusão vertical tipo Franz (PermeGear®, EUA) com curvatura adequada à curvatura ocular (Figura 12).

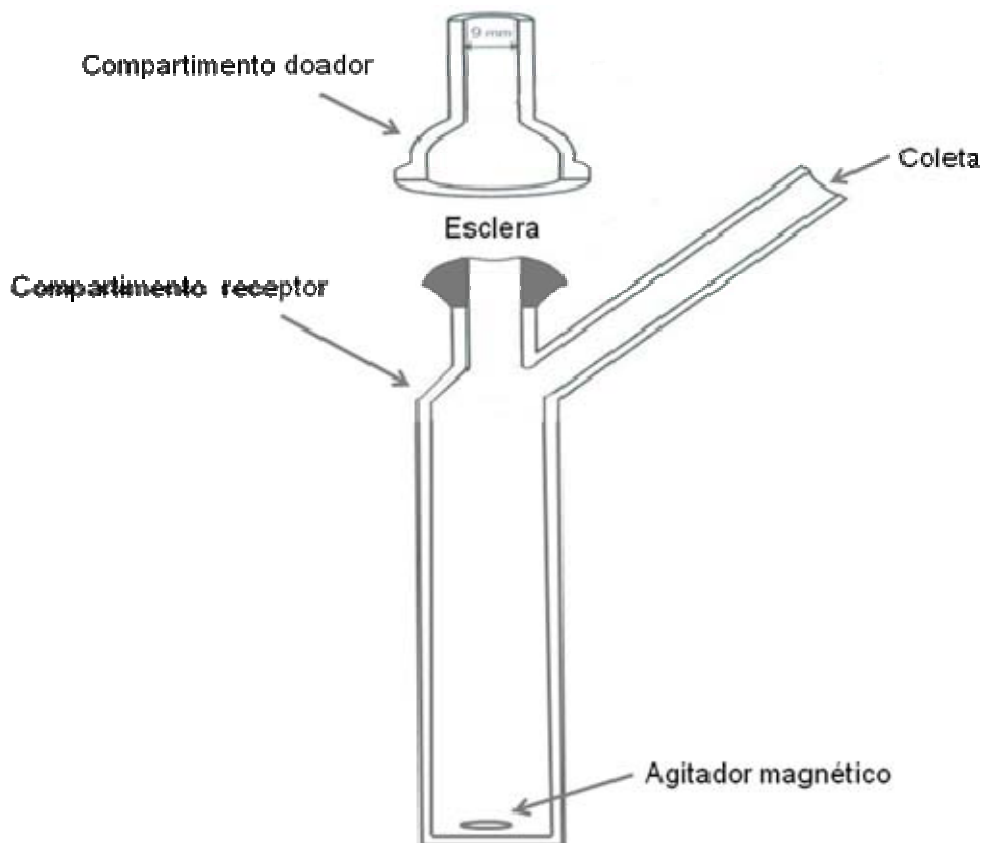


Figura 12. Representação esquemática da Célula de Franz utilizada no estudo

As câmara de Franz eram constituídas de um compartimento doador que apresentava diâmetro interno de 9 mm e de um compartimento receptor com volume de 5 mL.

Membrana utilizada nos estudos de difusão escleral

Os procedimentos experimentais deste estudo e do projeto “Avaliação *in vitro* e *in vivo* das características de liberação de fármacos a partir de dispositivos implantáveis” foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF/UFPB sob certidão de número 0611/09.

Foram utilizadas como membrana para separar o compartimento doador do compartimento receptor escleras de coelhos pigmentados adultos utilizados como animais de grupos controle em estudos realizados no biotério Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB. Após os coelhos serem sacrificados, os olhos eram enucleados e congelados a -20°C .

Antes dos estudos, as escleras eram separadas dos demais tecidos oculares com auxílio de materiais cirúrgicos e eram cortadas em forma aproximada de discos de cerca de 12 mm de diâmetro, evitando-se o nervo óptico. Após obtenção dos discos, foram feitas inspeções visuais para verificar a presença de orifícios nas escleras. Verificando-se a ausência de perfurações, as escleras eram montadas nas células de Franz com sua parte externa voltada para o compartimento doador e a parte interna voltada para o compartimento receptor.

A superfície escleral exposta e envolvida na difusão tinha um diâmetro de 9 mm e área difusional de $0,63\text{cm}^2$, ficando toda a superfície do implante em contato com a parte externa da esclera.

Procedimento

Os implantes foram colocados no compartimento doador sobre a esclera e o compartimento receptor foi preenchido com 5mL de BSS.

As células de Franz foram interligadas a um banho estabilizado em aproximadamente $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e dispostas nos respectivos pontos de uma placa magnética, promovendo agitação constante do meio receptor.

Os experimentos seguiram os mesmos intervalos de coleta dos experimentos de dissolução. Sendo todo o meio coletado através do orifício mostrado na figura 12. Após a coleta, o meio era filtrado em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro e novo meio de mesma constituição era repostado.

Os dados foram reportados como média \pm desvio padrão da concentração cumulativa da indometacina no compartimento receptor em função do tempo de difusão.

Coeficiente de permeabilidade

Para os experimentos de difusão *in vitro*, o coeficiente de permeabilidade de esclera de coelho (P) foi calculado baseado no aparecimento do fármaco no compartimento receptor, de acordo com a equação baseada na lei de difusão passiva de Fick (MORA et al., 2005).

$$P = \frac{V}{A} C_d^{-1} \left(\frac{dC_r}{dt} \right)$$

Onde:

V: volume do meio receptor

A: área da membrana de difusão

dC_r/dt : inclinação linear do gráfico da concentração do fármaco no compartimento receptor x tempo

C_d : concentração do fármaco no compartimento doador

Análise microscópica da esclera

Uma análise microscópica da esclera foi feita antes e após o experimento nas câmaras de Franz para avaliar a ocorrência de alterações. As análises de microscopia óptica foram realizadas em um microscópio de luz polarizada, modelo Axioskop 40 - Zeiss. As fotos foram registradas com uma lente de 50X de aumento.

4.2.4. QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS

A quantificação das amostras coletadas nos ensaios de liberação *in vitro* e de difusão foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência nas condições descritas na etapa de validação e a concentração das amostras foi determinada através da equação da reta de curvas de calibração de indometacina padrão preparadas em cada dia de análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

5.1.1. Seletividade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

As Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 mostram os cromatogramas referentes à avaliação da seletividade do método cromatográfico para a quantificação da indometacina. A Figura 13 mostra o cromatograma do implante de PLGA contendo indometacina e o respectivo espectro de UV deste fármaco no meio solução tampão fosfato pH 7,4 numa concentração teórica de indometacina de 10µg/mL, conforme item 4.2.1.1. O tempo de retenção da indometacina foi de 5,4 minutos (utilizando o EQUIPAMENTO 1, conforme descrito no 4.2.1). Não se observou a presença de nenhum interferente com tempo de retenção próximo ao do fármaco. A Figura 14 refere-se ao cromatograma do implante de PLGA contendo indometacina e seu espectro de UV no meio BSS numa concentração teórica de indometacina de 10µg/mL (utilizando o EQUIPAMENTO 2, conforme descrito no 4.2.1). O pico da indometacina apresentou um tempo de retenção de 5,2 minutos e não houve interferentes próximos ao tempo de retenção do fármaco. Observa-se um pico em torno de 1,3 minutos que pode ser atribuído a algum constituinte do meio BSS, uma vez que quando se injeta o BSS puro aparece este mesmo pico. Os cromatogramas dos implantes de PLA contendo indometacina foram semelhantes aos dos implantes de PLGA contendo o fármaco.

As Figuras 15 e 16 mostram os cromatogramas dos polímeros PLA e PLGA sem indometacina no meio solução tampão fosfato pH 7,4 (2,5 mg/mL) e em condições de temperatura (40 °C) e tempo (uma semana) e sob agitação constante. Não se observa nenhum pico nos cromatogramas além da perturbação da linha de base no tempo morto.

Os cromatogramas das Figuras 17 e 18 representam a análise dos polímeros PLA e PLGA no meio BSS quando submetidos às condições de temperatura (40 °C) e tempo (uma semana) sob agitação constante. Não se observa nenhum pico, além daquele no início do cromatograma referente a algum constituinte do BSS. Os cromatogramas dos polímeros em solução tampão fosfato pH 7,4 e em BSS antes de submetê-los às condições de 40°C sob agitação constante por uma semana, apresentaram-se semelhantes aos cromatogramas após essas condições e semelhantes também aos cromatogramas dos meios puros. Observa-se, desta forma, que os polímeros PLA e PLGA não apresentam absorção no UV no comprimento de onda utilizado na análise.

O cromatograma da Figura 19 mostra a avaliação da seletividade da indometacina submetida às condições de temperatura (40 °C) e tempo (uma semana) sob agitação constante. Nestas condições, observou-se o aparecimento de dois picos entre 2 e 3 minutos, que podem representar produtos de degradação do fármaco submetido às condições descritas. Para confirmar a ausência de interferentes coeluído com a indometacina, foi realizada uma análise de pureza do pico da indometacina que confirmou que o pico estava puro, apresentando um índice de pureza espectroscópica UV/Vis de 1,000000, como demonstrado pelo detalhe na Figura 19.

De acordo com os cromatogramas das figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 o método apresentou-se seletivo para a quantificação da indometacina em amostras dos implantes nos meios tampão fosfato pH 7,4 e BSS, uma vez que não foi verificada a presença de interferentes no tempo de retenção da indometacina.

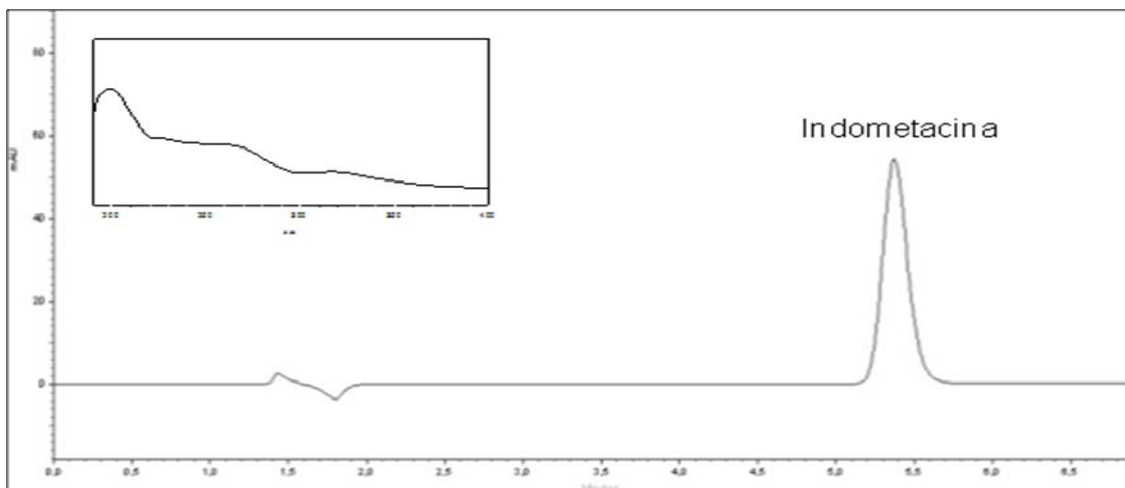


Figura 13. Cromatograma do implante de PLGA contendo indometacina no meio solução tampão fosfato pH 7,4.

