

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PEDRO HENRIQUE REIS DA SILVA

**IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ACETAZOLAMIDA PARA O
TRATAMENTO DO GLAUCOMA: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO**

Belo Horizonte

2022

PEDRO HENRIQUE REIS DA SILVA

**IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ACETAZOLAMIDA PARA O
TRATAMENTO DO GLAUCOMA: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Belo Horizonte

2022

S586i Silva, Pedro Henrique Reis da.
Implantes intravítreos contendo acetazolamida para o tratamento do glaucoma [recurso eletrônico] : desenvolvimento e caracterização / Pedro Henrique Reis da Silva. – 2022.
1 recurso eletrônico (258 f. : il.) : pdf.

Orientador: Christian Fernandes.
Coorientadores: Armando da Silva Cunha Júnior e Gérson Antônio Pianetti.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader

1. Acetazolamida – Teses. 2. Ácido polilático-co-glicólico (PLGA) – Teses. 3. Inibidores da anidrase carbônica – Teses. 4. Fármacos – Teses. 5. Excipientes – Teses. 6. Glaucoma – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Cunha Júnior, Armando da Silva. III. Pianetti, Gérson Antônio. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 617.741



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

*"IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ACETAZOLAMIDA PARA O TRATAMENTO DE GLAUCOMA:
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO"*

PEDRO HENRIQUE REIS DA SILVA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Dra. Taís Gratieri
Universidade de Brasília - UnB

Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Profa. Dra. Elionai Cassiana de Lima Gomes
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Christian Fernandes - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior- Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 14 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Tais Gratieri, Usuário Externo**, em 14/07/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elionai Cassiana de Lima Gomes, Professora do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior, Membro**, em 14/07/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Eduardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Rodrigues da Silva, Usuária Externa**, em 15/07/2022, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gerson Antonio Pianetti, Membro de comissão**, em 08/08/2022, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1577657 e o código CRC 98838D0E.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Eliane (*in memoriam*), por todo amor e cuidado irrestritos e incondicionais, pelos ensinamentos e pelos inenarráveis esforços em me propiciar oportunidades de estudo, mostrando a mim que a educação é libertadora, transformadora e único caminho. Infelizmente, por tão pouco, você não está aqui, pelo menos, fisicamente para ver o nosso sonho se concretizar, mas saiba que qualquer mérito é muito mais seu do que meu.

Aos meus avós, Geraldo (*in memoriam*) e Francisca, por todo o amor, acolhimento, apoio e por me inspirarem a ser sempre uma pessoa melhor.

Aos meus familiares, irmã Aline, sobrinha Cecília, minha afilhada Emanuelle, tios e primos, especialmente à minha Tia Lísia, pelo suporte e pela união inabalável que foi imprescindível para enfrentar os momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Christian, por incríveis 7 anos de parceria, sempre com muita confiança, empatia e liberdade para que eu pusesse minhas ideias em prática, por me permitir, me apoiar e me incentivar no meu desenvolvimento pessoal e profissional e por me inspirar como pesquisador, professor e orientador que eu gostaria de ser.

Aos meus coorientadores, Armando e Pianetti, pela confiança, suporte e oportunidades. Foi um prazer e objetivo cumprido poder compartilhar os primeiros passos de minha jornada acadêmica com profissionais que, desde sempre, foram inspirações para mim.

Aos colegas e funcionários dos laboratórios de Controle de Qualidade e Tecnologia Farmacêutica pela colaboração, amizade e pelos estimulantes cafés com risos. Em especial, à Adelaide e ao Batista, do biotério, sempre disponíveis e solícitos.

Aos amigos que fiz no percurso acadêmico, Graziela, Marcela, Juliana, Ana, Matheus e Cleido, por tudo que compartilhamos. Sinto-me honrado de saber que a impressão digital de cada um de vocês se encontra neste trabalho e no meu eu pessoa e profissional.

Aos meus amigos de sempre, do COLTEC, faculdade ou outros nichos, pela amizade, risos, apoio e compreensão nos momentos de ausência. Obrigado por me revigorarem muitas e muitas vezes durante o percurso. Nayara, Vanessa, Rafaela, Simone, Anarda, Vitor, Priscila, Luciana, Beatriz, Fábio, Caik, Rafael, Eduardo, Álvaro, Leonam, Everton, Gabi, Zeam,

Anna, Pri e tantos outros, obrigado, de coração, por caminharem ao meu lado. Ao Renan, pelo amor, paciência, compreensão, companheirismo e leveza.

Aos colegas de CENTEC, pela receptividade, ensinamentos na difícil arte da docência, compreensão e pela experiência que mais mudou minha vida.

Aos colaboradores da FUNED, especialmente à Dra. Sílvia Ligório, à Dra. Maria Betânia Freitas, Lutiana Melo e aos professores Maria Beatriz da Glória, Wagner Mussel e Maria Irene Yoshida, por abrirem as portas dos seus laboratórios para mim e contribuírem para que eu adquirisse novas e instigantes experiências, porque ciência deve ser sempre colaborativa e multidisciplinar.

Aos meus alunos, por serem minha fonte diária de energia, amor e inspiração, por me tirarem da minha zona de conforto constantemente, por renovarem os meus sonhos e propósitos de vida através dos seus e por deixarem, cada um, uma marca que levarei para sempre. Estar com vocês, na sala de aula, foi e sempre será meu ambiente seguro.

À educação pública, marcada no meu currículo dos primeiros aos últimos passos de minha formação, às políticas públicas de inclusão social e de permanência, que fizeram com que muitos como eu, filho de mãe solteira, sem ensino médio, auxiliar de serviços gerais, oriundos de famílias mais humildes, a esperança de dias melhores e de uma vida digna, pudessem estar aqui, podendo obter o título de Doutor. Aqui, menção especial à Fundação Mendes Pimentel.

À CAPES e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro e por ousarem a fazer ciência em tempos tão sombrios e cruéis.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram com que esse trabalho fosse possível.

RESUMO

O glaucoma é uma doença crônica e multifatorial, marcada por alterações características no disco do nervo óptico e déficit visual, afetando mais de 70 milhões de indivíduos mundialmente e consolidando-se como principal causa de cegueira irreversível. Atualmente, o tratamento é focado na redução da pressão intraocular, único fator passível de intervenção, por cirurgia ou prioritariamente com medicamentos. A acetazolamida, um inibidor da anidrase carbônica, é uma das mais importantes alternativas farmacoterapêuticas, mas até o momento encontra-se disponível apenas para uso sistêmico, por via oral ou intravenosa, que se associa a muitos efeitos adversos graves e pouco tolerados. O desenvolvimento de formulações para administração ocular para o fármaco tem sido muito desafiador, limitado por suas propriedades físico-químicas, como baixa solubilidade e baixa permeação corneana. Neste âmbito, implantes intravítreos biodegradáveis emergiram como promissora alternativa para propiciar liberação intraocular e prolongada de acetazolamida, minimizando efeitos adversos e ampliando a biodisponibilidade e a adesão ao tratamento. Portanto, no presente trabalho, implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida foram produzidos por moldagem a quente e extensivamente caracterizados. Os implantes apresentaram-se na forma de bastões cilíndricos brancos, de superfície uniforme e comprimento, espessura e peso de cerca de 5,00 mm, 0,45 mm e 1,27 mg, respectivamente. Estudo de compatibilidade fármaco-excipientes evidenciou ausência de interações físicas ou químicas e presença de características típicas de sistemas de liberação matriciais. Os implantes foram analisados por métodos cromatográficos desenvolvidos e validados e demonstraram teor de 230 µg/g, uniformidade de doses unitárias e estabilidade por, no mínimo, seis meses, durante estudo de estabilidade acelerada, promovendo liberação sustentada de aproximadamente 50% da dose declarada do fármaco por 42 dias. No mesmo período, não foram observados sinais de irritação ocular ou toxicidade retiniana em estudos *in vitro* e *in vivo* para os dispositivos e fármaco em concentrações de até 0,020 mmol/L. Ademais, houve efeito hipotensor significativo e clinicamente relevante com o uso dos implantes em coelhos normotensos. Deste modo, os implantes intravítreos desenvolvidos mostraram-se uma alternativa segura e potencialmente eficaz para administração intravítrea e liberação sustentada de acetazolamida em pacientes glaucomatosos.

Palavras-chave: acetazolamida; ácido polilático-co-glicólico (PLGA); inibidor da anidrase carbônica; compatibilidade fármaco-excipientes; toxicidade *in vitro/in vivo*; glaucoma.

ABSTRACT

Glaucoma is a chronic and multifactorial disease, characterized by typical structural changes of the optic disc and visual impairment. It affects more than 70 million individuals worldwide and is the main cause of irreversible blindness. Currently, the treatment is focused on reducing intraocular pressure, the only factor that can suffer intervention, by surgery or primarily with medications. Acetazolamide, a carbonic anhydrase inhibitor, is one of the most important drugs for this purpose, but is currently available only for systemic use, orally or intravenously, which is associated with many serious and poorly tolerated adverse effects. The development of topical formulations for the drug is very challenging, limited by its physicochemical properties, including low solubility and corneal permeation. In this context, biodegradable intravitreal implants emerged as a promising alternative to provide intraocular and prolonged release of acetazolamide, minimizing adverse effects and increasing bioavailability and adherence to the treatment. Therefore, in the present study, polylactic-co-glycolic acid-based intravitreal implants containing acetazolamide were produced by hot molding and extensively characterized. The implants were presented as white cylindrical rods, with uniform surface and length, thickness and weight of about 5.00 mm, 0.45 mm and 1.27 mg, respectively. A drug-excipient compatibility study showed no physical or chemical interactions and typical and desirable characteristics of matrix release systems. The implants were analyzed by chromatographic methods developed and validated and demonstrated a content of 230 µg/g, uniformity of content and stability for at least six months during an accelerated stability study. Sustained release of approximately 50% of the dose was observed in 42 days. In the same period of study, no signs of ocular irritation or in vitro and in vivo toxicity for the retina were observed for the devices and drugs at concentrations of up to 0.020 mmol/L. Moreover, there was significant and clinically relevant hypotensive effect for the implants in normotensive rabbits. Thus, the proposed intravitreal implants proved to be a safe and potentially effective alternative for intravitreal administration and controlled release of acetazolamide in glaucomatous patients.

Keywords: acetazolamide; poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA); carbonic anhydrase inhibitor; stability; drug-excipient compatibility; in vitro/in vivo toxicity; glaucoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura representativa e corte histológico da retina e suas camadas.....	29
Figura 2 – Aspectos morfológicos do copo do disco óptico, em um indivíduo sadio (a) e em um indivíduo com glaucoma (b), com notável aumento da escavação do disco óptico.....	31
Figura 3 – Estrutura química da acetazolamida.....	36
Figura 4 – Estrutura química do ácido polilático-co-glicólico (PLGA).....	54
Figura 5 – Fotografia de um implante intravítreo de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) contendo acetazolamida, de 5,0 mm por 0,45 mm, produzido por moldagem a quente.....	94
Figura 6 – Curvas termoanalíticas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC, em preto), termogravimetria (TGA, em vermelho) e análise térmica diferencial (DTA, em azul) para investigação do comportamento térmico do fármaco acetazolamida, nas faixas de temperatura de 25 a 400°C (DSC) ou 25 a 600 °C (TGA/DTA), com evidência de eventos endotérmicos referentes aos processos de conversão polimórfica e fusão com decomposição.....	96
Figura 7 – Curvas termoanalíticas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC, em preto ou em verde, para curva obtida depois de limpeza do histórico térmico), termogravimetria (TGA, em vermelho) e análise térmica diferencial (DTA, em azul) para investigação do comportamento térmico do ácido polilático-co-glicólico (PLGA), nas faixas de temperatura de 25 a 400°C (DSC) ou 25 a 600 °C (TGA/DTA), com evidência de eventos endotérmicos referentes aos processos de transição vítrea e decomposição.....	98
Figura 8 – Sobreposição de curvas termoanalíticas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) para mistura binária (em verde), líofilo (em preto), implante intravítreo (em azul) e implante intravítreo branco (em vermelho), com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e ausência de incompatibilidade físico-química entre fármaco e ácido polilático-co-glicólico (PLGA).....	99
Figura 9 – Difratomogramas obtidos para o ácido polilático-co-glicólico (PLGA, parte superior) e para o fármaco acetazolamida (parte inferior), com evidência de estrutura amorfa para o polímero e estrutura cristalina para o fármaco.....	101
Figura 10 – Sobreposição entre dados experimentais (em preto, linha pontilhada) e dados ajustados (em vermelho, linha inteira), para identificação da forma polimórfica I do fármaco acetazolamida presente no insumo farmacêutico ativo utilizado na síntese dos implantes intravitrosos.....	103
Figura 11 – Difratomogramas obtidos para a mistura binária (parte esquerda) e líofilo (parte direita), comparados ao fármaco acetazolamida (em azul), com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e sugestivo processo de perda de cristalinidade e amorfização induzido durante a liofilização.....	104
Figura 12 – Difratomogramas obtidos para o implante intravítreo, pelo método original e por dispersão de raios X	

de pequeno ângulo com incidência rasante, com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e pequena incidência de adesão de fármaco na superfície dos dispositivos.....105

Figura 13 – Espectros de absorção no infravermelho obtidos para o fármaco acetazolamida (IFA, em preto), ácido polilático-co-glicólico (PLGA, em vermelho), mistura binária (MF, em azul), implantes intravítreos (I-ACZ, em verde) e implantes intravítreos brancos (I-BR, em roxo), com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e ausência de incompatibilidade físico-química entre fármaco e ácido polilático-co-glicólico (PLGA).....106

Figura 14 – Micrografias obtidas nas magnitudes de 100 (parte esquerda) e 1000x (parte direita), para os implantes intravítreos contendo acetazolamida, com evidência de aspecto cilíndrico, superfície lisa e uniforme e organização em multicamadas, com pequena incidência de cristais do fármaco aderidos na superfície dos dispositivos.....109

Figura 15 – Mapa elementar obtido por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para os implantes intravítreos, com mapeamento elementar de enxofre (S, em amarelo) e nitrogênio (N, em azul) para monitoramento do fármaco acetazolamida, com evidência de homogeneidade na distribuição do fármaco na matriz polimérica.....110

Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.....115

Figura 17 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.....116

Figura 18 – Sobreposição dos cromatogramas para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.....117

Figura 19 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no

tempo de retenção do analito.....118

Figura 20 – Sobreposição dos cromatogramas para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.....119

Figura 21 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.....120

Figura 22 – Sobreposição dos cromatogramas para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.....121

Figura 23 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.....122

Figura 24 – Curva analítica e equação da reta obtidas durante avaliação de linearidade para método de teor de acetazolamida, no intervalo de concentração de 80 a 120 µg/mL.....125

Figura 25 – Curva analítica e equação da reta obtidas durante avaliação de linearidade para método de

substâncias relacionadas, no intervalo de concentração de 0,4 (LQ) a 1,2 µg/mL.....125

Figura 26 – *Design spaces* obtidos durante avaliação da robustez para os métodos de teor e substâncias relacionadas, com evidência de grande faixa de trabalho (em amarelo) em que a combinação das variáveis críticas concentração de ácido trifluoroacético (TFA, 0,1% v/v) e vazão de fase móvel produz resultados dentro das especificações.....131

Figura 27 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados obtidos para diluente (em preto), agente degradante (branco, em azul), placebo (em vermelho), insumo farmacêutico ativo (IFA, em verde) e mistura binária (MF, em roxo), na condição crítica de estresse ácido (HCl 1,0 M), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.....138