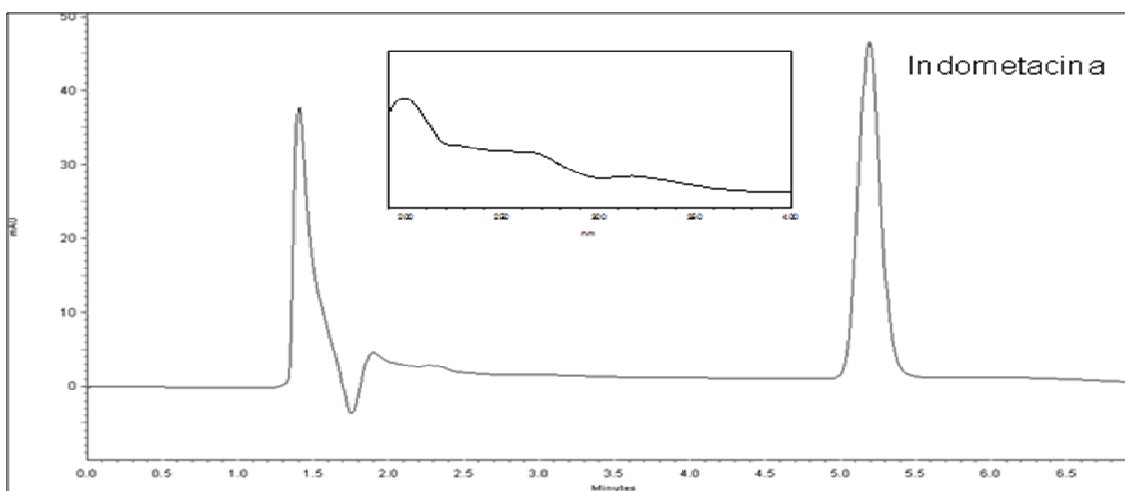


Figura 14. Cromatograma do implante de PLGA contendo indometacina em BSS.

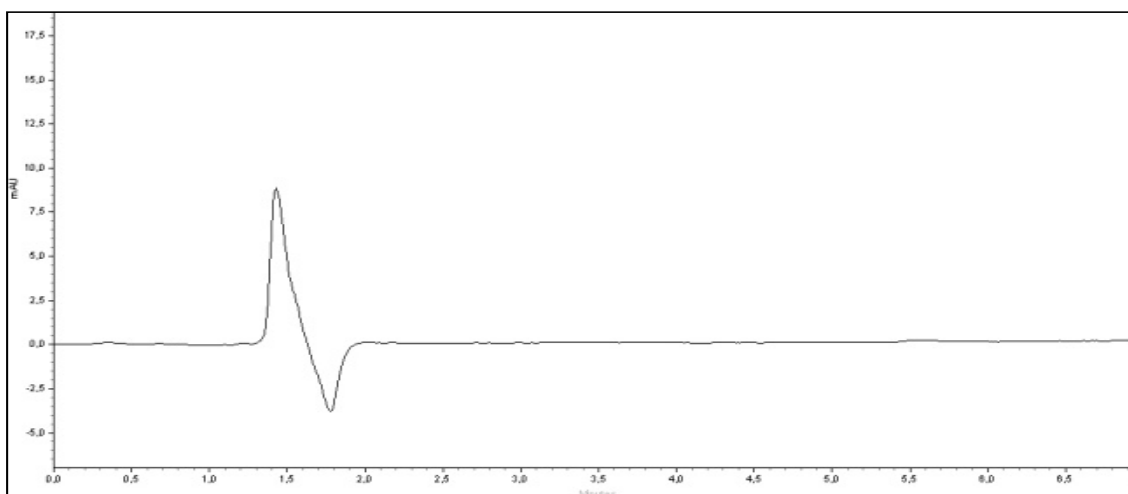


Figura 15. Cromatograma do PLA sem indometacina em solução tampão fosfato pH 7,4 após 7 dias sob agitação a 40°C.

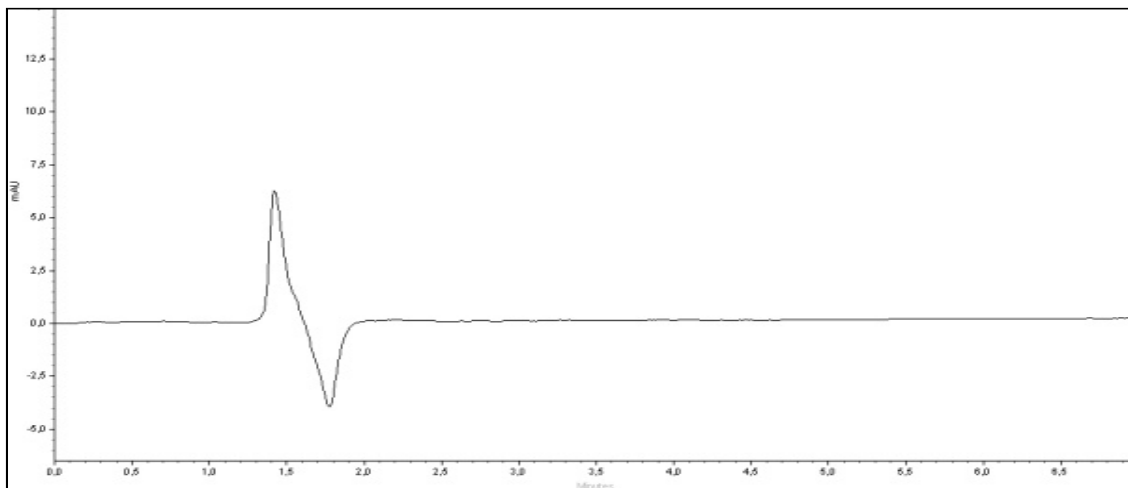


Figura 16. Cromatograma do PLGA sem indometacina em solução tampão fosfato pH 7,4 após 7 dias sob agitação a 40°C.

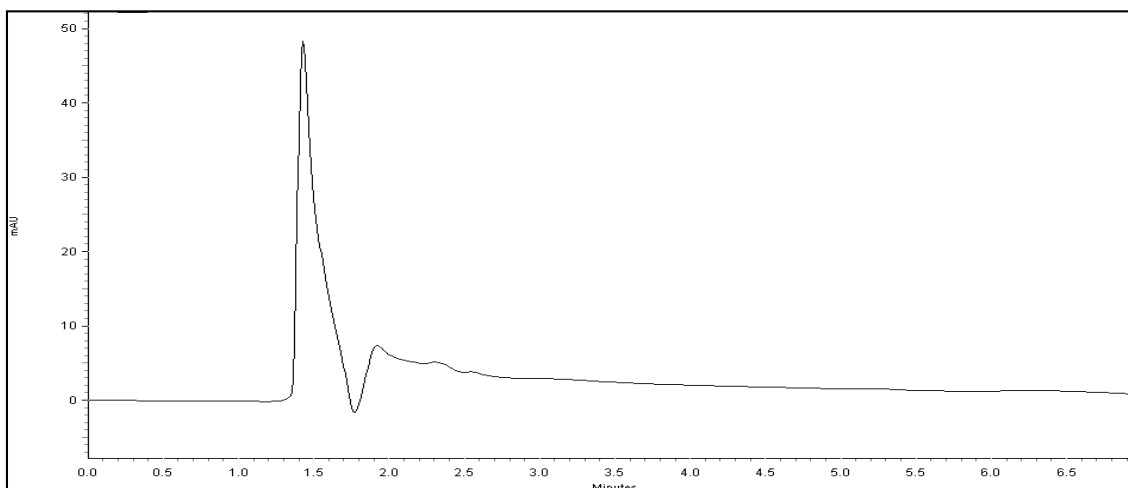


Figura 17. Cromatograma do PLA sem indometacina em BSS após 7 dias sob agitação a 40°C.

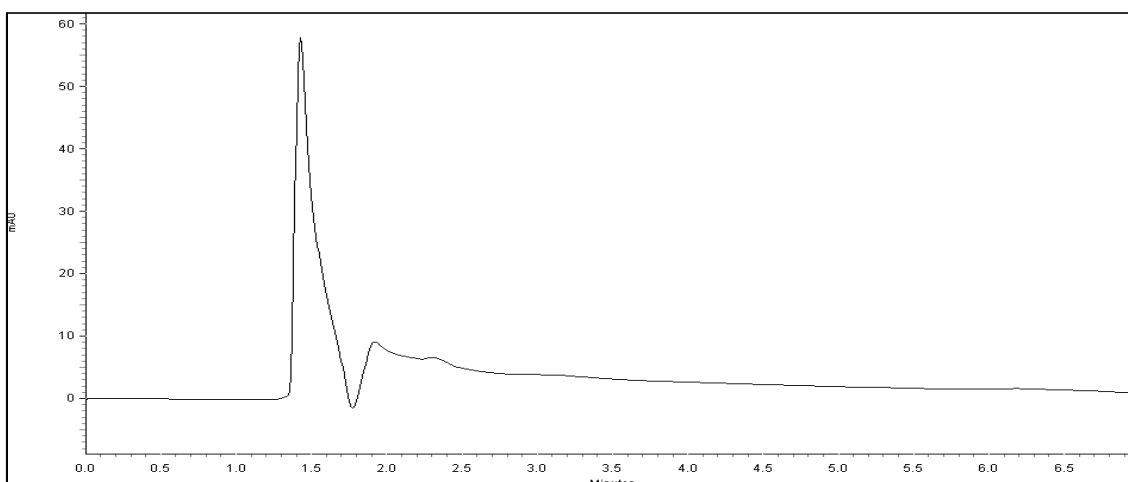


Figura 18. Cromatograma do PLGA sem indometacina em BSS após 7 dias sob agitação a 40°C.

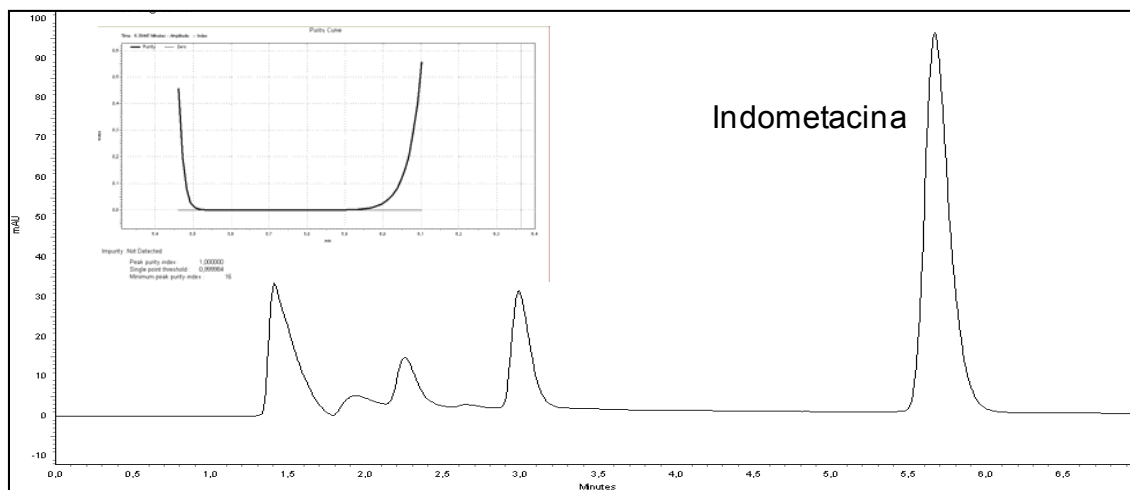


Figura 19. Cromatograma da indometacina em BSS após 7 dias sob agitação a 40°C.

5.1.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada dentro de um intervalo de concentração de 0,25 a 20 $\mu\text{g/mL}$ para o meio solução tampão fosfato pH 7,4 e de 0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para o meio BSS, partindo de uma solução-mãe a 1000 $\mu\text{g/mL}$. As curvas foram realizadas em triplicata. A linearidade foi avaliada através do método matemático de regressão linear, onde foi possível calcular os coeficientes de correlação (r^2) e da análise de resíduos. O valor de r^2 permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani *et al.*, 2004). Os resultados mostram que houve uma relação linear entre as áreas e as concentrações de indometacina em ambos os meios, pois as curvas apresentaram um coeficiente de correlação maior do que 0,99. Para o meio solução tampão fosfato pH 7,4 este coeficiente foi 0,9998 (Figura 20) e para o meio BSS foi 0,9996 (Figura 22). A ANVISA estabeleceu um valor de 0,99 como sendo o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação para métodos analíticos. A análise dos resíduos avalia se os pontos experimentais se distribuem aleatoriamente ao redor da reta de regressão, como se espera quando o modelo é linear.

As Tabelas 1 e 2 apresentam as áreas médias para as concentrações analisadas em solução tampão fosfato pH 7,4 e em BSS e as Figuras 22 e 24

representam a curva da áreas médias em função das concentrações analisadas para os meios solução tampão fosfato pH 7,4 e BSS, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios das áreas obtidas para as concentrações de indometacina no meio solução tampão fosfato pH 7,4 utilizando o equipamento 1.

Concentração (µg/mL)	Área média* ± DP	CV%
0,25	14758 ± 338,51	2,29
1	61238 ± 429,04	0,70
2,5	152571 ± 2998,80	1,97
5	309417 ± 2880,52	0,93
10	644438 ± 7935,26	1,23
20	1273464 ± 3878,15	0,30

*Cada valor é a média de três determinações
CV% = coeficiente de variação

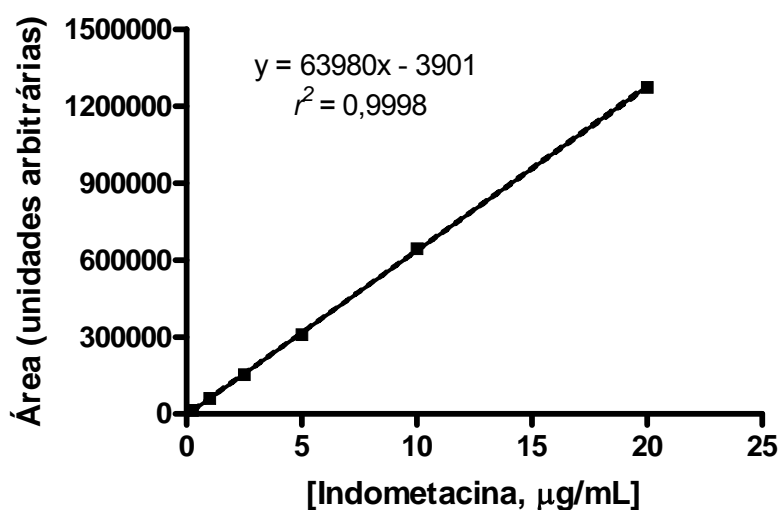


Figura 20. Regressão linear da curva de calibração média no meio solução tampão fosfato pH 7,4.

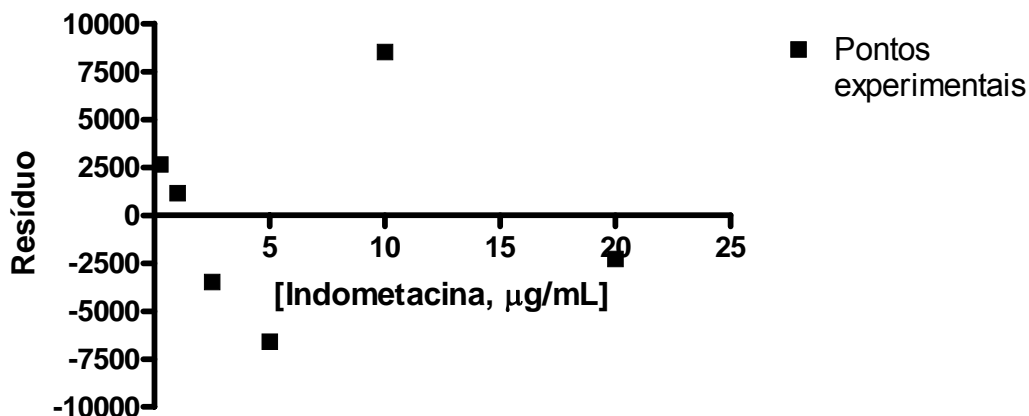


Figura 21. Gráfico de resíduos referentes aos dados de linearidade da Figura 20.

O gráfico da Figura 21 mostra uma distribuição aleatória dos resíduos em torno da reta de regressão, com três pontos da curva acima e três abaixo do eixo. A execução do teste de “Runs” confirmou um modelo linear com valor de p igual a 0,7.

Tabela 2. Valores médios das áreas obtidas para as concentrações de indometacina no meio BSS utilizando o equipamento 2.

Concentração (µg/mL)	Área média* ± DP	CV%
0,5	24656 ± 1061,65	4,31
1	52198 ± 1144,27	2,19
5	263944 ± 1372,93	0,52
10	514181 ± 10824,89	2,11
30	1472155 ± 7569,55	0,51
50	2523832 ± 23120,48	0,92

*Cada valor é a média de três determinações
CV% = coeficiente de variação

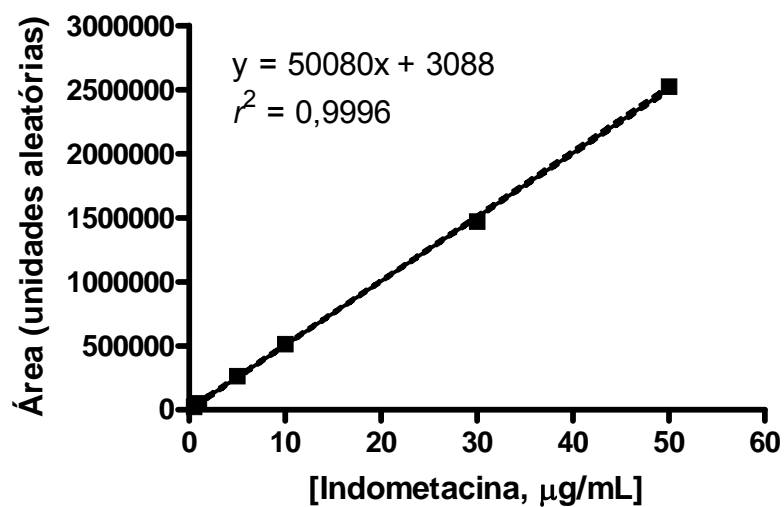


Figura 22. Regressão linear da curva de calibração média no meio BSS.

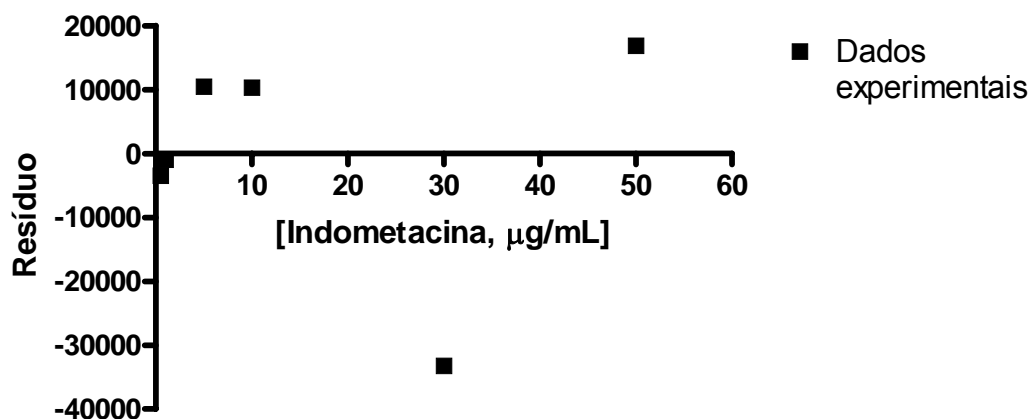


Figura 23. Gráfico de resíduos referentes aos dados de linearidade da Figura 22.

O gráfico da Figura 23 mostra uma distribuição aleatória dos resíduos em torno da reta de regressão, com três pontos da curva acima e três abaixo do eixo. A execução do teste de “Runs” confirmou um modelo linear com valor de $p = 0,7$.

5.1.3. Repetibilidade e Precisão intermediária

A repetibilidade (precisão intra-dia) foi avaliada através da injeção de soluções de indometacina em solução tampão fosfato pH 7,4 e BSS em três níveis de concentrações: baixa, média e alta, em triplicata. A precisão intermediária (precisão inter-dia) foi avaliada através da análise das mesmas concentrações da precisão intra-dia, em triplicata, em três dias diferentes e utilizando equipamentos diferentes. A média entre as análises dos três dias forneceu o valor da precisão intermediária.

Nos dos primeiros dias de análise da precisão inter-dia, no meio tampão fosfato pH 7,4, utilizou-se o equipamento 1 e no terceiro dia utilizou-se o equipamento 2. Nas análises no meio BSS, utilizou-se o equipamento 2 nos primeiros dois dias e o equipamento 1 no terceiro dia.

As tabelas 3 e 4 mostram os valores obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária nos dois meios utilizados nos estudos de liberação *in vitro* e de difusão e estão expressos pelas médias experimentais, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%).

Tabela 3. Repetibilidade (dias 1, 2 e 3) e Precisão intermediária no meio tampão fosfato de potássio pH 7,4 para as concentrações 1, 10 e 20µg/mL, utilizando o equipamento 1 nos dias 1 e 2 e o equipamento 2 no dia 3.

Concentração de IND (µg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dia
	CME ± DP CV%	CME ± DP CV%	CME ± DP CV%	CME ± DP CV%
1	0,99 ± 0,03 3,29	1,03 ± 0,04 3,67	0,99 ± 0,04 3,53	1,00 ± 0,02 2,30
10	10,12 ± 0,23 2,23	10,15 ± 0,39 3,81	10,11 ± 0,35 3,44	10,13 ± 0,02 0,21
20	19,72 ± 0,42 2,14	20,22 ± 0,29 1,44	19,83 ± 0,18 0,91	19,92 ± 0,26 1,32

CME = Concentração média experimental (n=3)

CV% = Coeficiente de variação – Precisão

Tabela 4. Repetibilidade (dias 1, 2 e 3) e Precisão intermediária no meio BSS para as concentrações 0,5, 10 e 50µg/mL, utilizando o equipamento 2 nos dois primeiros dias e o equipamento 2 no terceiro dia.