Figura 28 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados obtidos para diluente (em preto), agente degradante (branco, em azul), placebo (em vermelho), insumo farmacêutico ativo (IFA, em verde) e mistura binária (MF, em roxo), na condição crítica de estresse básico (NaOH 0,1 M), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.....139

Figura 29 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos para implante intravítreo branco (em preto), insumo farmacêutico ativo depois de 3 e 6 meses (IFA, em azul e vermelho, respectivamente) e implantes intravítreos contendo acetazolamida depois de 3 e 6 meses (em verde e em roxo, respectivamente), durante estudo de estabilidade acelerada, sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.....141

Figura 30 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados obtidos para implante intravítreo branco (em preto), insumo farmacêutico ativo depois de 3 e 6 meses (IFA, em azul e vermelho, respectivamente) e implantes intravítreos contendo acetazolamida depois de 3 e 6 meses (em verde e em roxo, respectivamente), durante estudo de estabilidade acelerada, sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.....142

Figura 31 – Espectro de massas para o fármaco acetazolamida obtido em modo de aquisição negativo depois de fragmentação do íon precursor de razão massa-carga (m/z) 221.....150

Figura 32 – Espectro de massas para o padrão interno dorzolamida obtido em modo de aquisição negativo depois de fragmentação do íon precursor de razão massa-carga (m/z) 323.....150

Figura 33 – Diagramas de Pareto obtidos por planejamento de composto central (CCD) durante avaliação da

influência dos parâmetros de ionização e fragmentação potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE), potencial de saída da célula de entrada (CXP) e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o fármaco acetazolamida (parte esquerda) e para o padrão interno dorzolamida (parte direita), com evidência de parâmetros críticos a nível de significância de 0,05.....151

Figura 34 – Superfícies de resposta obtidas por planejamento de composto central (CCD) durante avaliação da influência dos parâmetros de ionização e fragmentação potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE), potencial de saída da célula de entrada (CXP) e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o fármaco acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83), para definição de condições ótimas de análise.....154

Figura 35 – Superfícies de resposta obtidas por planejamento de composto central (CCD) durante avaliação da influência dos parâmetros de ionização e fragmentação potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE), potencial de saída da célula de entrada (CXP) e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o para o padrão interno dorzolamida (razão massa-carga m/z 323-244), para definição de condições ótimas de análise.....155

Figura 36 – Superfícies de resposta obtidas por planejamento Doehlert durante avaliação da influência dos parâmetros da fonte *electrospray* gás de secagem, gás nebulizador, gás de colisão e temperatura e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o fármaco acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83), para definição de condições ótimas de análise.....157

Figura 37 – Efeito dos aditivos modificadores de pH ácido fórmico (AF 0,1% v/v), ácido trifluoroacético (TFA, 0,1 % v/v), ácido acético (AAc 0,05% v/v e 0,1% v/v), acetato de amônio (5 e 10 mmol/L), hidróxido de amônio (0,02% v/v, 0,05% v/v e 0,1% v/v), trietilamina (TEA, 0,1% v/v) e tris-hidroximetilaminoetano (TRIS, 10 mmol/L) na intensidade do sinal de transição de massa de quantificação da acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83).....161

Figura 38 – Diagrama de Pareto obtidas por planejamento Doehlert durante avaliação da influência dos parâmetros proporção de fase aquosa, concentração de tris-hidroximetilaminoetano, vazão de fase móvel e suas interações secundárias nos parâmetros cromatográficos combinados utilizando-se ferramenta desejabilidade global, para definição de condições ótimas.....163

Figura 39 – Superfícies de resposta obtidas por planejamento Doehlert durante avaliação da influência dos parâmetros proporção de fase aquosa, concentração de tris-hidroximetilaminoetano, vazão de fase móvel e suas interações secundárias nos parâmetros cromatográficos combinados utilizando-se ferramenta desejabilidade global, para definição de condições ótimas.....164

Figura 40 – Cromatograma obtido para o fármaco acetazolamida e para o padrão interno dorzolamida, nas condições ótimas finais, determinadas por planejamento experimental Doehlert e ferramenta desejabilidade, depois de ajustes finos, utilizando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m), sob eluição isocrática de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e tris-hidroximetilaminoetano a 12 mmol/L, na proporção de 93:7 v/v, em vazão de 0,48 mL/min e temperatura de 21

°C, com detecção por espectrometria de massas em modo de aquisição negativo, com evidência de resolução entre fármaco e padrão interno.....166

Figura 41 – Sobreposição de cromatogramas obtidos para fase móvel, diluente e placebo, nas condições ótimas finais, determinadas por planejamento experimental Doehlert e ferramenta desejabilidade, depois de ajustes finos, utilizando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), sob eluição isocrática de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e tris-hidroximetilaminoetano a 12 mmol/L, na proporção de 93:7 v/v, em vazão de 0,48 mL/min e temperatura de 21 °C, com detecção por espectrometria de massas em modo de aquisição negativo, com evidência de resolução entre fármaco e padrão interno, para avaliação da seletividade do método.....167

Figura 42 – Curva analítica e equação da reta obtidas durante avaliação de linearidade para método de teor de acetazolamida, no intervalo de concentração de 0,5 a 1000 ng/mL.....169

Figura 43 – Diagrama de Pareto obtido para os parâmetros proporção de fase aquosa, concentração de tris-hidroximetilaminoetano, vazão de fase móvel, marca de coluna cromatográfica e suas interações secundárias, durante avaliação da robustez, com evidência de parâmetros críticos na resposta intensidade do sinal de transição de massa para o fármaco acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83).....173

Figura 44 – Avaliação do perfil de perda de massa (parte esquerda) e absorção de água (parte direita) pelos implantes intravítreos contendo acetazolamida, durante 42 dias.....179

Figura 45 – Avaliação do perfil de liberação acumulada, em percentual, do fármaco acetazolamida em tampão fosfato-salina (PBS) a 37 °C, a partir dos implantes intravítreos contendo acetazolamida, durante 42 dias, com evidência de liberação em perfil bifásico, sem *burst* inicial.....181

Figura 46 – Esquema demonstrativo de procedimento de aplicação de trocarte transescleral (parte esquerda) seguida por inserção dos implantes intravítreos contendo acetazolamida na cavidade intravítrea através do trocarte transescleral (parte direita), em coelhos albinos da raça *New Zealand*.....199

Figura 47 – Determinação da sobrevida e viabilidade celular de células do epitélio pigmentar da retina humana da linhagem ARPE-19 em percentual, durante avaliação da toxicidade *in vitro* do fármaco acetazolamida nas doses de 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,02 e 0,04 mmol/L por ensaio de citotoxicidade por incorporação do 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....203

Figura 48 – Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) de uma via, com pós-teste de Bonferroni, entre as médias de viabilidade celular obtidas durante avaliação da toxicidade *in vitro* do fármaco acetazolamida nas doses de 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,02 e 0,04 mmol/L por ensaio de citotoxicidade por incorporação do 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), com evidência de ausência de toxicidade para doses inferiores a 0,04 mmol/L.....204

Figura 49 – Determinação da sobrevida e viabilidade celular de células do epitélio pigmentar da retina humana da linhagem ARPE-19 em percentual, durante avaliação da toxicidade *in vitro* do fármaco acetazolamida nas doses de 0,01 e 0,02 mmol/L por ensaio de citotoxicidade por incorporação do 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

(MTT).....205

Figura 50 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópicas de adaptação ao escuro 0,01 cd.s/m² (parte superior) e adaptação ao escuro 3,0 cd.s/m² (parte inferior) obtidas um dia depois de administração intravítrea de doses de 0,01 (parte esquerda, RB1), 0,02 (centro, RB2) e 0,04 mmol/L (parte direita, RB3) no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida.....209

Figura 51 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópicas de adaptação ao escuro 0,01 cd.s/m² (parte superior) e adaptação ao escuro 3,0 cd.s/m² (parte inferior) obtidas depois de um (parte esquerda), sete (centro) e quinze dias (parte direita) depois de administração intravítrea de doses 0,02 mmol/L no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida.....211

Figura 52 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições fotópicas de adaptação à luz 3,0 cd.s/m² (parte superior) e adaptação à luz *flicker* 30 Hz (parte inferior) obtidas um dia de administração intravítrea de doses de 0,01 (parte esquerda, RB1), 0,02 (centro, RB2) e 0,04 mmol/L (parte direita, RB3) no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida.....213

Figura 53 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições fotópicas de adaptação à luz 3,0 cd.s/m² (parte superior) e adaptação à luz *flicker* 30 Hz (parte inferior) obtidas depois de um (parte esquerda), sete (centro) e quinze dias (parte direita) depois de administração intravítrea de doses 0,02 mmol/L no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida.....214

Figura 54 – Comparação das razões *b/a* para avaliação do estado funcional da retina por eletrorretinografia (ERG), antes e um, sete e quinze dias depois da administração de doses de 0,010 0,020 e 0,040 mmol/L no olho direito de ratos da linhagem Wistar durante avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida.....216

Figura 55 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópicas de adaptação ao escuro 0,01 cd.s/m² (parte superior) e adaptação ao escuro 3,0 cd.s/m² (parte inferior) obtidas depois de um (parte esquerda), sete (centro) e quinze dias (parte direita) depois de administração intravítrea de doses 0,02 mmol/L no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de salina estéril no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação de possível efeito neuroprotetor do fármaco acetazolamida.....219

Figura 56 – Presença do implante intravítreo na cavidade intravítrea dos coelhos albinos da raça *New Zealand*, em fotografia retirada imediatamente depois da administração (a) e em imagens de fundo de olho obtidas por

oftalmoscopia confocal de varredura a laser, depois de 21 dias (b) e 42 dias (c) da inserção dos dispositivos....221

Figura 57 – Imagens de fundo de olho de coelhos albinos da raça *New Zealand* obtidas por oftalmoscopia confocal de varredura a laser para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração intravítrea de salina estéril (b) e do fármaco acetazolamida a 0,020 mmol/L depois de três (c) e sete dias (d), para avaliação da toxicidade *in vivo*..... 222

Figura 58 – Imagens de fundo de olho de coelhos albinos da raça *New Zealand* obtidas por oftalmoscopia confocal de varredura a laser para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração de implante intravítreo branco (b) e de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de sete (c), quatorze (d), vinte e um (e), vinte e oito (f), trinta e cinco (g) e quarenta e dois dias (h), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.....223

Figura 59 – Monitoramento da pressão intraocular nos olhos controle e administrados de implante intravítreo contendo acetazolamida durante período de quarenta e dois dias (a) e variação da pressão intraocular relativa aos níveis basais reportados antes do procedimento de inserção de implante intravítreo contendo acetazolamida (b), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.....224

Figura 60 – Corte transversal da retina de coelho albino da raça *New Zealand*, antes de administração intravítrea, obtida por tomografia de coerência óptica (OTC), com discriminação de cada uma de suas camadas.....227

Figura 61 – Cortes transversais da retina de coelhos albinos da raça *New Zealand* representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração intravítrea de salina estéril (b) e do fármaco acetazolamida na dose de 0,020 mmol/L depois de três (c) e sete dias (d) para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.....228

Figura 62 – Cortes transversais da retina de coelhos albinos da raça *New Zealand* representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração de implante intravítreo branco (b) e de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de sete (c), quatorze (d), vinte e um (e), vinte e oito (f), trinta e cinco (g) e quarenta e dois dias (h), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.....229

Figura 63 – Cortes histológicas (20x/0.40mm) da retina de coelhos albinos da raça *New Zealand* representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois da administração intravítrea de salina estéril (b) e do fármaco acetazolamida na dose 0,020 mmol/L depois de três (c) e sete dias (d), para avaliação da toxicidade *in vivo*..... 232

Figura 64 – Cortes histológicas (20x/0.40mm) da retina de coelhos albinos da raça *New Zealand* representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois da administração intravítrea de implante intravítreo branco (b) e de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de sete (c), quatorze (d), vinte e um (e), vinte e oito (f), trinta e cinco (g) e quarenta e dois dias (h), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.....233

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos indicativos de estabilidade para determinação de teor e substâncias relacionadas de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo e em formas farmacêuticas.....	60
Tabela 2 – Métodos cromatográficos para quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, formas farmacêuticas e amostras biológicas, em ordem cronológica.....	65
Tabela 3 – Condições de estresse e agentes de degradação empregados no estudo de degradação forçada.....	76
Tabela 4 – Condições cromatográficas do método inicial.....	77
Tabela 5 – Gradiente exploratório inicial.....	78
Tabela 6 – Descrição do preparo das soluções de linearidade, para o método de determinação do teor de acetazolamida.....	79
Tabela 7 – Descrição do preparo das soluções de linearidade, para o método de determinação do teor de substâncias relacionadas.....	79
Tabela 8 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento fatorial 2^5 para avaliação da robustez.....	81
Tabela 9 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento de composto central para otimização de condições espectrométricas de ionização e fragmentação para analito e padrão interno.....	85
Tabela 10 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento Doehlert para otimização de condições da fonte electrospray para analito e padrão interno.....	86
Tabela 11 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento Doehlert para otimização da composição da fase móvel.....	88
Tabela 12 – Descrição do preparo das soluções de linearidade.....	89
Tabela 13 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento fatorial fracionário 25-1 para avaliação da robustez.....	91
Tabela 14 – Bandas de absorção e respectivas atribuições para o fármaco acetazolamida.....	107
Tabela 15 – Bandas de absorção e respectivas atribuições para o excipiente ácido polilático-co-glicólico.....	107
Tabela 16 – Condições cromatográficas para métodos indicativos de estabilidade para doseamento e substâncias relacionadas.....	114
Tabela 17 – Gradiente para métodos indicativos de estabilidade para teor e substâncias relacionadas.....	114
Tabela 18 – Parâmetros para avaliação da linearidade do método de teor.....	123

Tabela 19 – Parâmetros para avaliação da linearidade do método de substâncias relacionadas.....	123
Tabela 20 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método para determinação do teor de acetazolamida.....	126
Tabela 21 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método para determinação do teor de substâncias relacionadas.....	126
Tabela 22 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da exatidão do método determinação do teor de acetazolamida.....	127
Tabela 23 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da exatidão do método para determinação do teor de substâncias relacionadas.....	128
Tabela 24 – Resultados da avaliação da robustez para o método de teor de acetazolamida.....	129
Tabela 25 – Resultados da avaliação da robustez para o método de substâncias relacionadas.....	130
Tabela 26 – Condições de estresse finais ou <i>endpoints</i> definidos no estudo de degradação forçada.....	133
Tabela 27 – Teor do fármaco acetazolamida e dos produtos de degradação e balanço de massas para condições de estresse no estudo de degradação.....	134
Tabela 28 – Quadro geral do perfil de degradação do fármaco acetazolamida no insumo farmacêutico ativo...	136
Tabela 29 – Quadro geral do perfil de degradação do fármaco acetazolamida na mistura física.....	137
Tabela 30 – Sumário dos resultados obtidos para teor e produtos de degradação para insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreo no estudo de estabilidade acelerada.....	143
Tabela 31 – Determinação de peso dos implantes intravítreos.....	145
Tabela 32 – Determinação de comprimento, espessura, área e volume dos implantes intravítreos.....	147
Tabela 33 – Propriedades físico-químicas de analito e padrões interno.....	148
Tabela 34 – Transições de massa de quantificação e confirmação para analito e padrão interno.....	151
Tabela 35 – Parâmetros espectrométricos otimizados por planejamentos experimentais para analito e padrão interno.....	153
Tabela 36 – Condições cromatográficas para métodos indicativos de estabilidade para doseamento e substâncias relacionadas.....	165
Tabela 37 – Parâmetros para avaliação da linearidade.....	168
Tabela 38 – Recuperações e desvio padrão relativos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária...	170
Tabela 39 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da exatidão.....	171

Tabela 40 – Resultados da avaliação da robustez.....	172
Tabela 41 – Determinação da eficiência de incorporação do Fármaco.....	176
Tabela 42 – Ensaio de doseamento dos implantes intravítreos.....	177
Tabela 43 – Ensaio de uniformidade de doses unitárias dos implantes intravítreos.....	178
Tabela 44 – Delineamento experimental para avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do fármaco acetazolamida por eletrorretinografia em ratos Wistar.....	194
Tabela 45 – Delineamento experimental para avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> dos implantes intravítreos em coelhos.....	198
Tabela 46 – Parâmetros para avaliação do estado funcional da retina, para ondas <i>a</i> e <i>b</i> , antes e 1, 7 e 15 dias após administração de suspensão de acetazolamida em gel de carboximetilcelulose 0,5% m/v, nas doses de 0,010 mmol/L, 0,020 mmol/L e 0,040 mmol/L.....	210
Tabela 47 – Parâmetros na avaliação do efeito neuroprotetor, para ondas <i>a</i> e <i>b</i> , antes e 5 dias após administração de suspensão de acetazolamida em gel de carboximetilcelulose 0,5% m/v, na dose de 0,020 mmol/L.....	220
Tabela 48 – Espessuras da retina e suas camadas interna e externa, por tomografia de coerência óptica, para grupo sem intervenção, administrados de implante intravítreo branco e administrados de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias e 42 dias.....	230
Tabela 49 – Espessuras da retina e suas camadas interna e externa, por tomografia de coerência óptica, para grupo sem intervenção, administrados de implante intravítreo branco e administrados de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias e 42 dias.....	234

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.1 Objetivos específico.....	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1 Aspectos anatômicos e fisiológicos do olho humano.....	28
3.2 Glaucoma.....	30
3.3 Tratamento do glaucoma.....	33
3.4 Inibidores da anidrase carbônica.....	35
3.5 Acetazolamida.....	36
3.6 Formulações contendo acetazolamida para uso tópico.....	40
3.7 Implantes intraoculares para administração intravítrea.....	51
3.8 Estudos de pré-formulação, formulação e toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	56
3.9 Quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, especialidades farmacêuticas e fluidos biológicos oculares.....	62
CAPÍTULO 1 – SÍNTESE, ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CONTROLE DE QUALIDADE DE IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ACETAZOLAMIDA.....	68
1 MATERIAIS.....	69
1.1 Substâncias químicas de referência e insumos farmacêuticos.....	69
1.2 Solventes e reagentes.....	69
1.3 Vidrarias, consumíveis e colunas cromatográficas.....	70
1.4 Equipamentos.....	71
2 MÉTODOS.....	73
2.1 Desenvolvimento e síntese de implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	73
2.2 Estudos de compatibilidade fármaco-excipientes e caracterização físico-química dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	74
2.3 Estudos de estabilidade do insumo farmacêutico e implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	75

2.4 Controle de qualidade físico-químico dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
3.1 Desenvolvimento e síntese de implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	94
3.2 Estudos de compatibilidade fármaco-excipientes e caracterização físico-química dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	95
3.3 Estudos de estabilidade do insumo farmacêutico e dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	111
3.4 Controle de qualidade físico-químico dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida.....	145
4 CONCLUSÃO.....	184
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E BIOLÓGICA DOS IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ACETAZOLAMIDA.....	186
1 MATERIAIS.....	187
1.1 Insumos farmacêuticos e medicamentos.....	187
1.2 Reagentes biológicos.....	187
1.3 Solventes e reagentes.....	187
1.4 Vidrarias, consumíveis e correlatos.....	188
1.5 Equipamentos.....	188
2 MÉTODOS.....	191
2.1 Teste de esterilidade dos implantes intravítreos contendo acetazolamida.....	191
2.2 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do fármaco acetazolamida.....	192
2.3 Avaliação do efeito neuroprotetor do fármaco acetazolamida por eletrorretinografia de campo total.....	196
2.4 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> dos implantes intravítreos contendo acetazolamida.....	197
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	202
3.1 Teste de esterilidade dos implantes intravítreos contendo acetazolamida.....	202
3.2 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do fármaco acetazolamida.....	202
3.3 Avaliação do efeito neuroprotetor do fármaco acetazolamida por eletrorretinografia.....	217

3.4 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> dos implantes intravítreos contendo acetazolamida.....	220
4 CONCLUSÃO.....	235
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	236
PERSPECTIVAS.....	237
REFERÊNCIAS.....	238
ANEXOS.....	256

1 INTRODUÇÃO

Glaucoma é uma denominação geral para se referir a um grupo de neuropatias ópticas crônicas progressivas e multifatoriais, caracterizado por alterações típicas, como o aumento da escavação do disco óptico, morte de células ganglionares da retina e afinamento da borda neuroretiniana, em que o desfecho mais grave é a deficiência visual (JONAS *et al.*, 2017; QUIGLEY, 2011; WEINREB, AUNG, MEDEIROS, 2014). É a causa mais comum de cegueira irreversível e segunda causa de cegueira no mundo, superada apenas pela catarata (COOK, FOSTER, 2012; SCHMIDL *et al.*, 2015). Levantamentos de Cook e Foster (2012) e Tham *et al.* (2014) apontam para mais de 70 milhões de casos de glaucoma no mundo, com prevalência entre 1 e 2% e incidência de aproximadamente 2,4 milhões de novos casos/ano, principalmente entre indivíduos de 40 a 80 anos. No Brasil, ainda que a escassez de estudos dificulte uma estimativa mais correta, Sakata *et al.* (2007) relatam haver aproximadamente um milhão de casos. Este cenário epidemiológico é ainda mais alarmante quando se considera o elevado índice de subdiagnóstico, estimado em cerca de 50 a 90% dos pacientes (QUIGLEY, BROMAN, 2006; TOPOUZIS *et al.*, 2009).

Atualmente, diferentes mecanismos foram sugeridos para elucidar a fisiopatologia da doença, como perda de tecido conectivo, diminuição do aporte de fatores neurotróficos e nutrientes no nervo óptico, estresse mecânico sobre lâmina cribiforme, hipóxia e isquemia de vasos retinianos, excitotoxicidade do glutamato, estresse oxidativo, atuação do fator de necrose tumoral α , alterações no microambiente de células gliais e respostas inflamatórias disfuncionais (BAKALASH *et al.*, 2003; HARE *et al.*, 2001; JONAS *et al.*, 2017; KO *et al.*, 2000; MUNEMASA, KITAOKA, 2013; WEINREB, KHAW, 2004). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento e evolução, como idade, histórico familiar, etnia e condições associadas (LUSTHAUS, GOLDBERG, 2019), o aumento da pressão intraocular é o mais notório e único fator passível de intervenção, sendo, portanto, o alvo preferencial na terapia anti-glaucoma (KALOUDA *et al.*, 2017).

O aumento da pressão intraocular é consequência de alterações anatomofisiológicas na malha trabecular e canal de Schlemm, que impedem integral ou parcialmente a drenagem do humor aquoso (FUCHSHOFER, TAMM, 2012; SCHMIDL *et al.*, 2015). Estudos demonstram a eficiência da redução da pressão intraocular na prevenção da cegueira, preservação da visão e aumento da qualidade de vida em portadores de glaucoma (MCKINNON *et al.*, 2008;

SALOMÃO *et al.*, 2009). Este objetivo pode ser atingido cirurgicamente, mas a intervenção farmacoterapêutica permanece como primeira escolha (BRASIL, 2018; JONAS *et al.*, 2017). Diferentes medicamentos, geralmente administrados por via ocular, estão disponíveis comercialmente. Dentre esses, podem ser destacados os inibidores da anidrase carbônica, fármacos de enorme relevância clínica, por seu potente efeito hipotensor ocular, decorrente da inibição da anidrase carbônica nos processos ciliares e redução da produção do humor aquoso (BRECHUE, MAREN., 1993; HALL, 2017).

Primeiro e mais relevante representante dos inibidores da anidrase carbônica, a acetazolamida encontra-se atualmente disponível comercialmente apenas para administração sistêmica, por via oral ou intravenosa, para casos graves ou emergências. Contudo, o seu uso sistêmico associa-se a inúmeros e graves efeitos adversos e pouca tolerabilidade, como ceratite, síndrome de Stevens-Johnson, sonolência, letargia, cefaleia, tontura, formigamento e parestesia, desequilíbrio de pH e eletrolítico, discrasias sanguíneas, litíase renal e depressão, sendo limitada sua utilização na rotina (DIAMOX, 2019; MAREN, 1977). Concomitantemente, o desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração ocular do fármaco encontra muitas dificuldades, em razão de baixa solubilidade e baixa permeação corneana, que reduzem significativamente a biodisponibilidade do fármaco nos corpos ciliares, comprometendo sua efetividade (KAUR, SINGH, KANWAR, 2002). Neste contexto, os implantes intraoculares, para administração intravítrea, produzidos a partir de polímeros biocompatíveis e preferencialmente biodegradáveis, como o ácido polilático-co-glicólico (PLGA), representam promissora alternativa para administração direcionada e sustentada do fármaco. Este tipo de dispositivo diminuiria a frequência de administrações, garantiria maior adesão ao tratamento, minimizaria a toxicidade sistêmica e sobrepujaria as barreiras oculares (HEINIG *et al.*, 2017; SINGLA *et al.*, 2002; URTTI *et al.*, 2017).

O desenvolvimento e registro de novos medicamentos é um processo muito complexo e dispendioso, em que inúmeras exigências devem ser cumpridas para aprovação pelas agências regulatórias. É imprescindível assegurar que o produto desenvolvido é eficaz, seguro e possui qualidade, durante todo seu ciclo de vida (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2013; ANVISA, 2017; HOFF, CHEN, 2009). É por isso que, na fase pré-clínica, estudos de pré-formulação e formulação devem ser conduzidos, visando compreender as propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas, para que o produto final possua os atributos necessários para a finalidade proposta (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2013). Durante o desenvolvimento de um medicamento, a compatibilidade entre fármaco e

excipientes deve ser estudada minuciosamente, para investigação de interações, físicas ou químicas, que possam afetar sua qualidade, eficácia ou segurança. Diversos ensaios podem ser utilizados para este propósito, como calorimetria diferencial exploratória, termogravimetria, difração de raios X, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de Raman, microscopia eletrônica de varredura e cromatografia (CHADHA, BHANDARI, 2014; DAVE *et al.*, 2015). Estes, conjuntamente com estudos de toxicidade *in vitro*, em linhagens celulares específicas, e *in vivo*, em modelos animais, são fundamentais para assegurar que a administração do produto desenvolvido é segura (DUSINSKA *et al.*, 2017).

Da mesma forma, é de suma importância que se avalie a qualidade e estabilidade da formulação, uma vez desenvolvida, preferencialmente por cromatografia a líquido de alta eficiência, para garantir que os atributos esperados foram atingidos e são mantidos durante todo o período de validade do produto. Estes ensaios certificarão que doses corretas estão sendo sistematicamente administradas e que eventuais produtos de degradação estão ausentes ou presentes em níveis toleráveis, pressupostos imprescindíveis para que eficácia e a segurança demonstradas nas etapas anteriores não sejam comprometidas no decorrer dos processos de produção até o uso pelo paciente. Deve-se, portanto, certificar-se de empregar, em todos os estudos, métodos analíticos confiáveis, robustos, seletivos e com adequada detectabilidade, especialmente para quantificação de fármacos no produto final e em amostras biológicas oculares (HEINIG *et al.*, 2017; XUE *et al.*, 2012).

Atualmente, o manejo do glaucoma conta com diferentes medicamentos aprovados e comercializados no Brasil e no mundo, capazes de reduzir a pressão intraocular e prevenir sua progressão. Entretanto, existem muitos inconvenientes nas formulações disponíveis, fazendo com que o controle dessa enfermidade ainda seja um desafio, como mencionado pelo Instituto Europeu de Visão (CURSIFIEN *et al.*, 2019). Neste contexto, a presente tese versará sobre o desenvolvimento de implantes intravítreos para administração ocular e sustentada de acetazolamida e se dividirá em dois capítulos. No primeiro capítulo, serão relatados o desenvolvimento e caracterização físico-química dos dispositivos, com um abrangente estudo de pré-formulação e formulação, desenvolvimento e validação de métodos de analíticos para avaliação da qualidade, estabilidade, perfil de liberação e farmacocinética em insumo farmacêutico ativo, produto final e amostras biológicas oculares. No segundo capítulo, serão abordados o controle de qualidade microbiológico e avaliação biológica dos implantes, com foco nos estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver de implantes intravítreos de ácido poli-lático-*co*-glicólico contendo acetazolamida para tratamento do glaucoma e avaliar suas características físico-químicas, microbiológicas e biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver implantes intravítreos de ácido poli-lático-*co*-glicólico contendo acetazolamida.
- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), utilizando planejamento experimental, para doseamento de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, implantes intravítreos e amostras oculares, controle de qualidade e estudos de perfil de liberação *in vitro* e farmacocinética.
- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) para determinação de acetazolamida, impurezas de síntese e produtos de degradação em insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreos, para estudo de estabilidade.
- Avaliar a compatibilidade fármaco-excipientes entre a acetazolamida e o ácido polilático-*co*-glicólico.
- Realizar a caracterização físico-química do insumo farmacêutico ativo, ácido polilático-*co*-glicólico e implantes intravítreos.
- Avaliar a toxicidade *in vitro* da acetazolamida, em células do epitélio pigmentar da retina da linhagem ARPE-19.
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida, em coelhos albinos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos anatômicos e fisiológicos do olho humano

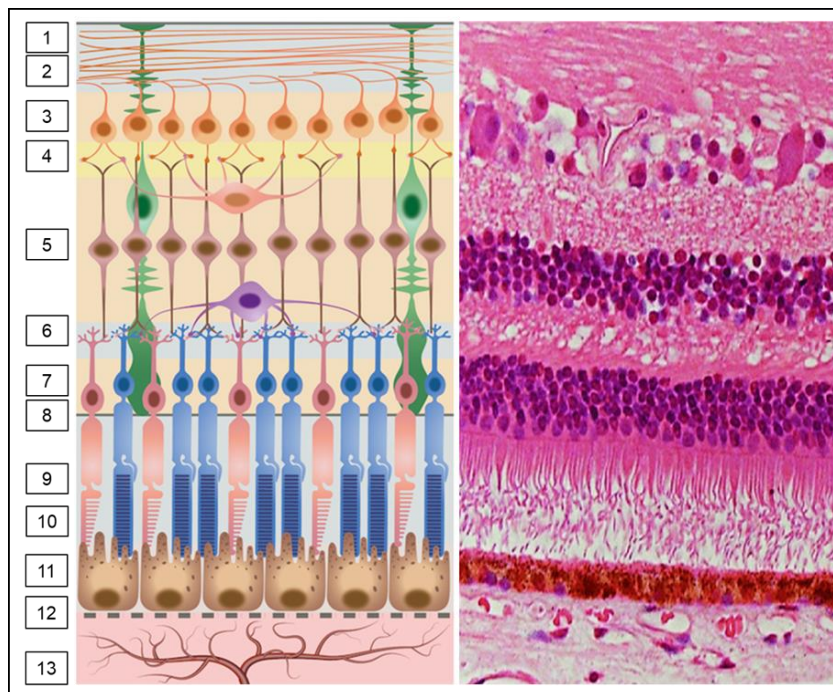
O olho humano é um órgão de enorme complexidade anatômica e fisiológica. É composto pelo bulbo ocular, uma esfera situada na órbita, recoberto pela cápsula de Tenon, e pode ser dividido nos segmentos anterior e posterior. O segmento anterior, preenchido por humor aquoso, comporta córnea, limbo, íris, câmara anterior, câmara posterior, rede trabecular, canal de Schlemm, zônula, corpo ciliar e cristalino, enquanto o segmento posterior compõe-se de humor vítreo, esclera, coróide, retina e nervo ótico (KELS, GRZYBOWSKI, GRANT-KELS, 2015; NETTER, 2014; STANDRING, 2016). O globo ocular constitui-se de três túnicas concêntricas, uma mais externa, mais fibrosa, para proteção e suporte, formada por esclera, córnea e limbo; uma média, a úvea ou trato uveal, vascular, para nutrição, constituída por íris, coróide e corpo ciliar; e uma mais interna, sensorial, representada pela retina (MALHOTRA *et al.*, 2011; PRESLAND, 2007).