Concentração de IND (µg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dia
	CME ± DP CV%	CME ± DP CV%	CME ± DP CV%	CME ± DP CV%
0,5	0,51 ± 0,003 0,49	0,48 ± 0,016 3,25	0,49 ± 0,007 1,52	0,49 ± 0,02 3,09
10	9,51 ± 0,03 0,35	9,71 ± 0,019 0,19	9,83 ± 0,06 0,60	9,68 ± 0,16 1,67
50	49,73 ± 0,13 0,26	50,07 ± 0,66 1,32	49,78 ± 0,15 0,29	49,86 ± 0,18 0,39

CME = Concentração média experimental (n=3)
CV% = Coeficiente de variação - Precisão

A precisão foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação (CV%). Em todas as concentrações analisadas este coeficiente não ultrapassou o valor máximo aceitável pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA) que é de 5%, indicando assim, que o método apresentou precisão nas concentrações baixas, médias e altas analisadas, uma vez que nenhum dos valores experimentais tiveram desvios superiores a 5% em relação aos valores médios.

5.1.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada através da análise das mesmas concentrações médias experimentais dos três níveis de concentração (baixo, médio e alto) em triplicata utilizadas para o cálculo da precisão. Este parâmetro foi expresso através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

As tabelas 5 e 6 mostram os resultados da exatidão para os três níveis de concentração nos dois meios utilizados.

Tabela 5. Ensaio de exatidão para as concentrações baixa, média e alta no meio solução tampão fosfato pH 7,4

Concentração de IND (µg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dia
	CME ± DP EM (%)	CME ± DP EM (%)	CME ± DP EM (%)	EM ± DP CV%
1	0,99 ± 0,03 98,93	1,03 ± 0,04 102,77	0,99 ± 0,04 99,1	100,27 ± 2,17 2,16
10	10,12 ± 0,23 101,16	10,15 ± 0,39 101,45	10,11 ± 0,35 101,09	101,23 ± 0,19 0,19
20	19,72 ± 0,42 98,58	20,22 ± 0,29 101,08	19,83 ± 0,18 99,14	99,60 ± 1,31 1,32

CME = Concentração média experimental (n=3)
EM = Exatidão média

Tabela 6. Ensaio de exatidão para as concentrações baixa, média e alta no meio BSS.

Concentração de IND (µg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dia
	CME ± DP EM (%)	CME ± DP EM (%)	CME ± DP EM (%)	EM ± DP CV%
0,5	0,51 ± 0,003 102,91	0,48 ± 0,016 95,62	0,49 ± 0,007 97,8	98,78 ± 3,74 3,79
10	9,51 ± 0,03 95,08	9,71 ± 0,019 97,11	9,83 ± 0,06 98,30	96,83 ± 1,63 1,68
50	49,73 ± 0,13 99,46	50,07 ± 0,66 100,14	49,78 ± 0,15 99,55	99,72 ± 0,37 0,37

CME = Concentração média experimental (n=3)
EM = Exatidão média

Foi feita uma análise para avaliar a precisão e a exatidão da indometacina matéria-prima em relação à indometacina padrão de referência.

Avaliou-se uma concentração de 10 µg/mL da indometacina matéria-prima em quintuplicata. A precisão foi de 1,97% e a exatidão foi de 98,98%.

5.1.5. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os parâmetros LD e LQ estimados a partir dos dados da curva de calibração segundo metodologia descrita 4.2.1.4 foram 0,04 µg/mL e 0,134 µg/mL e para o meio solução tampão fosfato de potássio pH 7,4 (utilizando o equipamento 1). Para o meio BSS (utilizando o equipamento 2) estes valores foram 0,05 µg/mL e 0,152 µg/mL, respectivamente. Estes dados demonstram uma boa sensibilidade do método para a quantificação da indometacina.

5.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

A DSC foi empregada com a finalidade de se obter informações sobre as características térmicas do fármaco e dos polímeros e avaliar possíveis interações entre eles.

Primeiramente foi feita uma análise da indometacina padrão de referência e da indometacina matéria-prima utilizada na preparação dos implantes.

As Figuras 24 e 25 mostram as curvas de DSC da indometacina padrão de referência e indometacina matéria-prima respectivamente, em três razões de aquecimento: 5, 10 e 20 °C/min.

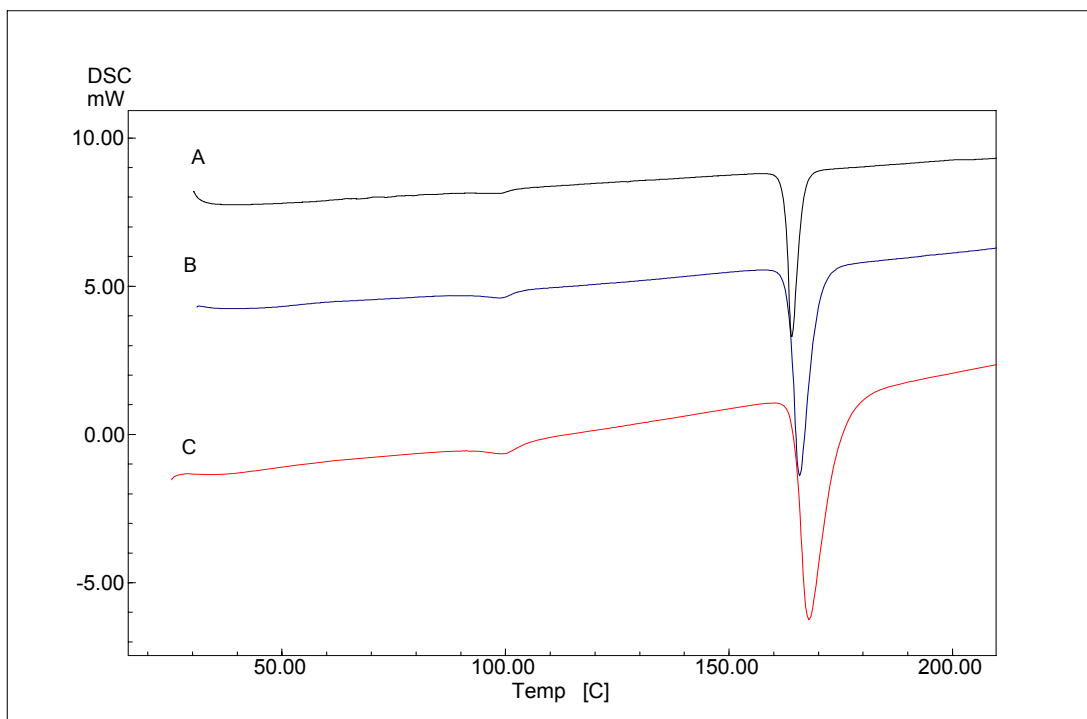


Figura 24. Curvas de DSC da indometacina padrão em diferentes razões de aquecimento: (A) razão 5 °C/min; (B) razão 10 °C/min e (C) razão 20 °C/min.

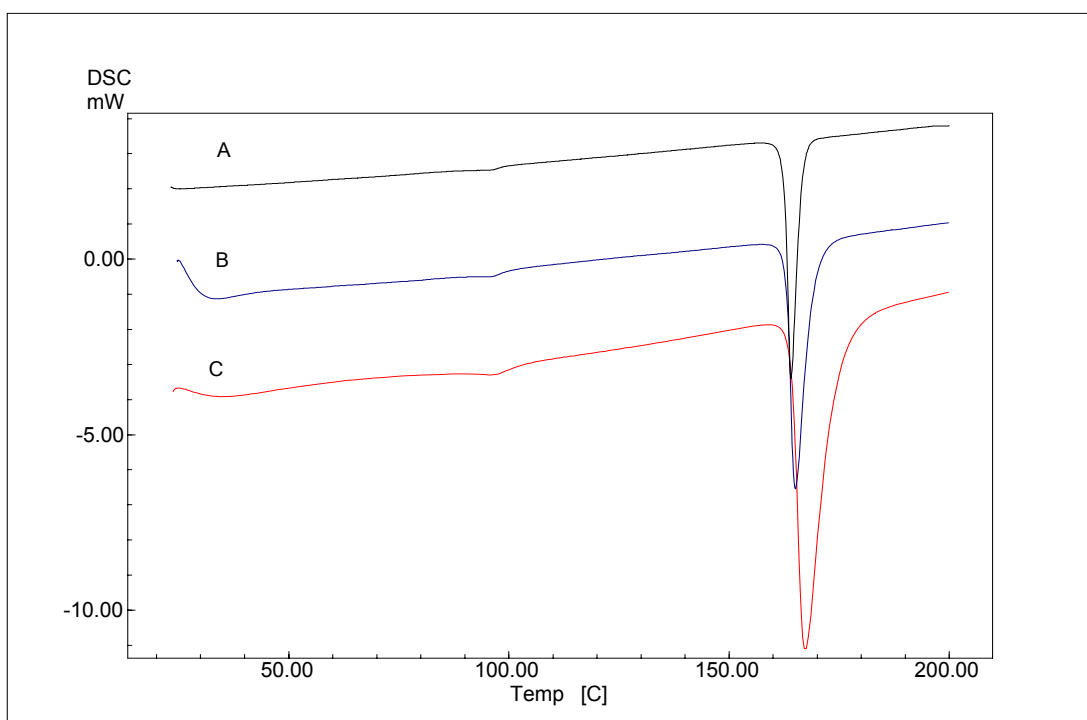


Figura 25. Curvas de DSC da indometacina matéria-prima em diferentes razões de aquecimento: (A) razão 5 °C/min; (B) razão 10 °C/min e (C) razão 20 °C/min.

A Tabela 7 mostra os resultados das temperaturas de fusão da indometacina padrão de referência e indometacina matéria-prima.

Tabela 7. Resultados de DSC da indometacina matéria-prima e padrão de referência nas razões de aquecimento 5, 10 e 20 °C/min.

Amostras	Razão de Aquecimento (°C/min)	Tf (°C)*
Indometacina (Padrão)	5	161,66
	10	162,46
	20	163,73
Indometacina (Matéria-prima)	5	161,94
	10	162,28
	20	163,42

O efeito de alargamento do pico de fusão e do aumento de sua intensidade nas diferentes razões de aquecimento acontece em razão do aumento da razão de aquecimento.

Nas curvas DSC da indometacina padrão e matéria-prima pode-se observar um evento endotérmico em torno de 162 °C, correspondente à fusão do fármaco. A curva indica que a forma polimórfica predominante do fármaco padrão e matéria-prima utilizadas em nosso estudo refere-se à forma polimórfica γ (forma II) de acordo com os dados de Hancock e Parks (2000), que avaliaram as propriedades térmicas das diferentes formas polimórficas de indometacina por DSC e obtiveram o valor de fusão de 162°C para os cristais γ e de 156 °C para os cristais α .

O polimorfismo é definido como a existência de alterações no arranjo cristalino de uma substância, sem, contudo, observar-se modificação na estrutura das moléculas (conformação molecular e espacial).

O conhecimento da forma cristalina do fármaco é muito importante no processo de desenvolvimento de formas farmacêuticas, uma vez que diferentes

formas cristalinas podem apresentar diferentes propriedades físicas e físico-químicas, tais como ponto de fusão e solubilidade, que podem interferir diretamente no processo de liberação do fármaco da forma farmacêutica e na sua biodisponibilidade.

Além de formas polimórficas, as substâncias podem se apresentar nas formas não-cristalinas ou amorfas. A energia necessária para que a molécula do fármaco escape de um cristal é muito maior do que aquela necessária para escapar de um pó amorfo, portanto, a forma amorfa de uma substância é sempre mais solúvel do que a correspondente forma cristalina (ANSEL et al., 2000). Certos fármacos podem ser produzidos para que existam em estado cristalino ou amorfo. A indometacina também existe na forma amorfa (CHIENG et al., 2009).

Fármacos cristalinos podem se converter para a forma amorfa durante o processo de liofilização (CLAS et al., 1999).

As substâncias no estado amorfo se encontram no estado sólido, mas as moléculas não apresentam um arranjo com um padrão de repetição ordenado e extenso. Substâncias amorfas têm propriedades diferentes das suas respectivas formas cristalinas. Os cristais, por exemplo, apresentam ponto de fusão, enquanto que a forma amorfa não apresenta, uma vez que não existe retículo cristalino. As formas amorfas apresentam uma temperatura característica na qual existe uma maior variação de suas propriedades. Essa temperatura é denominada temperatura de transição vítrea (T_g) (AULTON, 2005).

Os materiais poliméricos são substâncias de elevada massa molecular e são constituídos de moléculas de tal tamanho e flexibilidade que o alinhamento perfeito, de modo a formar cristais, é impossível. Desta forma, esses materiais se apresentam na forma semicristalina ou amorfa.

Como demonstrado pela Figura 26 e pelas Figuras 27D e 27E, o PLGA e o PLA utilizados no estudo, apresentaram-se no estado amorfo, pois não se observou pico referente ao processo de fusão. Verificou-se uma T_g em 47,8 °C para o PLGA e em 48,5 °C para o PLA. O valor de T_g para o PLGA está de acordo com dados da literatura, como verificado pelo Quadro 2, no entanto, o PLA apresentou uma T_g inferior à observada na literatura. Diferentes valores

nas transições vítreas podem ser observados, uma vez que depende da forma de processamento dos materiais e do tamanho da cadeia polimérica.

Quadro 2. Temperatura de transição vítrea de PLGA 50:50 e do D,L-PLA

Polímero ou copolímero	Temperatura de transição vítrea (°C)	Temperatura de fusão (°C)
PLGA 50:50	45-50	Amorfo
D,L-PLA	57-59	Amorfo

Fonte: LEWIS et al., 1990.

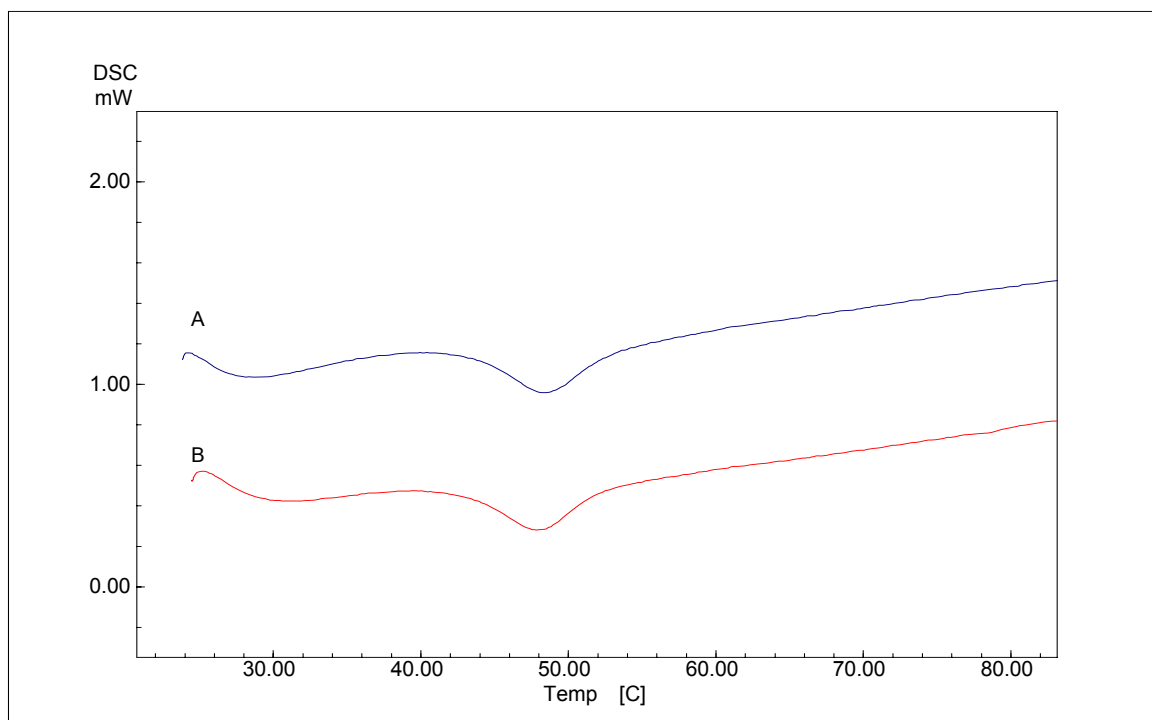


Figura 26. Curvas de DSC: (A) PLA; (B) PLGA, mostrando suas Tgs

Não houve uma variação significativa da temperatura de transição vítrea dos polímeros após o processo de liofilização, corroborando com os dados de Fialho (2006) que encontrou valores de Tg muito semelhantes para os polímeros PLGA e PLA antes e após a liofilização.

As curvas de DSC das misturas dos polímeros PLGA 50:50 e D,L-PLA com a indometacina na proporção de 2: 1 (Figura 27B e 27C, respectivamente),

apresentaram um comportamento térmico comum. Observa-se um desaparecimento quase que completo do pico de fusão do fármaco. Não é possível afirmar que a ausência dos picos de fusão da indometacina seja decorrente de algum tipo de interação entre fármaco e polímero. Este comportamento possivelmente pode ter ocorrido pela amorfização do fármaco durante o processo de liofilização utilizado na preparação dos implantes ou pela dissolução da indometacina no polímero antes de chegar ao seu ponto de fusão. Fini e colaboradores (2008) relataram fenômeno semelhante para dispersão sólida preparada com indometacina e PVP (polivinilpirrolidona).

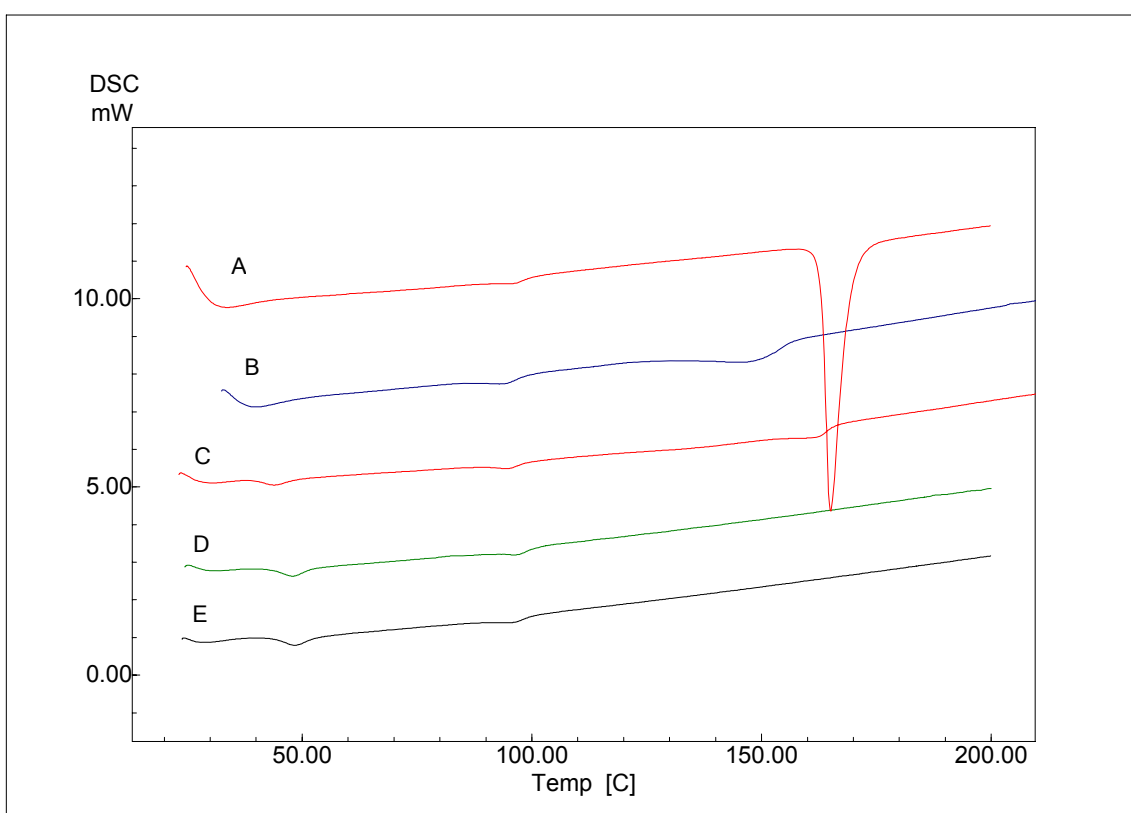


Figura 27. Curvas de DSC: (A) curva da indometacina; (B) Curva de indometacina + PLGA 50:50 liofilizados na proporção (1:2); (C) Curva de indometacina + PLA liofilizados na proporção (1:2); (D) Curva do PLA; (E) Curva do PLGA 50:50.

Deve-se observar, no entanto, que nenhuma técnica sozinha é conclusiva no que diz respeito à avaliação da interação entre polímero e fármaco. Outras técnicas tais como a difração de raios X e/ou a espectroscopia

no infravermelho podem ser empregadas em conjunto com DSC para determinação da forma de associação do fármaco ao polímero.

5.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE INDOMETACINA PRESENTE NOS IMPLANTES

A determinação do teor de indometacina presente nos implantes foi realizada empregando-se o método validado para CLAE.

A Tabela 8 mostra os valores do teor de indometacina obtidos para os implantes de PLA e PLGA 50:50.

Tabela 8. Teor médio de indometacina presente nos implantes de PLA e PLGA 50:50.

Implantes	Massa do implante (mg)*	Massa nominal de Indometacina no implante (mg)	Indometacina recuperada (mg)	% de indometacina recuperada
PLA	35,74 ± 3,26	11,91 ± 1,09	12,94 ± 0,95	108,56 ± 1,86
PLGA 50:50	29,33 ± 3,24	9,78 ± 1,08	9,41 ± 1,02	96,37 ± 2,89

*Massa do implante sem o silicone.