A retina encontra-se internamente em contato com o humor vítreo e externamente com a coróide, sendo nutrida pelos capilares coroidais e artéria retinal central (YASUKAWA *et al.*, 2005). É uma estrutura altamente especializada, em que ocorre recepção dos estímulos luminosos e tradução nos impulsos nervosos, que serão direcionados e processados no sistema nervoso central. Pode ser subdividida em retina sensorial ou neuroretina e células do epitélio pigmentar da retina, unidas por zônulas de oclusão, zônulas de aderência e desmossomos que, conjuntamente com vasos retinianos, formam a barreira hematorretiniana, uma estrutura que dificulta a difusão passiva de substâncias, como fármacos.

Na **Figura 1**, observa-se a estrutura da retina, composta histologicamente por células neuronais, como bastonetes e cones, células horizontais, células bipolares, células amácrinas, células interplexiformes e células ganglionares, células gliais e células do epitélio pigmentar da retina, organizadas pelas camadas [1] membrana interna limitante, [2] camada de fibras do nervo óptico, [3] camada de células ganglionares, [4] camada interna plexiforme, [5] camada nuclear interna, [6] camada externa plexiforme, [7] camada nuclear externa, [8] membrana externa limitante, [9] camada de fotorreceptores projetados na camada pigmentada, [10] camada externa contendo corpos celulares de fotorreceptores e [11] epitélio pigmentar da

retina, delimitadas por [12] membrana de Bruch e [13] coróide (PRESLAND, 2007; STANDRING, 2016).

Figura 1 - Estrutura representativa e corte histológico da retina e suas camadas.



Fonte: Extraído, com modificações, de FERRARA *et al.* (2021) e DING, KUMAR, MOK (2017).

O humor aquoso é um fluido continuamente produzido no epitélio dos corpos ciliares. É formado por aproximadamente 98% de água, além de eletrólitos, como sódio, cloreto e bicarbonato, proteínas, citocinas, compostos orgânicos e fatores de crescimento. O íon bicarbonato, imprescindível para sua formação, é produzido pela reação de hidratação do dióxido de carbono, catalisada pela enzima anidrase carbônica (HALL, 2017; STANDRING, 2016). Seu influxo promove influxo de sódio e água para o interior das células epiteliais, nos processos ciliares, com consequente formação do humor aquoso. Depois de formado, o fluido é secretado ativamente, na velocidade de 2-3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Uma vez secretado, deve fluir pelos processos ciliares, cristalino e pupila até a câmara anterior e, depois, para a córnea (KOTECHA *et al.*, 2015; LOMELINO, MCKENNA, 2016).

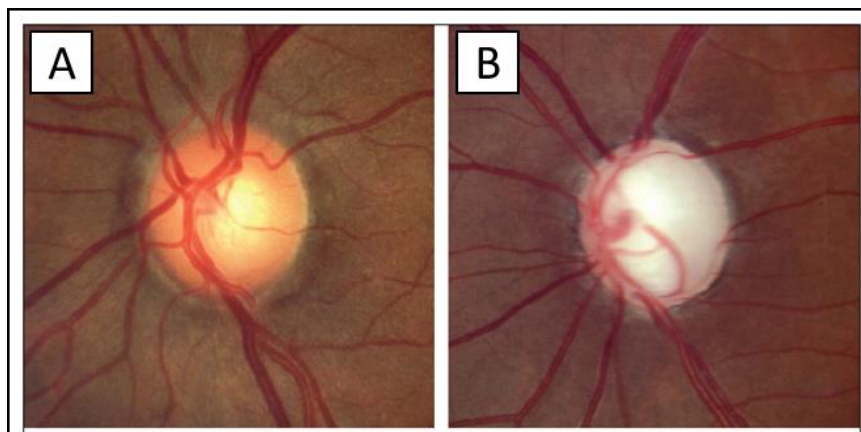
Durante seu efluxo, o humor aquoso pode ser drenado por duas vias, a via convencional ou a via alternativa ou uveoscleral. No mecanismo mais comum, pela via convencional, ocorre

passagem do fluido pelo ângulo iridocorneano e malha trabecular, que o filtra passivamente para o canal de Schlemm, para ser removido pelas veias maiores da circulação ocular, por processo dependente dos níveis de pressão intraocular, que encontra como principais pontos de resistência a malha trabecular e a camada interna do canal de Schlemm (KOTECHA *et al.*, 2015; WEINREB *et al.*, 2014). Na via uveoscleral, secundária, o humor aquoso é drenado pelos espaços supraciliar e supracoroidal, com remoção pela circulação linfática. O controle da pressão intraocular é regulado pelo equilíbrio entre influxo e efluxo do humor aquoso. Em indivíduos saudáveis, o equilíbrio é suficiente para manter a pressão intraocular em níveis entre 10-21 mmHg. Em contrapartida, quando ocorre desequilíbrio, observa-se aumento da pressão intraocular, fator de risco para o glaucoma (HALL, 2017; WEINREB *et al.*, 2014).

3.2 Glaucoma

O glaucoma compreende um grupo heterogêneo de doenças crônicas e progressivas, de etiopatologia multifatorial, que diferem quanto a sua causa, fatores de risco, demografia, quadro clínico, duração, tratamento e prognóstico (JONAS *et al.*, 2017). Todavia, compartilham como estágio final comum uma neuropatia óptica, marcada por alterações estruturais típicas no disco óptico e/ou déficit funcional (WEINREB, AUNG, MEDEIROS, 2014). No glaucoma, observa-se morte ou perda axonal de células ganglionares da camada mais interna da retina, em número substancial, redução da espessura da camada de fibras nervosas da retina e/ou aumento da escavação do disco óptico, com repercussão no campo visual (JONAS *et al.*, 2017; QUIGLEY, 2011). Com a perda de células ganglionares e deformação do tecido conectivo de suporte, o centro pálido do disco óptico sofre aumento da escavação, modificação estrutural mais comum relatada no diagnóstico, conforme observado na **Figura 2**. Uma segunda alteração marcante é o afinamento da camada de fibras nervosas ou perda da borda neuroretiniana (COOK, FOSTER, 2012; QUIGLEY, 2011).

Figura 2 – Aspectos morfológicos do copo do disco óptico, em um indivíduo sadio (a) e em um indivíduo com glaucoma (b), com notável aumento da escavação do disco óptico.



Fonte: Extraído, com modificações, de QUIGLEY (2011)

O glaucoma pode ser subdividido em glaucoma de ângulo aberto ou glaucoma de ângulo fechado, que podem ser primários ou secundários, ou ainda glaucoma congênito, de acordo com critérios como modificações anatômicas no ângulo iridocorneano e quadro hipertensivo ocular (CASSON *et al.*, 2012). O ângulo iridocorneano é a parte do globo ocular em que ocorre o encontro da íris com esclera e córnea. Em alguns pacientes glaucomatosos, portadores de glaucoma de ângulo fechado, a pressão intraocular está aumentada justamente porque ocorre obstrução da malha trabecular pela íris, causando fechamento do ângulo. Em outros, no entanto, portadores de glaucoma de ângulo aberto, não há obstrução ao fluxo de humor aquoso ao nível do ângulo iridocorneano, mas sim anormalidades na malha trabecular que intensificam a resistência ao fluxo, com repercussão na pressão intraocular (BRASIL, 2018; HALL *et al.*, 2017).

No glaucoma primário de ângulo aberto (POAG, *primary open-angle glaucoma*), forma mais prevalente, ocorre dano ao nervo óptico com déficit visual compatível, mas sem anormalidades oculares ou sistêmicas para justificar um aumento na pressão intraocular. É crônico e insidioso, com progressão lenta, que pode demorar meses a anos para se manifestar. Normalmente, o desfecho é a perda irreversível da visão periférica, com redução da acuidade visual central e temporal nos quadros mais avançados (QUIGLEY, 2011). Frequentemente é bilateral, assimétrica e possui prevalência que aumenta proporcionalmente com o aumento da pressão intraocular (ALMASIEH *et al.*, 2012; CASSON *et al.*, 2012; QUIGLEY *et al.*, 2001). Pode ocorrer de forma secundária em decorrência de síndrome de dispersão pigmentar,

síndrome esfoliativa, uveíte, uso de corticosteroides, trauma ou aumento da pressão venosa episcleral (BIELORY, 2006; SCHMIDL *et al.*, 2015).

O aumento da pressão intraocular *per si* não pode ser considerada característica definitiva ou única para o glaucoma, que pode ocorrer com qualquer faixa de pressão intraocular, mesmo nos pacientes normotensos. Além disso, ocorrem casos de portadores de hipertensão ocular em pacientes não-glaucomatosos (BRASIL, 2018). Entretanto, o aumento da pressão intraocular é o mais notório, relevante e amplamente estudado fator de risco para a doença, especialmente para o glaucoma de ângulo aberto, em que exerce papel crucial para a patogênese (STAMER, ACOTT, 2012; TAMM, 2009; VASS *et al.*, 2007). É, ainda, o único fator de risco notavelmente passível de interferência sendo, portanto, o principal alvo terapêutico.

O glaucoma é, indiscutivelmente, um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo a segunda causa de cegueira mais importante e a primeira causa de cegueira irreversível (COOK, FOSTER, 2012; KINGMAN, 2004). Estima-se que existem atualmente mais de 70 milhões de indivíduos portadores de glaucoma no mundo. Aproximadamente um milhão de casos ocorre no Brasil, em que se admite prevalência de cerca de 1% (BRASIL, 2018), podendo ser ainda maior em avaliações regionais, variando entre 2-3%, em indivíduos com mais de 40 anos (CORAL-GHANEM, 1984; 1993; SAKATA *et al.*, 2007). De acordo com Gonçalves *et al.* (2013), sua incidência pode ser estimada em 2,4 milhões de novos casos por ano.

Em virtude da importância epidemiológica, gravidade e irreversibilidade do desfecho, o diagnóstico precoce é imprescindível para prevenir o desenvolvimento e a progressão da doença (JONAS *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2008). O aumento da pressão intraocular é importante indício e deve ser monitorado como critério, mas não isolada ou definitivamente. O foco deve incluir critérios diagnósticos como exame da cabeça do nervo óptico e camada de fibras nervosas da retina, buscando alterações como perda de borda neuroretiniana, aumento da escavação do disco, alargamento da zona parapapilar, afinamento da camada de fibras nervosas da retina e hemorragias (QUIGLEY, 2011; SCHMIDL *et al.*, 2015). Tanto o diagnóstico quanto a determinação da gravidade do glaucoma requerem profunda avaliação oftalmológica, que deve incluir oftalmoscopia ou exame de fundo de olho, anamnese, exame binocular, exame de acuidade visual, exame pupilar, biomicroscopia do segmento anterior, tonometria de aplanção de Goldmann e biomicroscopia de fundo, fundoscopia sob midríase

e, preferencialmente, retinografia colorida binocular (COOK, FOSTER, 2012; SCHMIDL *et al.*, 2015). Exames mais complexos e caros de imagem, incluindo tomografia de coerência óptica de domínio espectral ou polarimetria de varredura a laser, podem ser utilizados (QUIGLEY, 2011; SHARMA *et al.*, 2008), enquanto gonioscopia pode ser útil no diagnóstico diferencial entre os subtipos de glaucoma (BRASIL, 2018).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece consultas e exames para diagnóstico, acompanhamento, tratamento, cirurgias e implantes de prótese, gratuitamente. O Ministério da Saúde propõe políticas públicas para a conscientização e combate ao glaucoma, como o Projeto Glaucoma e o Dia Nacional do Combate ao Glaucoma, organizado em maio, como estabelecido na lei federal 10.456/2002. Uma vez que cada forma da doença requer uma abordagem terapêutica diferenciada, a escolha do tratamento adequado requer, antes de tudo, um diagnóstico preciso e abrangente. Portanto, no mês de abril de 2018, a Secretaria de Atenção à Saúde e a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, ambas vinculadas ao Ministério da Saúde, aprovaram uma portaria conjunta (número 11/2018) que aprova o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas do glaucoma no Brasil, sendo um guia orientativo para seu diagnóstico e manejo (BRASIL, 2018).

3.3 Tratamento do glaucoma

No cenário presente, a redução da pressão intraocular é estratégia prioritária na terapia anti-glaucoma, objetivando, conforme afirmam Kalouda *et al.* (2017), a preservação da função visual e mais qualidade de vida, a custo sustentável. Embora de etiopatologia multifatorial, estudos clínicos, como os publicados por McKinnon *et al.* (2008) e Salomão *et al.* (2009), demonstram efetividade da abordagem na prevenção da cegueira ou perda parcial de visão. Para efeito clinicamente relevante, busca-se diminuição da pressão intraocular entre 20 e 50%, relativa aos níveis basais, que pode ser atingido por terapia a laser, intervenção cirúrgica ou farmacoterapia, com uso de medicamentos por via tópica, oral ou intravenosa (BRASIL, 2018; JONAS *et al.*, 2017; QUIGLEY, 2012; SCHMIDL *et al.*, 2015).

A farmacoterapia é padrão-ouro para o glaucoma de ângulo aberto e para maioria de casos de glaucoma de ângulo fechado (EUROPEAN, 2017). Fármacos anti-glaucoma encontram-se disponíveis desde 1875, quando Hardy descobriu a pilocarpina. Atualmente, muitos fármacos

encontram-se disponíveis no mercado, mais comumente nas formas farmacêuticas solução ou suspensão de uso oftálmico, também denominados colírios (BRASIL, 2018; SCHMIDL *et al.*, 2015). Escolher um esquema terapêutico deve ser pautado em diferentes parâmetros, relativos ao paciente ou aos medicamentos, como eficácia, conveniência e riscos de cada via de administração, perfil de segurança, relação custo-benefício, idade, gravidade e risco de progressão, comorbidades ou outras condições associadas (BRASIL, 2018; KALOUDA *et al.*, 2017).

Durante pesquisa no *website* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram encontrados registros para 12 fármacos utilizados no tratamento de glaucoma, quais sejam acetazolamida, bimatoprost, brinzolamida, cloridrato de betaxolol, cloridrato de dorzolamida, cloridrato de levobunolol, cloridrato de pilocarpina, latanoprost, maleato de timolol, tafluprost, tartarato de brimonidina e travoprost. Entre os medicamentos antiglaucomatosos aprovados pela agência regulatória, há ampla disponibilidade, uma vez que 130 medicamentos foram aprovados, entre referência, similares e genéricos. Na sua maioria são para uso tópico, e contêm fármacos isolados ou em associação, que foram considerados mais efetivos (ANVISA, 2022; COX *et al.*, 2008; HIGGINBOTHAM *et al.*, 2010; KASS *et al.*, 2002).

Destes, o Ministério da Saúde incluiu somente 8 fármacos na atual Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2022), que foram acetazolamida comprimidos, brinzolamida suspensão oftálmica, bimatoprost, dorzolamida, pilocarpina, brimonidina, latanoprost, timolol e travoprost, todos na forma de solução oftálmica. Em lista ainda mais restritiva, a Organização Mundial da Saúde recomenda o uso de apenas quatro fármacos, incluindo acetazolamida comprimidos, pilocarpina, latanoprost e timolol soluções oftálmicas (WHO, 2021). A acetazolamida está presente nas duas listas, sendo o único inibidor da anidrase carbônica. Percebe-se, assim, sua importância na farmacoterapia do glaucoma, mesmo depois de quase 70 anos de sua inserção no mercado.

Todavia, é necessário aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento, comumente o maior empecilho, uma vez que se estima que, em média, somente 50% dos pacientes que fazem uso de medicamentos para glaucoma mantenham-no após um ano de seu início, sendo que somente 60-70% das doses prescritas são realmente administradas (FRIEDMAN *et al.*, 2007). Os baixos índices de adesão evidenciam a urgência de estratégias para que se alcance

resultados mais efetivos, com alternativas mais simples, convenientes, eficazes, baratas, seguras e com maior duração de efeito (OLTHOFF *et al.*, 2005).

3.4 Inibidores da anidrase carbônica

Anidrases carbônicas são metaloenzimas contendo zinco como grupo prostético no sítio ativo, que participam na catálise das reações de hidratação e desidratação do dióxido de carbono, ou seja, na interconversão de dióxido de carbono e água em ácido carbônico, com posterior dissociação em íons bicarbonato e hidrogênio e vice-versa. O processo é importante no equilíbrio ácido-base para manutenção do pH, equilíbrio hidroeletrolítico e transporte de dióxido de carbono. Em humanos, as anidrases carbônicas dividem-se em diversas isoformas, com ampla distribuição tecidual, sendo categorizadas em citosólicas (CA-I, CA-II, CA-III, CA-VII e CA-XIII), mitocondriais (CA-Va e CA-Vb), secretadas (CA-VI), associadas a membranas (CA-IV, CA-IX, CA-XII, CA-XIV e CA-XV) e acatalíticas (CA-VIII, CA-X e CA-XI) (LOVEJOY *et al.*, 1998; BRETON, 2001). No olho humano, principalmente nos processos ciliares, encontram-se presentes as isoformas CA-I, CA-II, CA-IV e CA-XII, que participam ativamente na produção de humor aquoso (AGGARWAL *et al.*, 2013; MINCIONNE, SCOZZAFAVA, SUPURAN, 2008).

Os inibidores da anidrase carbônica são fármacos quimicamente derivados de sulfonamidas, que exercem seu efeito por inibição nos processos ciliares, ao se ligarem ao zinco presente no seu sítio catalítico. Por isso, impedem a secreção ativa de humor aquoso, pela interrupção da formação de bicarbonato (SCHMIDL *et al.*, 2015). De acordo com Brechue e Maren (1993), é necessária inibição de cerca de 99% nos processos ciliares para diminuição perceptível da pressão intraocular. Estes inibidores foram introduzidos pela primeira vez em 1954, com a síntese acetazolamida por Maren *et al.*, sendo introduzidos na prática clínica no tratamento do glaucoma em 1955. Posteriormente, outros fármacos, como diclorfenamida, etoxzolamida, metazolamida, dorzolamida e brinzolamida, foram desenvolvidos. Tradicionalmente desenvolvidos para uso como diuréticos, estes fármacos possuem outras aplicações, mais recentes, como anticonvulsivantes e antiepilépticos (MASEREEL *et al.*, 2002; MILLICHAP, WOODBURY, GOODMAN, 1955; THIRY *et al.*, 2007), como agentes anti-obesidade (SUPURAN, 2008), agentes antitumorais (LOMELINO, MCKENNA, 2016; NOCENTINI,

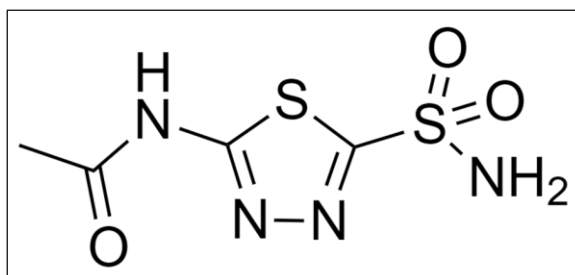
SUPURAN, 2018), antimicrobianos, contra micobactérias (ASPATWAR *et al.*, 2018; JOHNSON *et al.*, 2015) e na síndrome de Irvine-Gass (ORSKI, GAWECKI, 2021). Atualmente, os representantes mais utilizados são acetazolamida, dorzolamida e brinzolamida (BRASIL, 2018).

De forma geral, o uso tópico dos inibidores, mais precisamente da dorzolamida e da brinzolamida, raramente se associa a efeitos adversos, exceto com o uso crônico, que pode acarretar efeitos adversos oculares, como queimação e ardor, lacrimejamento, ceratite superficial pontuada, dermatite de contato periorbital, conjuntivite alérgica e visão turva (LUSTHAUS, GOLDBERG, 2019; SCHMIDL *et al.*, 2015). O uso de brinzolamida, 2 vezes ao dia, e dorzolamida, 3 vezes ao dia, produz resultados satisfatórios, com redução da pressão intraocular, entre 15 e 20% (KALOUDA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016). Atualmente, a acetazolamida é o único fármaco empregado para tratamento de glaucoma por via sistêmica – de forma oral ou intravenosa.

3.5 Acetazolamida

Quimicamente denominada *N*-[5-(aminosulfonil)-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida ou ainda *N*-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida, a acetazolamida possui fórmula química $C_4H_6N_4O_3S_2$, massa molar 222,237 g/mol e massa exata 221,988 Da. A estrutura química do fármaco é demonstrada na **Figura 3**. É um pó cristalino fino, branco, quase branco ou levemente amarelado, insípido e inodoro (DRUGBANK, 2019; FARMACOPEIA, 2019; MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2011; PUBCHEM, 2019).

Figura 3 – Estrutura química da acetazolamida



O fármaco é pouco solúvel em água, com solubilidade reportada entre 0,70 e 0,98 mg/mL, mas moderadamente solúvel em água fervente, ligeiramente solúvel em etanol e acetona, praticamente insolúvel em solventes orgânicos, como tetracloreto de carbono, clorofórmio e éter etílico e facilmente solúvel em soluções diluídas de hidróxidos ou carbonato de sódio (CALLES *et al.*, 2018; FARMACOPEIA, 2019; KAUR, SINGH, KANWAR, 2000). Possui ponto de fusão entre 258 e 261 °C, com decomposição por efervescência. É um ácido fraco, com duas constantes de dissociação (pKa), de 6,55 e 7,28 (CHEMICALIZE, 2019), embora outros trabalhos, mencionem diferentes valores, de 7,2 e 9,0 (MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2011; SINGLA *et al.*, 2002). Moffat, Osselton e Widdop (2011) relatam coeficiente de partição (log P) de -1,04, mas outras referências descrevem log P de -0,26 (DRUGBANK, 2019; PUBCHEM, 2019).

O log P é menor na medida em que o pH é aumentado, em virtude do aumento do percentual da forma duplamente ionizada, mais polar (CHEMICALIZE, 2019). É, por isso, classificada como fármaco classe IV, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, possui baixa solubilidade e baixo poder de permeação, com coeficiente de permeabilidade de apenas $4,1 \times 10^{-6}$ cm/s (CALLES *et al.*, 2018; GRANERO *et al.*, 2008; KAUR, SINGH, KANWAR, 2000). Em virtude de suas propriedades físico-químicas, desenvolver formas farmacêuticas oculares para acetazolamida sempre foi um enorme desafio para pesquisadores e indústria farmacêutica.

A acetazolamida é rapidamente absorvida pela via oral, com picos de concentração máxima (*C_{max}*) variando entre 10.000-15.000 ng/mL, usualmente, entre 1-4 horas após a administração de doses recomendadas nas bulas do medicamento, por via oral. Contudo, Sharp (1987) alerta que existe grande variabilidade individual nas concentrações plasmáticas, que, segundo seu estudo, podem variar entre 5.000-30.000 ng/mL (BRUNTON, HILAL-DANDAN, KNOLLMANN, 2018; SINGLA, 2002). Tem início e duração de ação de, respectivamente, 1-1,5 horas e 8-12 horas (MEDSCAPE, 2019). Suas concentrações plasmáticas médias obtidas por via oral estão associadas a efeito terapêutico, uma vez que concentrações entre 5.000-20.000 ng/mL foram consideradas efetivas (; BERSON *et al.*, 1980; FRIEDLAND, MALLONEE, ANDERSON, 1977; LEHMANN, LINNÉR, WISTRAND, 1970; SHARP, 1987). Moffat, Osselton e Widdop (2011) indicam que, para glaucoma, níveis séricos de 4.000-5.000 ng/mL seriam suficientes para efeito desejável, enquanto concentrações maiores que 25.000 ng/mL causariam toxicidade.

Distribui-se facilmente por diferentes tecidos corpóreos, com maior afinidade por aqueles ricos em anidrase carbônica, como rins e eritrócitos, em que se acumulam, fígado, músculos, sistema nervoso central e olhos (BRUNTON, HILAL-DANDAN, KNOLLMANN, 2018). Encontra-se extensivamente ligada a proteínas plasmáticas, principalmente albumina, em níveis superiores a 90%, de maneira concentração-dependente (SENG YUE, 2013). Um volume de distribuição (Vd) de 3 L/kg foi relatado (ROY *et al.*, 1992), mas atualmente admite-se Vd entre 0,20 a 0,38 L/kg (MEDSCAPE, 2019; SCHWENCK *et al.*, 1995), que confirma o alto grau de ligação a proteínas plasmáticas e eritrócitos. Não sofre biotransformação, sendo excretada, sem modificações, pela urina, por filtração glomerular e secreção tubular ativa, por transportadores de pequenas substâncias orgânicas carregadas negativamente. Todo este processo é consideravelmente rápido, possuindo meia-vida de eliminação de 2-12 horas e excreção de aproximadamente 70-90% da dose administrada na urina em 24 horas, com aumento da depuração em urina alcalina. Existe eliminação, em quantidades mínimas, sem modificações, pela bile, mas qualquer eliminação extrarrenal é insignificante (BRUNTON, HILAL-DANDAN, KNOLLMANN, 2018; KUNKA, MATTOCKS, 1979; SCHWENCK *et al.*, 1995; SINGLA, 2002; WISTRAND, 1972).

A administração de acetazolamida associa-se a muitos efeitos adversos oculares, como ardor ocular, ceratite superficial, lacrimejamento e visão turva, ou eventos mais raros e mais graves, como edema corneano, miopia transiente e síndrome de Stevens-Johnson (DIAMOX, 2019; QUIGLEY, 2012; SCHMIDL *et al.*, 2015). Todavia, sua baixa tolerabilidade, por via oral ou intravenosa, deve-se primariamente aos graves efeitos sistêmicos, decorrentes da ampla distribuição da anidrase carbônica pelo organismo, como sonolência, parestesias cutâneas, sensação de gosto amargo, letargia, cefaleia, tontura, formigamento periférico, disgeusia, náuseas, fraqueza, litíase, disfunção auditiva, desequilíbrio hidroeletrólítico, distúrbios gastrintestinais, acidose metabólica, diminuição de apetite, depressão, diminuição de libido e discrasias sanguíneas, como agranulocitose, anemia aplásica, trombocitopenia e pancitopenia (DIAMOX, 2019; MAREN, 1977; EPSTEIN, GRANT, 1977).

Sistemicamente, reduz a pressão intraocular em cerca de 30-40%, valor significativamente superior aos 15-20% obtidos para outros inibidores da anidrase carbônica por via ocular, como dorzolamida e brinzolamida. Maus *et al.* (1997) observaram redução de 30% na produção de humor aquoso para o fármaco, enquanto apenas 17% para dorzolamida, resultando em redução na pressão intraocular iguais a 19% e 13%, respectivamente. Ladas *et al.* (1997) e Portellos, Buckley e Freedman (1998) relataram resultados similares, destacando

que todos os representantes mais recentes dos inibidores eram igualmente ou menos efetivos que a acetazolamida, confirmando o enorme potencial do fármaco para tratamento do glaucoma, o que justifica os esforços no desenvolvimento de formulações por via ocular para o fármaco nos últimos anos.

Em outros países, encontra-se disponível na forma de comprimidos de 125 e 250 mg, com nome fantasia Diamox[®], cápsulas de liberação prolongada de 250 e 500 mg, com nome fantasia Diamox SR[®], e pó para solução injetável de 500 mg contendo sal sódico de acetazolamida, com nome fantasia Diamox Sódico[®], usado por via intravenosa. Contudo, no Brasil, encontram-se disponíveis somente comprimidos de 250 mg, produzidos pela União Química, sem genéricos ou similares, sob mesmo nome fantasia. Em caráter excepcional, a importação do sal sódico para solução injetável foi autorizado pelo Ministério da Saúde, desde 2014, pela Instrução Normativa 1/2014. Para comprimidos, recomenda-se administração de doses de 250 mg, 4 vezes por dia.

Todavia, como se sabe, a via ocular de administração de medicamentos apresenta benefícios incontestáveis, como maior conveniência, maior segurança, menor risco de toxicidade, menor invasividade, efeito local e imediato, maior estabilidade, melhor relação custo-benefício e maior facilidade de administração, possibilitando, inclusive, a autoadministração (SINGLA *et al.*, 2002). Por isso, é a via mais prescrita no tratamento de doenças oculares, sendo responsável, atualmente, por mais de 80% do mercado de medicamentos oftálmicos (AGRAHARI *et al.*, 2016; RATHORE, NEMA, 2009). Entretanto, muitos empecilhos devem ser sobrepujados na farmacoterapia ocular pela via ocular, pois, em virtude de sua complexidade e particularidade anatomofisiológica, o olho possui muitas barreiras estáticas e dinâmicas, incluindo inúmeras camadas da córnea, conjuntiva e esclera, barreira hematoaquosa e barreira hematorretiniana, melanina, um pigmento no qual muitos fármacos ligam-se extensivamente, ato reflexo de piscar, *clearance* sanguíneo e linfático, drenagem nasolacrimal e bombas de efluxo, que reduzem o tempo de residência e a biodisponibilidade após administração, de modo que apenas cerca de 5% ou menos da dose administrada é efetivamente absorvida pelo olho (DEL AMO *et al.*, 2017; GAUDANA *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2013; URTTI *et al.*, 2017).