(Os valores estão representados como média ± desvio padrão, n=3)

A proporção teórica polímero: fármaco em ambos os implantes é de 2:1, ou seja, 33,33% p/p do fármaco, considerando o peso dos implantes sem o silicone. Os resultados mostram que a incorporação do fármaco nos polímeros durante a preparação dos implantes foi feita de forma adequada, uma vez que o teor experimental mostra uma relação da proporção polímero: fármaco muito próxima da teórica, sendo o teor médio do fármaco nos implantes de PLA 36,21% e 32,06% para os implantes de PLGA 50:50.

Os valores médios obtidos para o teor de indometacina nos implantes foram utilizados para realização dos cálculos da quantidade de indometacina liberada das amostras nos testes *in vitro*.

5.4. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os perfis de liberação cumulativa da indometacina no meio solução tampão fosfato pH 7,4, obtidos em aparato 1 de dissolução a partir dos implantes preparados com PLGA 50:50 e PLA, com proporção polímero: fármaco de 2: 1, estão representados na Figura 28.

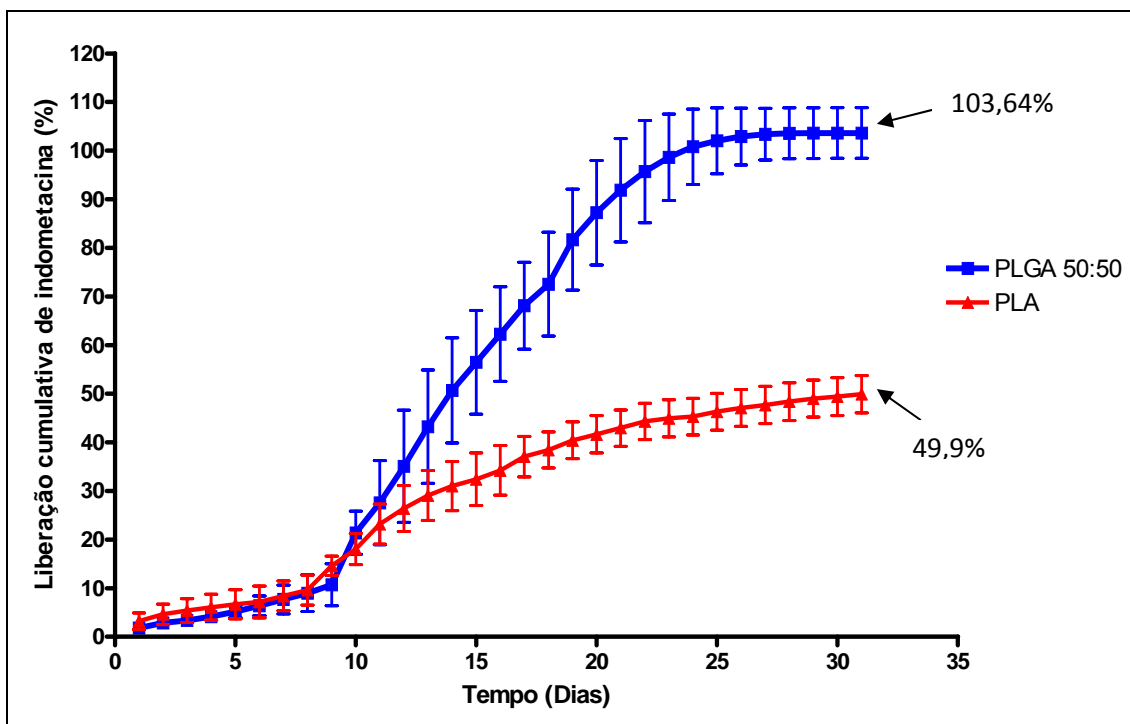


Figura 28. Liberação cumulativa de indometacina a partir dos implantes de PLGA 50:50 em aparato de dissolução (Os valores são representados como média \pm DP, n=3).

Em sistemas matriciais ou monolíticos, como nos implantes do presente estudo, o fármaco se encontra disperso no interior do material polimérico e sua liberação pode ocorrer por difusão, por degradação do polímero ou por uma combinação destes dois mecanismos (JAIN, 2000).

Difusão ocorre quando o fármaco passa através do polímero que controla sua liberação. A difusão pode ocorrer em escala macroscópica, através dos poros da matriz polimérica, ou em nível molecular, pela passagem do fármaco entre as cadeias do polímero. A morfologia da matriz polimérica é um fator determinante tanto para a liberação controlada por difusão quanto por

degradação (MCDONALD et al., 2010). O método de preparo de um sistema interfere na morfologia da matriz e, portanto, pode influenciar a velocidade de liberação do fármaco. A degradação ocorre pelo rompimento das cadeias poliméricas.

Os perfis de liberação *in vitro* neste estudo preliminar, mostraram uma taxa de liberação acumulada de indometacina de 103,64% e de 49,9% durante 31 dias de experimento para os implantes formulados com PLGA 50:50 e PLA, respectivamente. Observa-se uma maior velocidade de liberação da indometacina a partir dos implantes formulados com PLGA, assim como uma maior quantidade cumulativa liberada durante o tempo do experimento em relação aos implantes formulados com PLA. Esta diferença entre os implantes preparados com PLGA 50:50 e PLA produzidos através do mesmo processo (liofilização) e com a mesma quantidade de fármaco é devida principalmente às diferentes velocidades de degradação destes polímeros. A presença do grupo metila no PLA confere a este polímero maior hidrofobicidade quando comparado ao PLGA. A estrutura química do PLGA é mais susceptível à reação de hidrólise, pois em sua cadeia polimérica há a presença do ácido glicólico, que possui um impedimento menor a ataque das moléculas de água quando comparado ao PLA, cuja cadeia polimérica é formada exclusivamente por ácido láctico. Desta forma, a degradação polimérica que ocorre através de hidrólise das ligações éster das cadeias poliméricas ocorre mais lentamente no PLA.

Os gráficos de liberação de indometacina a partir do PLGA demonstra um perfil de liberação composto por três fases, corroborando com dados da literatura, como no estudo de Lao e colaboradores (2008) que criaram um modelo matemático experimental de liberação de paclitaxel (fármaco utilizado no tratamento do câncer) a partir de PLGA e realizaram um estudo de liberação deste fármaco a partir de filmes de PLGA e obtiveram perfis semelhantes e caracterizados por uma liberação trifásica tanto no modelo matemático criado quanto nos dados experimentais, como verificado pela Figura 29.

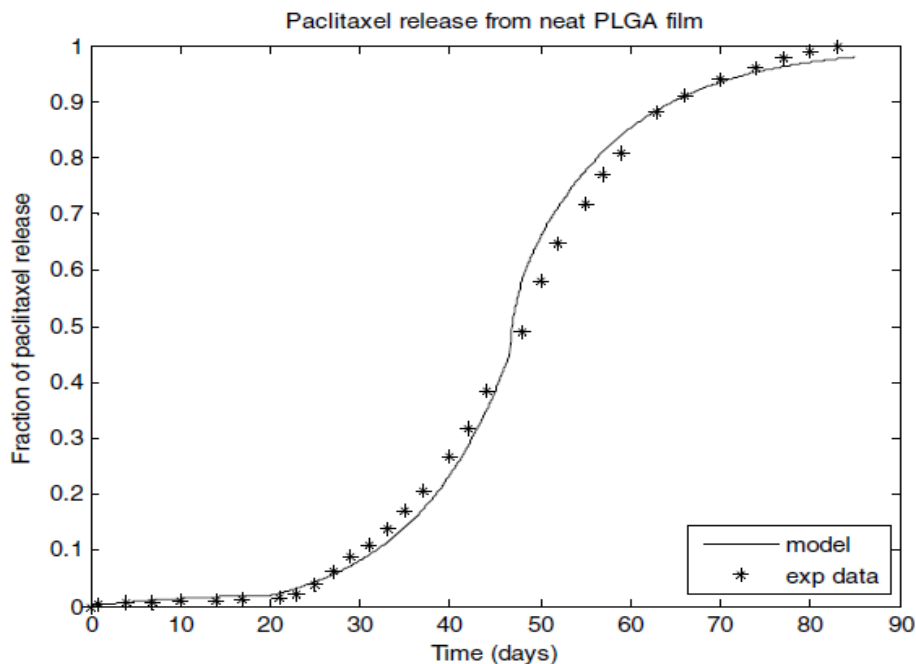


Figura 29. Comparação entre o modelo criado e os dados experimentais de liberação de paclitaxel a partir de filmes de PLGA.

Fonte: LAO et al., 2008.

Na primeira fase de liberação da indometacina a partir dos implantes formulados com PLGA 50:50 observa-se pouca liberação, sendo a indometacina presente na superfície do sistema inicialmente liberada. Esta limitada liberação inicial pode ser explicada pelo fato de nos primeiros dias o PLGA apresentar-se hidrofóbico e um polímero vítreo, fazendo com que pouco volume livre do meio de liberação fique disponível para o transporte da indometacina através do polímero.

Na segunda fase, ocorre uma liberação acentuada do fármaco caracterizada pelo relaxamento das cadeias do polímero que cria mais volume livre que por sua vez aumenta a dissolução e liberação da indometacina. Esse relaxamento ocorre em virtude da penetração de água no interior do polímero e à mudança do comprimento da cadeia polimérica devido a erosão. Inicialmente, a cadeia polimérica é longa e há muitos pontos de entrelaçamento. Devido a hidrólise das ligações éster, as cadeias tornam-se menores e o grau de entrelaçamento diminui. Durante este período, o relaxamento das cadeias poliméricas dependente de degradação possui um papel crítico para criar mais volume livre para dissolução do fármaco e para promover mais liberação.

Na terceira fase a liberação é controlada pela difusão do fármaco, uma vez que já se tem um sistema polimérico aberto.

O perfil de liberação da indometacina a partir de implantes formulados com PLA apresentam uma liberação inicial semelhante aos implantes formulados com PLGA 50:50, o que é característico da liberação da indometacina presente na superfície do sistema. No entanto, como o PLA degrada a uma velocidade bem mais lenta do que o PLGA 50:50, a segunda fase (relaxamento da cadeia polimérica para criar mais volume livre) observada para os implantes de PLGA 50:50, torna-se um fator limitante da liberação da indometacina a partir dos implantes de PLA. Pelo fato da degradação do PLA ser muito lenta, a taxa de liberação de indometacina a partir dos implantes formulados com este polímero é caracterizada principalmente pela difusão do fármaco através do polímero.

Os implantes formulados com PLGA 50:50 apresentaram um aumento de volume produzido pelo seu intumescimento, enquanto que os implantes com PLA não apresentaram essa característica, que está associada a menor entrada do meio de liberação no interior da matriz polimérica de PLA, devido a seu maior caráter hidrofóbico quando comparado com o PLGA 50:50.

5.5. DIFUSÃO ESCLERAL DA INDOMETACINA

A maior parte dos implantes oculares desenvolvidos e descritos na literatura são de aplicação intra-vítrea como demonstrado pelos trabalhos descritos no item 2.6. No entanto, a via trans-escleral representa uma via de administração alternativa de fármacos para o segmento posterior do olho. O transporte de fármacos através da esclera evitaria os riscos inerentes das vias intra-oculares mais invasivas e proporcionaria uma potencial via local para transporte de fármacos de liberação sustentada. Outro benefício desta via é a hipocelularidade da esclera, que oferece um ambiente com poucas enzimas proteolíticas e sítios de ligação de proteínas que poderiam degradar o fármaco e interferir com a sua difusão (CRUYSSBERG et al., 2005). A esclera possui uma superfície de área extensa e acessível, que facilita o processo de difusão e, além disso, sua permeabilidade não declina com a idade (AMBATI et al., 2000).