Como agravante, as propriedades físico-químicas da acetazolamida, como baixa permeação corneana e baixa solubilidade, justificam a falta de formas farmacêuticas para administração ocular do fármaco. Desde sua descoberta, no ano de 1954, muitas estratégias diferentes foram

utilizadas para o desenvolvimento de formulações oculares e intraoculares. Entretanto, os primeiros estudos de administração intraocular, pelas vias tópica, subconjuntival, intravítrea e com emprego de iontoforese, falharam, não conseguindo atingir resultados satisfatórios na diminuição da pressão intraocular em animais, como os trabalhos de Green *et al.* (1955), Foss (1955) e Friendenwald (1955), interrompendo, por quase 20 anos, esforços nesta direção (KAUR, SINGH, KANWAR, 2002; SINGLA *et al.*, 2002; SIRBAT *et al.*, 2000).

3.6 Formulações contendo acetazolamida para uso tópico

Muito tem sido investido para o desenvolvimento de formulações de uso tópico contendo acetazolamida. Entretanto, como discutiram criticamente Granero e Longhi (2010), sistemas efetivos e seguros para liberação ocular de fármacos no geral, e mais especificamente para a acetazolamida, seguem sendo enorme desafio para indústrias farmacêuticas e centros de pesquisa. Nos próximos parágrafos, serão abordados estudos reportados nos últimos anos em que diferentes estratégias foram utilizadas para aumento da solubilidade, permeação corneana ou tempo de permanência do fármaco, objetivando-se maior biodisponibilidade ocular.

3.6.1 Soluções oftálmicas concentradas, em pH alcalino e em doses repetidas

Nos primeiros estudos, muitos autores propuseram que o uso de soluções oftálmicas com concentrações superiores a 10% m/v do fármaco, em pH alcalino, resolveriam o problema de biodisponibilidade. Esta estratégia foi primeiramente sugerida por Flach e Peterson, em 1981, utilizando-se coelhos pigmentados como modelo animal, em que se observou redução na pressão intraocular que fora induzida experimentalmente. Todavia, anos depois, em 1984, o mesmo grupo de pesquisa, em trabalho de Flach, Peterson e Seligmann (1984), concluiu que, se comparado aos efeitos obtidos para administração via intravenosa, a diminuição da pressão intraocular, de 2-3 mm Hg contra 7-8 mm Hg, foi muito menor e clinicamente irrelevante. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos pouco antes por Stein *et al.* (1983) e Lewis *et al.* (1984) que, com protocolos similares, encontraram que acetazolamida na concentração

de 10% m/v em pH alcalino não só não diminuiu significativamente a pressão intraocular em coelhos, como não alterou a produção de humor aquoso nos animais.

Duas razões foram, *a posteriori*, propostas por Kaur, Singh e Kanwar (2010) como prováveis justificativas, quais sejam maior irritação ocular, que causaria maior drenagem do fármaco após instilação, por causa da hipertonicidade da formulação; ou maior degradação do fármaco em pH alcalino, como reportado por Gupta e Parasrampur (1989) e por Parasrampur (1993). Diante dos resultados, uma sugestão fornecida pelos pesquisadores seria administrar doses oculares do fármaco, intercaladas com doses menores ou intermitentes por via oral.

3.6.2 *Uso de viscosantes, bioadesivos, gelificantes e promotores de permeação e absorção*

Diversos viscosantes, espessantes e agentes mucoadesivos, como os derivados da celulose, álcool polivinílico e polivinilpirrolidona, têm sido comumente utilizados no desenvolvimento de medicamentos oftálmicos. Estes excipientes aumentam a resistência da formulação aos mecanismos de eliminação, aumentando, portanto, a residência e a biodisponibilidade do fármaco. Por outro lado, os promotores de permeação, como sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético e o cloreto de benzalcônio, atuam no epitélio corneano, provocando modificações estruturais e hidratação, reduzindo sua lipofilicidade e favorecendo o influxo de água e fármacos mais hidrofílicos.

Em estudo de Nagasubramanian *et al.* (1983), foi proposta formulação por via ocular contendo acetazolamida a 3,8% m/v, em pH alcalino, com uso de cloreto de benzalcônio como promotor de permeação e hidroximetilpropilcelulose como viscosante. Em estudo duplo-cego randomizado com pacientes glaucomatosos, a formulação foi capaz de reduzir a pressão intraocular em 4 mmHg ou 17%, sem efeitos adversos, por seis horas, em 25 pacientes com hipertensão ocular não-tratada. No entanto, os autores declararam não ser possível excluir qualquer efeito adicional na redução da pressão intraocular possivelmente provocado pela administração prévia, por via oral, do fármaco, que pode ser quantificado no plasma dos pacientes durante o estudo.

Tous e Abd-El Nasser (1992) posteriormente propuseram o uso de polímeros hidrossolúveis, viscosantes e promotores de permeação para favorecer o fluxo transcorneal e aumentar a

absorção corneal do fármaco. Sua hipótese foi avaliada com o desenvolvimento de colírios, pomadas e géis oftálmicos, a partir de carboximetilcelulose sódica, contendo acetazolamida previamente cristalizada por surfactante não-iônico, com concentrações entre 5-7% m/v, em diferentes composições. Todas as formulações foram ineficazes em reduzir a pressão intraocular, excetuando-se os géis de maiores proporções do fármaco. Estes, contudo, demonstraram resultados variáveis, controversos e inconclusivos, pois, embora possivelmente efetivos para coelhos e humanos com glaucoma de ângulo aberto (nestes casos foi observada uma diminuição da pressão intraocular por 8 horas), provaram-se ineficientes para pacientes com glaucoma de ângulo fechado.

Depois de uma abrangente revisão das propostas e resultados anteriores, Kaur, Singh e Kanwar (2000) formularam suspensões *in situ*, em concentrações de 5-10% m/v, usando os viscosantes hidroxipropilmetilcelulose, alginato de sódio e álcool polivinílico, os promotores de permeação EDTA dissódico e cloreto de benzalcônio e o surfactante polissorbato 80. Houve diminuição na pressão intraocular para todas as formulações, mas apenas para metade a redução foi considerada significativa, superior a 4 mmHg. Para os autores, para serem eficazes, formulações oculares contendo acetazolamida devem utilizar, simultaneamente, concentrações elevadas do fármaco, promotores de permeação, viscosantes e pH inferior a 5. Posteriormente, Chen *et al.* (2004) desenvolveram formulações contendo metilcelulose, cloreto de benzalcônio, álcool n-bufílico, dimetilsulfóxido e 1-dodecilazaciclo-heptan-2-ona. Somente o último foi eficaz na melhoria da permeação corneana do fármaco em coelhos normotensos, com aumentos variáveis entre 5 e 40%, enquanto os outros não demonstraram nenhum efeito significativo.

Pelo exposto, observa-se que os resultados encontrados foram bastante controversos, com relatos, na maioria das vezes, de redução insuficiente da pressão intraocular. Ademais, deve-se considerar que o uso de muitos destes promotores de absorção é limitado por sua toxicidade, principalmente de cloreto de benzalcônio e dimetilsulfóxido (OKAHARA *et al.*, 2013; SINGLA *et al.*, 2002). Para os viscosantes e gelificantes, ressalta-se ainda, como desvantagens, inexactidão na administração de doses múltiplas para medicamentos oftálmicos e possibilidade de turvação da visão (SHESHALA *et al.*, 2015).

3.6.3 Ciclodextrinas

Ciclodextrinas são polissacarídeos cíclicos, compostos por 6-8 unidades de glicopirranose, com superfície hidrofílica e cavidade central hidrofóbica. Por sua estrutura química, possuem enorme potencial para encapsulação de fármacos pouco hidrossolúveis, permitindo aumentar sua solubilidade em fase aquosa, sem comprometimento da lipofilicidade (JUG, 2020; LOFTSSON *et al.*, 2005). Essa estratégia tem sido a preferida para administração ocular de acetazolamida, desde que fora utilizada ineditamente por Loftsson *et al.*, no ano de 1994. Nestes trabalhos, os autores propuseram co-complexos formados por ciclodextrinas e hidroxipropilmetilcelulose ou polivinilpirrolidona para produzir suspensões oftálmicas contendo acetazolamida, sozinha ou combinada com etoxzolamida e timolol, e observaram uma redução notável na pressão intraocular em coelhos.

Em virtude do potencial demonstrado pela formulação, Loftsson *et al.* (1996) avaliaram o efeito hipotensor desta vez em estudo com humanos, administrando-se suspensão oftálmica contendo 1% m/v do fármaco, 3 vezes ao dia, por 28 dias. Os resultados na redução da pressão intraocular observados nos estudos pré-clínicos foram reproduzidos no ensaio clínico, mas a duração do efeito foi mais curta que o desejável. Ademais, os resultados tanto nos animais quanto nos humanos foram consideravelmente inferiores aos encontrados para medicamentos oftálmicos comercialmente disponíveis, contendo dorzolamida e timolol. Deve-se considerar que, quando se usa ciclodextrinas como carreador, apenas a fração livre do fármaco é capaz de permear pela córnea, de modo que a maior parte da dose administrada permanece retida no seu interior, indisponível, reduzindo marcadamente sua eficiência e restringindo seu uso na rotina clínica (JUG, 2020).

O uso de ciclodextrinas foi avaliado posteriormente por Kaur *et al.* (2004), em combinações com hidroxipropilmetilcelulose, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona e carbômeros, em suspensões oftálmicas. Palma *et al.* (2009) e mais recentemente por Calles *et al.* (2018) também usaram este carreador nos seus trabalhos, em complexos multicomponentes com trietanolamina, o último incorporado em filmes de hialuronano. O uso de trietanolamina na formulação é justificável justamente porque propicia maior porção de fármaco livre, aumentando a absorção e, por isso, a eficiência. Todos os estudos indicaram aumento significativo na solubilidade e permeação corneana do fármaco e suficiente mucoadesividade, mas somente no estudo de Palma *et al.* (2009) foi avaliado o efeito hipotensor da formulação.

Nele, o complexo ternário foi capaz de reduzir a pressão intraocular de coelhos em aproximadamente 30%, mantida por 4 horas após a instilação, sem irritação, mas a avaliação da formulação carece de estudos em humanos.

3.6.4 Lipossomas, niossomas e transfersomas

Os lipossomas são pequenas vesículas, em escala nanométrica, formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas, orientadas concentricamente ao redor de um compartimento aquoso. Em geral, são produzidos a partir de fosfatidilcolina e colesterol, mas podem diferir entre si em características físico-químicas como dimensões, composição, estrutura e carga elétrica superficial (LAI *et al.*, 2019; MISHRA *et al.*, 2011). Extremamente versáteis, são carreadores muito úteis para fármacos hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos, demonstrando enorme penetrabilidade e menor toxicidade, decorrentes de sua estrutura, composição e possível direcionamento sítio-específico (AGARWAL *et al.*, 2016; BHATTACHARJEE *et al.*, 2019). Por isso, muitos medicamentos nesta forma farmacêutica encontram-se comercialmente disponíveis ou em fases avançadas de ensaios clínicos, com foco principalmente em neoplasias. Desde sua descoberta, sempre houve enorme interesse em lipossomas na pesquisa por medicamentos de uso oftálmico (ARIAS, 2013; LIU, CHEN, ZHANG, 2022; YADAV *et al.*, 2017).

El-Gazayerly e Hikal (1997) propuseram lipossomas de fosfatidilcolina e colesterol, produzidos por evaporação em fase reversa, com ou sem estearilamina e dicetilfosfato, que foram eficazes na inibição *in vitro* da anidrase carbônica e na redução da pressão intraocular *in vivo*, em coelhos, com liberação controlada do fármaco. Entretanto, relataram eficiência de encapsulação muito baixa. Dez anos depois, Hathout *et al.* (2007) propuseram formulação similar, com pequenas modificações, comparando dois métodos de produção, evaporação por fase reversa e multilamelar. Foi obtida maior eficiência de encapsulação, entre 70-89%, especialmente pelo método multilamelar. Além disso, os autores observaram maior redução na pressão intraocular e estabilidade por 3 meses, sem sinais de irritação. Estudos posteriores demonstraram que, para uso oftálmico, lipossomas carregados positivamente propiciavam perfil de liberação sustentado e duradouro, por se ligarem aos poliânions e mucoglicoproteínas, como a mucina, presentes na córnea e subconjuntiva.

Outros estudos propuseram niossomas, carreadores estrutural e quimicamente inspirados nos lipossomas, compostos por vesículas ainda menores, entre 10-100 nm de diâmetro, mas produzidas a partir de surfactantes não-iônicos. No geral, niossomas conservam os benefícios obtidos com os lipossomas como carreadores, mas possuem vantagens consideráveis, como maior estabilidade e pureza dos insumos, menor custos de produção e menor absorção sistêmica do fármaco encapsulado (BHARDWAJ *et al.*, 2020).

Pioneiros, Agarwal, Garg e Kaur (2004) avaliaram diferentes formulações e modos de preparo de niossomas de colesterol e monoestearato de sorbitano contendo acetazolamida, adicionadas ou não de estearilamina ou dicetilfosfato e revestidas ou não com carbômero. No trabalho, constatou-se que o método de evaporação em fase reversa produzia niossomas com maior eficiência de encapsulação que os métodos por hidratação em filme fino e por injeção de éter. Reportaram maiores coeficientes de permeação para formulações neutras do que para formulações carregadas e que, no geral, a adição de revestimento bioadesivo contribuiu para aumento no tempo de residência e menor toxicidade corneana. Depois de otimizada, a formulação demonstrou eficácia comparável ao fármaco dorzolamida comercial na redução da pressão intraocular em coelhos, mas duração do efeito duas vezes superior.

Entretanto, os autores encontraram pequena eficiência de encapsulação, menor que 50%, problema que foi superado posteriormente por Guinedi *et al.* (2005) e El-Menshawe (2012), com niossomas multilamelares de monoestearato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano e colesterol, em que a eficiência de incorporação foi superior a 75% e efeito mais prolongado na diminuição da pressão intraocular. Todos os autores, entretanto, mencionaram irritação branda ou moderada como único efeito adverso, mas destacaram que o quadro era reversível em poucos dias ou semanas. No último ano, Abdelmonem *et al.* (2021) estudaram diferentes formulações niossomais, produzidas pela mistura de colesterol mais surfactante não-iônico, entre diversos ésteres de sorbitano, produzidos por evaporação em fase reversa, para uma associação entre acetazolamida e carvedilol. Depois de produzidos, os niossomas eram ainda incorporados em géis de carbômero ou hidroxipropilmetilcelulose a 2-4%. Em comparação com solução dos fármacos, observou-se maior permeação corneana, maior biodisponibilidade ocular e liberação controlada, com maior duração de efeito e eficácia no tratamento de glaucoma em coelhos albinos.

Transfersomas podem ser definidos como nanolipossomas ultraflexíveis e deformáveis, compostos por fosfolipídios e tensoativos ou ativadores de borda, responsáveis por conferir

propriedades plásticas aos carreadores, como ésteres de sorbitano, polissorbatos e hidroxiestearato de macroglicerol. Demonstram excelente poder de encapsulação e extraordinária capacidade de penetração em poros muito pequenos no organismo (OPATHA, TITAPIWATANAKUN, CHATOPRAPAT, 2020). Mazyed e Abdelaziz (2020) desenvolveram transgelosomas, transfersomas adicionados de agentes gelificantes, que formam géis *in situ*, com composição otimizada por planejamento experimental. Os resultados encontrados foram muito promissores, com concentração máxima e área sob a curva do fármaco, em humor aquoso, 14 e 80 vezes maior, respectivamente, residência 4 vezes maior na córnea, maior permeação, maior biodisponibilidade e maior redução da pressão intraocular por 14 horas, sem causar irritação. Todavia, o início de efeito foi demorado, depois de 3 horas, insuficiente ou indesejável para a maioria dos pacientes.

Lipossomas, niossomas e transfersomas provaram-se alternativas de inestimável potencial para erradicar problemas médicos não-resolvidos em oftalmologia, com eficácia e segurança indiscutíveis nos estudos pré-clínicos. Reitera-se, no entanto, que estudos clínicos em humanos, preferencialmente portadores de glaucoma, devem ser realizados para confirmação dos resultados observados em animais (AGARWAL *et al.*, 2016; SERCOMBE *et al.*, 2015). Pondera-se, ainda, que estas formulações são difíceis de serem esterilizadas e possuem elevado custo de produção, estabilidade e prazo de validade curtos, eficiência de encapsulação variável e rápido *clearance*, sendo removidas por fagócitos, fatores limitantes para seu uso na prática clínica (YADAV *et al.*, 2017).

3.6.5 Formulações microestruturadas e nanoestruturadas

Formulações microestruturadas e nanoestruturadas, como micropartículas e nanopartículas, são sistemas de liberação de fármacos, produzidos a partir de lipídios ou polímeros de naturezas distintas, por diferentes métodos de produção, nos quais fármacos hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos podem encontrar-se incorporados, encapsulados, dissolvidos ou adsorvidos (ZIMMER, KREUTER, 1995). Estes potentes carreadores, que podem ser administrados por muitas vias de administração, ganharam notoriedade no desenvolvimento farmacêutico por aumentar a permeabilidade de fármacos, exibir perfis de liberação mais controlada e acumular-se em tecidos específicos, garantindo maior biodisponibilidade, menor

frequência de administração e menor ocorrência de efeitos adversos (HALASZ *et al.*, 2019; MANDRACCHIA, TRIPODO, 2020). Enquanto as micropartículas possuem dimensões micrométricas, com diâmetros na faixa de 0,001 a 1000 μm , as nanopartículas estão na escala nanométrica, com diâmetros entre 1 e 1000 nm, diferença que possui repercussão em fatores fisiológicos, anatômicos e físico-químicos e, por isso, na aplicabilidade de cada uma (KOHANE, 2006; JEEVANANDAM *et al.*, 2018).

O uso de carreadores microestruturados ocorreu pela primeira vez para acetazolamida no estudo de Haznedar e Dortunç (2004), que desenvolveu microesferas de Eudragit[®] RL e Eudragit[®] RS, por evaporação do solvente. Estes mesmos polímeros foram utilizados por Duarte *et al.* (2007) na produção de compósito de micropartículas, pelo método anti-solvente supercrítico semi-contínuo. Em ambos, concluiu-se que era possível controlar a difusão do fármaco nas microesferas pelo ajuste na razão entre os polímeros, obtendo-se perfil de liberação ideal para administração intraocular. Todavia, nenhuma formulação foi avaliada *in vivo*, não sendo possível determinar se o perfil resultaria na diminuição suficiente e duradoura da pressão intraocular.

Eudragit[®] RL e RS foram utilizados por Verma *et al.* (2013) e por Singh, Chhabra, Pathak (2014) para produção de nanopartículas poliméricas, em suspensão, contendo acetazolamida, pelo método de nanoprecipitação. No estudo de 2014, foi avaliado ainda o ácido polilático-co-glicólico como matriz polimérica, sendo as nanopartículas posteriormente incorporadas em géis *in situ* de carbômero 934P, induzidos por pH. Essa estratégia aumentou significativamente o período de residência nos olhos, como discutido anteriormente. Em ambos estudos, foram produzidas nanopartículas esféricas, de superfície uniforme, sem interações marcantes entre fármaco-excipiente, com elevada eficiência de encapsulação e importante estabilidade. Desta vez, entretanto, as formulações propostas foram avaliadas *in vivo*, em coelhos, observando-se perfil de liberação sustentado, suficiente para manter concentrações terapêuticas e para reduzir eficazmente a pressão intraocular por 8 horas. Em seguida, Quinteros *et al.* (2016), desenvolveram nanocápsulas de Eudragit[®] RS100, preparados pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, com grande poder de encapsulação, estabilidade físico-química, perfil de liberação compatível com sistemas reservatório, maior permeação corneana em virtude das propriedades mucoadesivas e maior eficácia e duração de efeito na redução da pressão intraocular em coelhos.

Tamilvanan e Kumar (2011) desenvolveram nanoemulsões diversas, neutras ou carregadas positiva ou negativamente, utilizando óleos de amendoim, sésamo, rícino, ácido oléico, quitosana, lecitina, alfa-tocoferol, glicerol e poloxamer como emulsificantes. Estas apresentaram estabilidade durante esterilização e ciclos de congelamento-descongelamento, mas perfil de liberação errático e difícil de ser caracterizado. Com poucas exceções, a permeação transcorneal foi insuficiente, inviabilizando sua avaliação *in vivo* e seu emprego para portadores de glaucoma.

Em estudo do mesmo grupo de pesquisa, embasando-se no estudo anterior, Morsi *et al.* (2014) propuseram modificações sutis na composição e procedimento para produção de nanoemulsões, inserindo surfactantes e co-surfactantes, como Transcutol[®] P, não avaliados anteriormente. Ensaio *in vitro* e *in vivo*, com coelhos como modelo animal, indicaram que nanoemulsões produzidas em conteúdos maiores de fase aquosa apresentaram propriedades físico-químicas, estabilidade e perfil de liberação adequados, sextuplicaram o coeficiente de permeabilidade e aumentaram, portanto, a biodisponibilidade do fármaco, reduzindo de forma imediata e prolongada a pressão intraocular. Deste modo, as formulações provaram-se úteis como possíveis medicamentos contra o glaucoma, por serem suficientemente seguras e comparativamente mais eficientes que acetazolamida por via oral ou que brinzolamida, com menos instilações diárias e efeitos adversos. Estas nanopartículas foram posteriormente incorporadas por Morsi *et al.* (2017) em diferentes géis, usando-se goma gelana, goma xantana, hidroxipropilmetilcelulose e carbômero 934P como gelificantes. Estes géis, ativados *in situ* por eletrólitos, demonstraram mucoadesividade considerável, o que contribuiu para um efeito ainda maior e duradouro que as propostas anteriores do grupo na redução da pressão intraocular durante ensaio pré-clínico *in vivo*.

Tártara *et al.* (2012) avaliaram o efeito hipotensor de nanoestruturas ou coagéis de ácido 6-*o*-lauril-*L*-ascórbico, incorporados de 0,4% m/v do fármaco, em coelhos. Diferentemente do trabalho anterior, as nanoestruturas permearam mais facilmente pela córnea. Por isso, notou-se maior biodisponibilidade do fármaco nos segmentos anterior e posterior, reduzindo notoriamente a pressão intraocular, em intensidade superior aos obtidos para uma formulação comercial contendo brinzolamida. Entretanto, os autores ressaltam que as formulações propostas causaram irritação leve ou moderada nos animais, tempo-dependente, indicando que estudos mais aprofundados devem ser realizados para seu aperfeiçoamento.

Sistemas de liberação nanoestruturados menos convencionais foram desenvolvidos nos últimos anos. Natu, Sousa e Gil (2011), por exemplo, utilizaram *electrospinning* para obter nanofibras contendo acetazolamida e timolol, pela copolimerização de policaprolactona e Lutrol[®] F127. Os pesquisadores conseguiram excelentes resultados para incorporação dos fármacos nas nanofibras, mas o perfil de liberação observado foi considerado inapropriado, pois a maior parte do fármaco presente foi liberada de uma única vez, em *burst*, enquanto o restante foi liberado em pequenas quantidades, mas em curto intervalo. Estes dispositivos não foram, portanto, avaliados *in vitro* ou *in vivo*, uma vez que este perfil pode aumentar os riscos de efeitos adversos e pode ser ineficaz para tratamento de doenças crônicas, para as quais se deseja duração de efeito prolongada.

Dendrímeros nanoestruturados de polipropileno-imina foram propostos por Mishra e Jain (2014). Estes carreadores promoveram liberação sustentada de mais de 80% da dose, por 24 horas, com aumento do tempo de residência e diminuição significativa na pressão intraocular nos coelhos. Todavia, reportaram reduzida eficiência de encapsulação e irritação fraca no segmento anterior. Teba, Khalil e Sorogy (2021), por sua vez, desenvolveram cubossomas, nanocarreadores modernos formados por nanopartículas líquido-cristalinas que, dispersos em fase aquosa, organizam-se em fases cúbicas bicontínuas, que possuem enorme capacidade de incorporar fármacos. Os cubossomas foram obtidos por emulsificação, com monooleato de glicerila, poloxamer 407, propilenoglicol e 2-(2-etoxietoxi)etanol. Os estudos indicaram aumento de quatro vezes na permeabilidade da acetazolamida, que contribuiu para maior persistência e biodisponibilidade das formulações. Entretanto, embora não-irritantes e eficazes na redução da pressão intraocular em coelhos, o perfil de liberação não foi sustentado, sendo que o efeito perdurou por pouco mais de 8 horas apenas.

Na maioria dos estudos, o benefício das formulações propostas no aumento da permeação e biodisponibilidade e na diminuição da pressão intraocular é evidente e indiscutível. Todavia, muitas considerações foram mencionadas nos estudos, especialmente no que se refere aos efeitos tóxicos causados pelos sistemas de liberação e pelos insumos, principalmente os crônicos e desconhecidos, dificuldade de eliminação pelo organismo e risco de bioacumulação, imprevisibilidade, perfil de liberação errático e custo considerável (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2013; MANDRACCHIA, TRIPODO, 2020).

3.6.6 Outras formulações de uso tópico

Um dos primeiros estudos para administração ocular de acetazolamida foi o estudo proposto por Friedman *et al.* (1985), com lentes de contato disponíveis comercialmente denominadas Sauflon[®] PW, uma estratégia que fora muito utilizada para outros fármacos de importância oftalmológica. As lentes foram impregnadas por imersão com o fármaco e posteriormente inseridas nos coelhos. Ensaios *in vitro* confirmaram aumento marcante na permeação e absorção corneana do fármaco, maior que para outros inibidores da anidrase carbônica, enquanto estudos *in vivo* apontaram para diminuição de cerca 6,3 mmHg na pressão intraocular, clinicamente relevante, mas que foi mantida por menos de 8 horas, requerendo administrações muito frequentes, inviável para emprego na rotina em virtude dos custos elevados para aquisição.

De funcionamento similar, um filme polimérico mucoadesivo foi proposto por Tártara *et al.* (2014). Produzido a partir de carbômeros ou carboximetilcelulose adicionados de poloxamer 407, os filmes apresentaram fácil administração e perfil de liberação controlado e muito mais duradouro, principalmente quando revestidos por Eudragit[®] RSPO, polímero mais apolar que retardava a dissolução do fármaco pelos fluidos oculares. Todavia, o controle da liberação ainda foi discreto e insuficiente para ser aplicável em problemas crônicos, como glaucoma. Os filmes provaram-se não-irritantes e reduziram a pressão intraocular em coelhos, mas em menor intensidade, de modo que sua relevância clínica foi considerada questionável.

Embora a visão geral demonstre que os sistemas de liberação desenvolvidos se configurem como estratégia interessante para liberação intraocular de fármacos, muitas limitações do uso oftálmico dos carreadores foram discutida para justificar porque formulações para uso tópico contendo acetazolamida não estão disponíveis, no mercado.

Primeiramente, nos estudos disponíveis, a efetividade e segurança dos carreadores foi avaliada apenas em ensaios pré-clínicos, não sendo possível prever se os resultados obtidos seriam observados em humanos. Também foram realizados em coelhos normotensos, excetuando-se o estudo de Manchanda e Sahoo (2017), em que a eficácia de nanopartículas mucoadesivas de quitosana e tripolifosfato de sódio foi comprovada em coelhos com hipertensão ocular induzida. Por isso, não se pode afirmar, com convicção, que os produtos desenvolvidos manteriam, pelo menos parcialmente, sua eficiência para reduzir a pressão

intraocular em pacientes glaucomatosos ou em quadro de hipertensão ocular. Em muitos estudos observou-se ainda que as formulações desenvolvidas eram igualmente ou menos eficazes que medicamentos registrados para mesma finalidade e via de administração, não agregando benefício nenhum para os usuários.

Uma ressalva ainda mais importante refere-se aos possíveis efeitos tóxicos que poderiam ser apresentados pelas formulações. Muitos estudos sequer procederam uma avaliação biológica de suas formulações ou fizeram-na muito superficialmente, com ensaios simples de irritação ocular, sem estudos histológicos ou avaliação funcional. Foi realizada apenas avaliação de toxicidade aguda, de curto prazo, em poucas horas ou dias, ignorando-se eventuais efeitos crônicos ou tardios. Esta é preocupação comum e particularmente relevante para sistemas micro e nanoestruturados, incluindo lipossomas, e outras formulações inovadoras, sendo cada vez mais discutida, como precaução, por profissionais e pesquisadores em saúde (SERCOMBE *et al.*, 2015).

Ademais, os sistemas propostos demonstraram, na maioria dos casos, perfil de liberação irregular e rápido, muito frequentemente com um *burst* inicial e liberação sustentada por curto período, com duração de efeito inferior a 12 horas. Portanto, o uso clínico para enfermidades crônicas é inviável, por requererem administração frequente, o que dificulta a adesão dos pacientes, um dos maiores desafios da farmacoterapia anti-glaucoma. Além disso, o custo do tratamento-dia e do tratamento-total são geralmente elevados, uma vez que a maioria dos produtos desenvolvidos possui produção e insumos farmacêuticos caros. Existe, finalmente, para a maior parte das formulações obtidas, grande dificuldade no *scaling up*, isto é, na transposição da tecnologia de produção de uma escala menor, de pesquisa, para um cenário de produção em larga escala, imprescindível para despertar interesse das indústrias farmacêuticas (KAUR, SINGH, KANWAR, 2002; SINGLA *et al.*, 2002).

3.7 Implantes intraoculares para administração intravítrea

Como evidenciado nos últimos parágrafos é grande o desafio do desenvolvimento de formulações para administração intraocular de acetazolamida. Em um cenário de constante insucesso, os implantes intraoculares emergiram como uma alternativa farmacotécnica para aumentar a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oftálmica, para tratamento

de doenças oculares, do segmento posterior, como retinopatia diabética ou degeneração macular, ou segmento anterior, como glaucoma. Estes implantes intraoculares são dispositivos de liberação modificada, cirurgicamente inseridos ou implantados no interior do bulbo ocular, no espaço intravítreo, pela *pars plana*, na esclera, na subconjuntiva ou na região subtenoniana (KIMURA, OGURA, 2001; THRIMAWITHANA et al., 2011).

Por serem um dispositivo implantável de liberação modificada, contribuem para a manutenção de níveis terapêuticos do fármaco por tempo prolongado, que podem ultrapassar meses ou anos, reduzindo a frequência de administração e aumentando a adesão ao tratamento, principais desafios no tratamento farmacoterapêutico do glaucoma. Ademais, a administração de fármacos diretamente no interior do globo ocular pode minimizar a toxicidade sistêmica, um importante fator limitante para o fármaco, e fornecer proteção a fármacos instáveis nas condições fisiológicas. Destaca-se ainda que, uma vez que o olho não possui células do sistema imune, é um órgão privilegiado para inserção de implantes. Percebe-se, portanto, um grande número de vantagens, em termos de eficácia e segurança, para estes sistemas de liberação (ALHAFALI, 2017; AULTON, 2005; ELJARRAT-BINSTOCK, PE'ER, DOMB, 2010; THRIMAWITHANA et al., 2011).