Estudos têm mostrado que a permeabilidade escleral é dependente do tamanho do soluto, da solubilidade e da conformação molecular (CRUYBERG et al., 2005). Ambati e colaboradores (2000) constataram que a permeabilidade escleral sofre um declínio com o aumento da massa molecular e do raio do soluto, sendo que o raio molecular desempenha um papel mais determinante na permeabilidade escleral do que o peso molecular, pois seu mecanismo acontece por difusão passiva através de múltiplos canais com diferentes tamanhos limitantes, através do tecido hipocelular. Estudos também têm encontrado uma maior permeabilidade escleral para moléculas hidrofílicas do que para moléculas lipofílicas (CHIEN et al., 1990).

Nos implantes avaliados neste trabalho, a quantificação da indometacina no meio receptor (BSS) das câmaras de Franz é dependente de duas variáveis: a liberação do fármaco da matriz polimérica e a difusão do fármaco através da esclera, como mostrado na Figura 30.

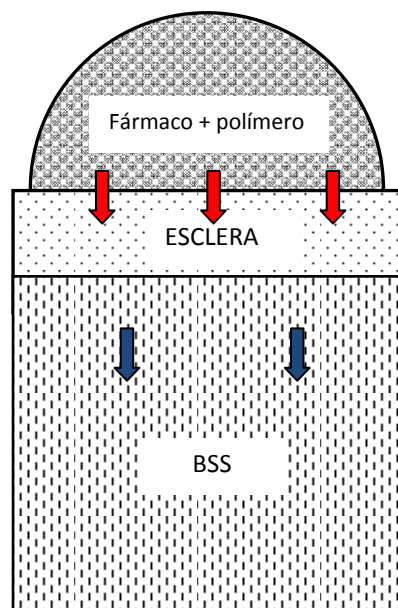


Figura 30. Esquema das barreiras de difusão da indometacina: polímero-esclera e esclera-BSS.

Os resultados do presente estudo mostraram a capacidade da indometacina, uma substância lipofílica, de atravessar a esclera da sua face externa em direção ao vítreo. A difusão escleral a partir dos implantes preparados com PLGA apresentou uma maior velocidade quando comparado aos implantes preparados com PLA, como observado na Figura 31. Observa-se que nos 40 dias de experimento, a concentração cumulativa de indometacina

encontrada no compartimento receptor das células de Franz a partir dos implantes formulados com PLGA foi de 1890,7 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a 9,45 mg ou 79,64% do fármaco presente na formulação, enquanto que para os implantes formulados com PLA a concentração cumulativa encontrada no compartimento receptor foi de 452,32 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a 2,26 mg ou 20,19% da quantidade de indometacina presente na formulação.

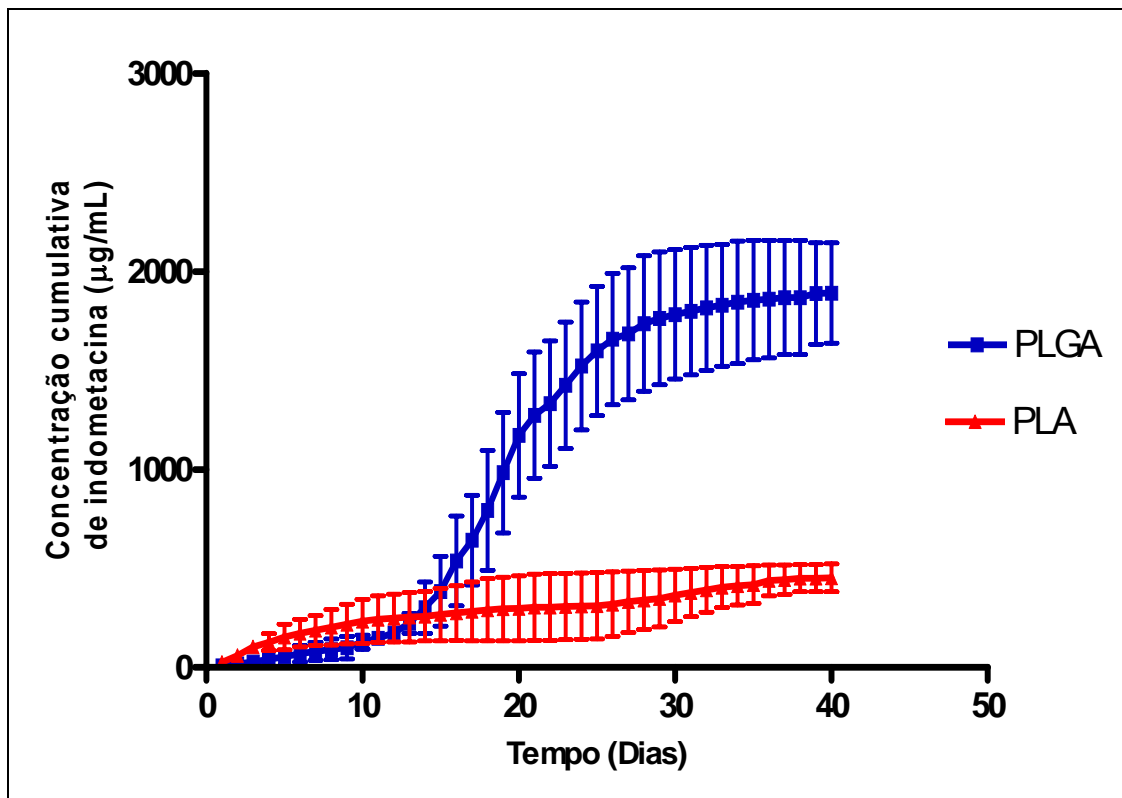


Figura 31. Concentração cumulativa de indometacina (média \pm DP, $n=3$), a partir dos implantes formulados com PLGA e PLA, no compartimento receptor das células de Franz de acordo com o tempo de difusão.

Os coeficientes de permeabilidade escleral (P) calculados para a indometacina a partir dos implantes formulados com PLGA e PLA foram $1,7 \times 10^{-5}$ cm/s e $0,24 \times 10^{-5}$ cm/s, respectivamente. A velocidade com que a indometacina atravessou a esclera de coelho foi maior para os implantes formulados com PLGA quando comparado com os implantes produzidos com PLA, que apresentou uma baixa difusão. Estes dados estão diretamente relacionados aos perfis de liberação da indometacina a partir dos polímeros PLGA e PLA e a liberação do fármaco dos polímeros representa um fator mais

determinante na velocidade de difusão do que a própria difusão do fármaco da esclera para o meio BSS, o que pode ser verificado pela manutenção do padrão de curva semelhante aos estudos de liberação *in vitro*. Estes resultados sugerem também que a esclera de coelho não foi uma barreira significativa para a difusão da indometacina.

Após os estudos nas câmaras de Franz, as escleras foram avaliadas para verificar a viabilidade de seu uso durante todo o experimento. A avaliação macroscópica através de inspeção visual não demonstrou nenhuma alteração visível. A análise através de microscopia de luz polarizada mostrou que as características estruturais gerais das fibras colágenas das escleras, após os ensaios nas câmaras de Franz, foram mantidas quando comparado com esclera antes do ensaio, ou seja, não se observou nenhuma alteração ultraestrutural, como verificado pelas fotomicrografias das Figuras 32A e 32B. A microscopia de polarização é um método eficiente para quantificar a alteração da birrefringência do colágeno devido influência de diferentes agentes (SILVA, 2006).

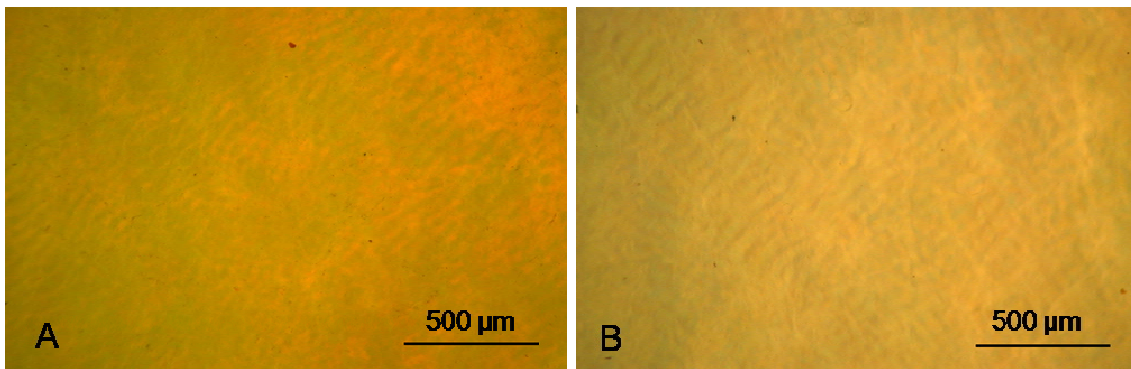


Figura 32. Fotomicrografias da esclera de coelho pigmentado antes (A) e após (B) dos ensaios nas câmaras de Franz. (Aumento de 50x).

6. CONCLUSÕES

- O método cromatográfico desenvolvido apresentou-se seletivo, linear, preciso, exato e sensível para a quantificação de indometacina nas amostras analisadas;
- A Calorimetria Exploratória Diferencial mostrou-se uma técnica útil para caracterizar as mudanças físicas induzidas no fármaco e nos polímeros pelo método de preparação dos implantes, revelando possíveis alterações na forma cristalina do fármaco ou sua possível amorfização após o processo de liofilização, o que do ponto de vista farmacotécnico é um fator positivo, uma vez que isto aumenta a solubilidade do fármaco;
- Os estudos de liberação *in vitro* mostraram que os implantes formulados com PLGA promoveram uma liberação trifásica da indometacina, sendo a primeira fase caracterizada pela liberação do fármaco presente na superfície do sistema polimérico, a segunda fase determinada principalmente pela degradação do polímero provocada pela penetração maior de água no sistema (intumescimento), o que leva à hidrólise das cadeias poliméricas e à liberação do fármaco e a terceira fase é caracterizada pela difusão do fármaco restante através do sistema polimérico “relaxado”.
- Após liberação da indometacina presente na superfície do sistema polimérico, a difusão da indometacina através da matriz polimérica dos implantes formulados com PLA tornou-se o principal mecanismo que determinou o perfil de liberação do fármaco.
- Os implantes formulados com PLGA promoveram uma liberação mais rápida da indometacina (103,64%) quando comparado com os implantes formulados com PLA (49,9%) durante os trinta dias de experimento. O perfil de liberação da indometacina foi determinado pela velocidade de

degradação dos polímeros, que também determinou a difusão escleral da indometacina a partir do PLGA e do PLA ($1,7 \times 10^{-5}$ cm/s e $0,24 \times 10^{-5}$ cm/s, respectivamente).

- Os estudos de difusão em câmaras de Franz mostrou que a esclera de coelho pigmentado é permeável à indometacina.
- A esclera de coelho pigmentado mostrou-se viável durante todo o experimento nas câmaras de Franz.
- Os implantes foram capazes de liberar a indometacina de forma cumulativa por um período prolongado, sugerindo a viabilidade de sua aplicação para liberação controlada do fármaco para o segmento posterior do olho.
- Os implantes formulados com PLA através do método de preparo utilizado mostraram-se mais adequados como sistema de liberação controlada quando comparado com os formulados com PLGA, uma vez que a liberação cumulativa de indometacina é mais constante e mais prolongada ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

AMBATI, J.; CANAKIS, C. C.; MILLER, J. W.; GRAGOUDAS, E. S.; EDWARDS, A.; WEISSGOLD, D. J.; KIM, I.; ADAMIS, A. P. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 5, p. 1181-1185, 2000.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, p. 93-102, 1996.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BICAS, H. E. A. Morfologia do sistema visual. **Medicina**, Ribeirão Preto, n. 30, p. 7-15, jan./mar. 1997.

BOURGES, J. L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; FROUSSART, F.; BOCHOT, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1182-202, 2006.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de março de 2002.

CENSO DEMOGRÁFICO 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27062003cens o.shtm>. Acesso em 25 de julho de 2010.

CHIEN, D.S.; HOMSY, J.J.; GLUCHOWSKI, C.; TANG-LIU, D.D. Corneal and conjunctival/scleral penetration of p-aminoclonidine, AGN 190342, and clonidine in rabbit eyes. **Current Eye Research**. V. 9, p. 1051–1059, 1990.

CHIENG, N.; AALTONEN, J.; SAVILLE, D.; RADES, T. Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 47–54, 2009.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical science and technology today**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

CRUYSSBERG, L. P. J.; NUIJTS, R. M. M. A.; GEROSKI, D. H.; GILBERT, J. A. HENDRIKSE, F.; EDELHAUSER, H. F. The Influence of Intraocular Pressure on the Transscleral Diffusion of High-Molecular-Weight Compounds. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 10, 2005.

CSILLAG, A. The organ of vision. In: CSillag, A. **Atlas of the sensory organs**. Humana Press, New Jersey, 2005. Cap. 2, p. 85-164.

DASH, A. K.; CUDWORTH II, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 40, p. 1-12, 1998.

DE CARVALHO, R. A. P.; DURST, M.; KRAUSE, M.; HANES, J.; MAUMENEE I, CAMPOCHIARO, P. Sealable Episcleral Drug Delivery Devices. The Effects of Sustained Release Formulations, Laser and Cryo on Ocular Pharmacokinetics of Tracers. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 5111-23, 2006.

DEL AMO, E. M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 135-143, 2008.

DONG, X.; SHI, W.; YUAN, G.; XIE, L.; WANG, S.; LIN, P. Intravitreal implantation of the biodegradable Cyclosporine A drug delivery system for the experimental chronic uveitis. **Graefe's Archive Experimental Ophthalmology**, v. 244, p. 492-497, 2006.

DRESSMAN, J.; KRÄMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. In: Krämer, J., Grady, L. T., Gajendran, J. **Historical Development of Dissolution Testing**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, Cap. 1, p. 1-43.

DURRANI, O. M.; MEADS, C. A.; MURRAY, P. I. Uveitis: A Potentially Blinding Disease. **Ophthalmologica**, Birmingham, v. 218, p. 223–236, 2004.

ELJARRAT-BINSTOCK, E.; PE'ER, J.; DOMB, A. J. New techniques for drug delivery to the posterior eye segment. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 530-543, 2010.

FELT-BAEYENS, O.; EPERON, S.; MORA, P.; LIMAL, D.; SAGODIRA, S.; BRETON, P.; SIMONAZZI, B.; BOSSY-NOBS, L.; GUEx-CROSIER, Y.; GURNY, R. Biodegradable scleral implants as new triamcinolone acetonide delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, p. 6-12, 2006.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILHO, J. A.; SIQUEIRA, R. B.; JORGE, R.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

FIALHO, S. L.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Iontoforese no transporte ocular de drogas. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 67, n. 5, p. 839-845, 2004.

FIALHO, S. L.; DA SILVA CUNHA, A. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. **Drug Delivery**, v. 12, p. 109-16, 2005.

FIALHO, S. L. Desenvolvimento de implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular de corticóides. **Tese (Doutorado)** – Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FIALHO, S. L.; CUNHA JUNIOR, A. S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 173-179, 2007.

FINI, A.; CAVALLARI, C.; OSPITALI, F. Raman and thermal analysis of indomethacin/PVP solid dispersion enteric microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 409-420, 2008.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-566, 2004.

GALAEV, I.; MATTIASSON, B. SMART POLYMERS Applications in Biotechnology and Biomedicine. In: Mittal, A.; Chitkara, D.; Kumar, N.; Pawar, R.; Domb, A.; Ben Corn, B. **Polymeric Carriers for Regional Drug Therapy**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008, Cap. 12, p. 139.

GAUDANA, R.; JWALA, J.; BODDU, H. S.; MITRA, A. K. Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1197 – 1216, 2008.

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

GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11 ed, New York: McGraw Hill, 2006.

GUPTA, C.; CHAUHAN, A.; MUTHARASAN, R.; SRINIVAS, S. P. Measurement and modeling of diffusion kinetics of a lipophilic molecule across rabbit cornea. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 699-711, 2010.

HANCOCK, B. C.; PARKS, M. What is the True Solubility Advantage for amorphous Pharmaceuticals? **Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 4, p. 397-404, 2000.

HSU, J. Drug delivery methods for posterior segment disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 18, p. 235-239, 2007.

JAFFE, G.J.; MARTIN, D.; CALLANAN, D.; PEARSON, P.A.; LEVY, B.; COMSTOCK, T. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis: thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study. **Ophthalmology**, v. 113, p. 1020-1027, 2006.

JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 703-727, 1998.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterial**, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica**, v. 215, p. 143-55, 2001.

KLIMUNDOVÁ, J.; SATINSKY, D.; SKLENAROVA, H.; SOLICH, P. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. **Talanta**, v. 69, p. 730-735, 2006.

KUNOU, N.; OGURA, Y.; HASHIZOE, M.; HONDA, Y. Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 143-150, 1995.

KUNOU, N.; OGURA, Y.; YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; MIYAMOTO, H.; HONDA, Y.; IKADA, Y. Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable sclera implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 263-271, 2000.

LAO, L. L.; VENKATRAMAN, S. S.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from biodegradable polymer blends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 796-803, 2008.

LEWIS, D. H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin, M.; Langer, R. **Biodegradable polymers as drug delivery systems**. New York: Marcel Dekker, 1990, p. 01-41.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, 2005.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MACHA, S.; MITRA, A. K. Ophthalmic drug delivery, In: Macha, S.; Mitra, A. K. Posterior **Segment Microdialysis**. 2 ed. New York: Marsel Dekker, Cap. 8. p. 251-279, 2003.

MCDONALD, P. F.; LYONS, J. G.; GEEVER, L. M.; HIGGINBOTHAM, C. L. In vitro degradation and drug release from polymer blends based on poly(L-lactide), poly(L-lactide-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone). **Journal of Materials science**, v. 45, n. 5, p. 1284-1292, 2010.

MIYAKE, K.; SAKAMURA, S.; MIURA, H. Long-term follow-up study on prevention of aphakic cystoids macular edema by topical indomethacin. **British Journal of Ophthalmology**, v. 64, n. 5, p. 324-328, 1980.

MIYAMOTO, H.; OGURA, Y.; HASHIZOE, M.; KUNOU, N.; HONDA, Y.; IKADA, Y. Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole. **Current Eye Research**, v. 16, p. 930-935, 1997.

MORA, P.; EPERON, S.; FELT-BAEYENS, O.; GURNY, R.; SAGODIRA, S.; BRETON, P.; GUEX-CROSIER, Y. Trans-Scleral Diffusion of Triamcinolone Acetonide. **Current Eye Research**, v. 30, p. 355-361, 2005.

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

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

OKABE, J.; KIMURA, H.; KUNOU, N.; OKABE, K.; KATO, A.; OGURA, Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intraocular delivery of betamethasone phosphate. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, p. 740-744, 2003.

OLSEN, T.W.; EDELHAUSER, H.F.; LIM, J.I.; GEROSKI, D.H. Human scleral permeability. Effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 36, p. 1893-903, 1995.

REICHL, S.; BEDNARZ, J.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, p. 560-565, 2004.

REICHL, S.; DÖHRING, S.; BEDNARZ, J.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Human cornea construct HCC—an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor Corneas. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 305-308, 2005.

REMYINGTON, L. A. **Clinical anatomy of the visual system**. Missouri: Elsevier, 2 ed., 2005.

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale The extra Pharmacopeia**. Londres: Pharmaceutical Press, 30 ed., 1995.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SALIBA, J. B. Sistemas biodegradáveis de administração intra-ocular contendo *ciclosporina (a)* para tratamento da uveíte posterior. **Dissertação (Mestrado)** - Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SALIBA, J. B. FARACO, A. A. G.; YOSHIDA, M. I. Development and Characterization of an Intraocular Biodegradable Polymer System Containing Cyclosporine-A for the Treatment of Posterior Uveitis. **Materials Research**, v. 11, n. 2, p. 207-211, 2008.

SANBORN, G.E.; ANAND. R.; TORTI, R.E.; NIGHTINGALE, S.D.; CAL, S.X.; YATES, B.; ASHTON, P.; SMITH, T. Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. Use of an intravitreal device. **Archives of Ophthalmology**, v. 110, n. 2, p. 188-195, 1992.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. K.; SHAH, V. P. FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 1, 2003.

SILVA, D. F. T.; VIDAL, B. C.; ZECELL, D. M.; ZORN, T. M. T.; NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S. Collagen birefringence in skin repair in response to redpolarizedlaser therapy. **Journal Biomedical Optics**, v. 11, n. 2, 2006.

SILVA-JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; PESTANA, K. C.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R.; OLIVEIRA, A. G. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. **Thermochimica Acta**, v. 467, p. 91-98, 2008.

SLAVIN, P. A.; DAVID B. SHEEN, D. B.; SHEPHERD, E. E. A.; SHERWOOD, J. N. FEEDER, N.; DOCHERTY, R.; MILOJEVIC, S. Morphological evaluation of the g-polymorph of indomethacin. **Journal of Crystal Growth**, v. 237–239 , p. 300–305, 2002.

TEGMEYER, S.; PAPANTONIOU, I.; MUÈLLER-GOYMANN, C. C. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 51, p. 119-125, 2001.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. In: Drugs. **Fast Track Approvals**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/DrugandBiologicApprovalReports/FastTrackApprovalReports/ucm082380.htm>. Acesso em: 25 de julho de 2010.

UCHEGBU, I. F.; SCHÄTZLEIN, A. G. Polymer in drug delivery. In: Bouissou, C.; Van der Walle, C.; **Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006, Cap. 7, p. 81-94.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1131-5, 2006.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; TABATA, Y.; KIMURA, H.; WIEDEMANN, P.; HONDA, Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 23, p. 253-81, 2004.

ZHU, Y.; SHAH, N. H.; MALICK, A. W.; INFELD, M. H.; MCGINITY, J. W. Controlled release of a poorly water-soluble drug from hot-melt extrudates containing acrylic polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, p. 569-83, 2006.