Os implantes podem ser subdivididos em matriciais e reservatórios. Os sistemas matriciais se caracterizam por dispersão homogênea ou por adsorção superficial do fármaco na matriz polimérica, nos quais o fármaco pode ser liberado por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por associação entre os dois mecanismos. Nos sistemas de reservatório, o fármaco encontra-se em uma cavidade central, envolvida por uma membrana polimérica responsável pelo controle de sua liberação (KIMURA, OGURA, 2001). Podem ser obtidos por diferentes métodos, como moldagem a altas temperaturas, extrusão, evaporação de solvente ou por eletrofição (FIGUEIREDO, 2013).

Estes dispositivos podem ser produzidos nos formatos de bastões, discos ou micropartículas (CHRISTOFORIDIS et al., 2012) e devem ser formulados com polímeros obrigatoriamente biocompatíveis. No desenvolvimento, podem ser utilizados polímeros biodegradáveis, como ácido polilático-co-glicólico, ou não-biodegradáveis, como silicone, álcool polivinílico e polietileno-co-acetato de vinila (ALHALAFI, 2017). Conforme afirmam Fialho et al. (2003), o emprego de polímeros biodegradáveis é vantajoso porque são inteiramente degradados e absorvidos pelo organismo, sem necessidade de nova cirurgia para remoção após a liberação

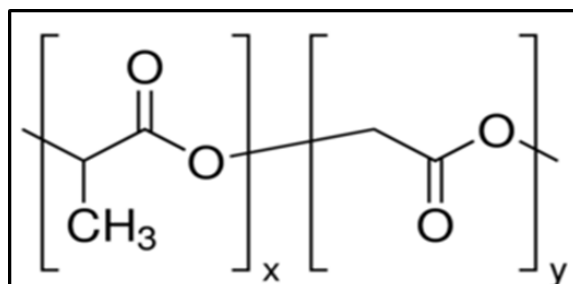
do fármaco. Todavia, curiosamente, um maior número de implantes intraoculares foram produzidos a partir de polímeros não-biodegradáveis (PANOS, 2020).

O desenvolvimento de dispositivos implantáveis intravítreos iniciou-se nas últimas duas décadas do século XX e foi impulsionado pela necessidade da administração de fármacos por via intravítrea para tratamento eficaz de infecções bacterianas e por citomegalovírus, em um contexto em que infecções pelo vírus da imunodeficiência humana se expandia (CAO *et al.*, 2020). Estes estudos pioneiros levaram ao desenvolvimento e aprovação do primeiro implante intravítreo pela *Food and Drug Administration* denominado Vitrasert[®], produzido pela empresa pela Bausch & Lomb, em 1996. Esse implante continha ganciclovir, fármaco indicado para retinite decorrente de infecção por citomegalovírus. Este dispositivo foi muito bem-sucedido, reduzindo drasticamente a incidência de retinite, estimulando pesquisas para o desenvolvimento de outros implantes intravítreos, como o Retisert[®], em 2005, pela mesma empresa. Este dispositivo contendo fluocinolona acetonida, foi originalmente produzido para tratamento da retinite, mas provou-se mais efetivo no tratamento de edema macular diabético crônico, uma das consequências mais graves do diabetes, finalidade para o qual se destina atualmente (PANOS, 2020).

Outros sistemas similares, contendo fluocinolona acetonida, foram desenvolvidos posteriormente, como por exemplo o Iluvien[®], produzido pela Alimera Sciences e o Yutiq[®], desenvolvido pela EyePoint Pharmaceuticals. Posteriormente, dispositivos contendo triancinolona acetonida, para a mesma indicação, foram aprovados por órgãos regulatórios, como o I-Vation[®] (SurModics) e o Verisome[®] (Ramscor). Todos estes medicamentos, incluindo os precursores Vitrasert[®] e Retisert[®], são sistemas não-biodegradáveis, capazes de liberar o fármaco em doses constantes, de forma controlada, por período entre 2,5 e 3 anos (CAO *et al.*, 2020; PANOS, 2020).

O uso de polímeros biodegradáveis para o desenvolvimento de dispositivos intravítreos foi revolucionário. Estes podem possuir origem natural ou sintética, que apresentam como maior benefício a capacidade de manter a liberação de fármacos por maior período (FIALHO *et al.*, 2007). Dentre os principais polímeros biodegradáveis sintéticos utilizados para obtenção de implantes, pode-se citar o ácido polilático-co-glicólico (PLGA), aprovado pelo FDA, cuja estrutura química é apresentada na **Figura 4**.

Figura 4 – Estrutura química do ácido polilático-co-glicólico (PLGA).



O ácido polilático-co-glicólico, alternativa mais viável e frequentemente usada, pode ser obtido por reação de abertura de anel em dímeros cíclicos de ácido lático e de ácido glicólico (FIALHO *et al.*, 2003). Em humanos, é degradado pela clivagem aleatória da matriz polimérica, por hidrólise das ligações éster, que produz oligômeros e monômeros (JAIN, 2000; MAKADIA, SIEGEL, 2011). No início, observa-se quebra da cadeia polimérica, sem perda de massa, com consequente redução do massa molar acompanhada por perda notável de massa e degradação de oligômeros em monômeros solúveis, eliminados do organismo por reações do ciclo de Krebs, ao serem degradados a dióxido de carbono e água, ou eliminados na urina (FIALHO *et al.*, 2003; JAIN, 2000; RAJEEV, 2000; TAMBOLI, MISHRA, MITRA, 2012). A velocidade de degradação do polímero dependerá do seu grau de hidrofobicidade, que se relaciona com proporção entre os ácidos lático e glicólico, durante seu processamento: quanto maior a proporção de ácido lático, menor a velocidade de degradação, porque ocorre menor absorção de água pela matriz (FIALHO *et al.*, 2003; MAKADIA, SIEGEL, 2011).

O primeiro implante intravítreo biodegradável desenvolvido e aprovado pelo FDA foi o Ozurdex[®], produzido pela Allergan (KUNO, FUJII, 2010; LAMBIASE, ABDOLRAHIMZADEH, RECUPERO, 2014). Trata-se de dispositivo em forma de bastonete, de 6,5 x 0,45 mm, de ácido polilático-co-glicólico, contendo 0,7 mg de dexametasona por dose, recomendado para edema macular e uveíte posterior não-infecciosa. O medicamento foi comprovadamente eficaz por seis meses, mas embora a duração do efeito fosse menor que a observada para os dispositivos não-biodegradáveis, demonstrou-se 5-20 vezes mais efetivo e possui como maior diferencial não requerer procedimento cirúrgico para remoção. Em virtude de sua eficácia, o Ozurdex[®] foi o primeiro e único implante intravítreo aprovado pela ANVISA e comercialmente disponível no Brasil, desde 2014. Nos anos seguintes, outro implante intravítreo de ácido polilático-co-glicólico e dexametasona, foi

aprovado em Singapura e encontra-se em fase de estudo investigacional nos Estados Unidos, como anti-inflamatório pós-operatório de catarata, o Surodex[®], que, entretanto, era um pouco menor (1 x 0,4 mm) e durava apenas 7-10 dias.

Diversos outros sistemas encontram-se em fase de estudos clínicos avançados para aprovação e muitos outros foram estudados por grupos de pesquisa, com excelentes resultados, como os reportados por nosso grupo de pesquisa, para acetato de dexametasona (FIALHO *et al.*, 2005), tacrolimo (SOUZA *et al.*, 2014), ciclosporina (ALMEIDA *et al.*, 2015; SALIBA *et al.*, 2012), vancomicina associada com dexametasona (RESENDE *et al.*, 2016), clindamicina (FERNANDES-CUNHA *et al.*, 2017), lupeol (SOARES *et al.*, 2017), sirolimo (PAIVA *et al.*, 2019), ácido rosmarínico (VIEIRA *et al.*, 2020) e ácido corosólico (TOLEDO *et al.*, 2018), sem contar aqueles desenvolvidos por outros pesquisadores.

Estes implantes intravítreos emergiram como uma alternativa plausível para o tratamento de doenças dos segmentos anterior e posterior. Entretanto, até recentemente, não haviam dispositivos intravítreos para glaucoma disponíveis no mercado e mesmo na pesquisa científica. Todavia, em 2021, pela primeira vez foi reportado o desenvolvimento de implantes intravítreos para administração de acetazolamida. No trabalho de Moraes, Coimbra e Pina (2021), foram desenvolvidas fibras uniaxiais ou coaxiais biodegradáveis, com policaprolactona mais Lutrol[®] F127 ou Luwax[®] EVA 3, preparados por eletrofiação, posteriormente moldadas em formato de pequenos cilindros e revestidas por filmes poliméricos, por evaporação de solvente, para produção dos implantes intravítreos. Estes sistemas foram caracterizados e o perfil de liberação *in vitro*, em pH 7,4, foi estudado, mostrando liberação sustentada do fármaco, por apenas 18 dias. Não foram realizados, contudo, estudos *in vivo* e foi reportado que todos os métodos de esterilização avaliados impactaram negativamente na estrutura e performance dos seus sistemas, afetando em especial a cristalinidade da policaprolactona.

Conclui-se, portanto, que ainda existe um enorme horizonte a ser explorado no desenvolvimento de sistemas intravítreos de acetazolamida, que possuam eficácia, segurança, estabilidade e qualidade comprovadas, capazes de propiciar liberação sustentada do fármaco por semanas, meses ou anos. Para isso, estudos de pré-formulação e formulação devem ser realizados.

3.8 Estudos de pré-formulação, formulação e toxicidade *in vitro* e *in vivo*

Todo medicamento, antes de ser comercializado, deve ser aprovado por agências regulatórias. Tal processo de registro para medicamentos novos ou inovadores visa demonstrar, por meio de evidências científicas, que o medicamento é eficaz e seguro para a finalidade proposta e que foi produzido segundo procedimentos e condições estritamente controladas e validadas para assegurar sua qualidade (HOFF, CHEN, 2009). No Brasil, a ANVISA, autarquia do Ministério da Saúde, é responsável pelo registro de medicamentos em todo o território, conforme prevê a lei nº. 6.360/1976. A ANVISA atua em convergência com outras agências internacionais, como a *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA), tendo sido recentemente reeleita como membro do Comitê Gestor do Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH). Todo o processo e documentação requerida para registro de novos medicamentos no país encontra-se estabelecido conforme critérios da RDC nº. 136/2003 (BRASIL, 2017).

No geral, o caro e dispendioso desenvolvimento de novos medicamentos pode ser dividido nas etapas de descoberta de novos fármacos, quando aplicável, estudos pré-clínicos, estudos clínicos, petição do registro e pós-comercialização ou farmacovigilância (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2003). Uma das etapas mais importantes deste processo é a fase pré-clínica ou não-clínica. Nesta fase, avaliam-se não só as características físico-químicas e as propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas em curto e longo prazo do fármaco, como são realizados estudos de formulação e pré-formulação do produto, seguidos por sua fabricação, controle de qualidade e desenvolvimento de embalagem, rótulos e bula. Todos estes aspectos são requisitos estabelecidos por lei para aprovação de um novo medicamento no Brasil e, portanto, imprescindíveis durante o desenvolvimento farmacotécnico (BRASIL, 2017; SHAH *et al.*, 2014).

Estudos de pré-formulação e formulação são estudos em que se propõe uma forma farmacêutica e composição que seja eficaz, segura e estável para administração de fármacos que foram, extensiva e previamente estudados e considerados promissores do ponto de vista físico-químico e biológico (JONES, 2018). Portanto, estudos de pré-formulação e formulação visam aprofundar o entendimento do comportamento do fármaco e do produto para o desenvolvimento de medicamentos com mais eficácia, segurança e qualidade. Seu objetivo é

definir uma formulação farmacêutica final, primeiramente em pequena escala ou escala piloto, que posteriormente será escalonada para produção em larga escala pelas indústrias farmacêuticas (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2013).

No estudo de pré-formulação, propriedades físico-químicas dos fármacos e excipientes são estudadas, como solubilidade, coeficiente de partição, forma física, polimorfismo, velocidade de dissolução ou perfil de liberação e estabilidade. Embasados pelos estudos de pré-formulação e por informações como dose, forma farmacêutica e via de administração definidas para os ensaios clínicos, procede-se ao estudo de formulação, em que se desenvolve um medicamento primário, que será utilizado nas próximas fases dos ensaios clínicos, em humanos (SHAH *et al.*, 2014).

Uma formulação farmacêutica é composta não apenas pelos fármacos, mas por excipientes, também denominados adjuvantes farmacotécnicos. Os excipientes são adicionados com o intuito de se obter uma forma farmacêutica adequada, permitindo que possa ser administrada pela via de administração escolhida. Entretanto, podem eventualmente aumentar sua estabilidade, biodisponibilidade e aceitabilidade pelo consumidor. Embora farmacologicamente inertes, os excipientes contribuem notadamente para que um medicamento possua eficácia e segurança e, por isso, devem ser tratados com a mesma importância que se destina aos fármacos e avaliados nos estudos de pré-formulação (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2013). Muito mais do que garantir a aquisição e uso de insumos de qualidade, é necessário averiguar se os excipientes escolhidos para a formulação são compatíveis entre si, com os fármacos e com os possíveis materiais de embalagem. Esta avaliação é realizada durante os estudos de pré-formulação, em que se estuda a compatibilidade fármaco-excipiente, que pode ser afetada por propriedades do fármaco, excipiente, formulação ou processo produtivo e por fatores ambientais (CHADHA, BHANDARI, 2014).

Um estudo de compatibilidade fármaco-excipiente é crucial e indissociável do estudo de pré-formulação. Nestes estudos, foca-se em identificar incompatibilidades farmacêuticas, isto é, interações físicas e químicas observáveis entre fármacos e excipientes que interfiram na natureza química, estabilidade, solubilidade e absorção *in vivo* do fármaco, modificando o produto final nos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e terapêuticos (GUPTA, POUNIKAR, UMEKAR, 2019). Atualmente, a investigação é realizada por diferentes métodos analíticos, incluindo calorimetria diferencial exploratória, termogravimetria,

difração de raio X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de Raman e cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando-se misturas binárias de fármacos e excipientes, conforme preconizado pela ANVISA (CHADHA, BHANDARI, 2014).

De acordo com a Farmacopeia Americana, a estabilidade pode ser compreendida como a extensão na qual um produto retém, dentro de limites especificados e durante todo o seu período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características que possuía no momento da sua fabricação (UNITED STATES, 2021). Parte integrante dos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, o estudo de estabilidade visa avaliar se a qualidade do insumo farmacêutico ou medicamento pode ser alterada no decorrer do tempo, por influência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz e ainda por fatores inerentes ao fármaco e excipiente, forma farmacêutica e processo produtivo. A instabilidade pode levar à administração de doses subterapêuticas ou de produtos de degradação potencialmente tóxicos (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2013).

Requisito obrigatório para registro de medicamentos novos, similares ou genéricos no Brasil, como determinado pela RDC nº. 200/2017, da ANVISA, estes estudos de estabilidade são úteis para estabelecimento do prazo de validade dos medicamentos e são orientativos para escolha de materiais de embalagem apropriados. Podem ser divididos em estudos de estabilidade acelerada, estudos de estabilidade de longa duração e estudos de estabilidade de acompanhamento. Os estudos de estabilidade acelerada, com duração de apenas seis meses, determinam um prazo de validade provisório e condições de armazenamento e são utilizados no desenvolvimento farmacêutico e exigidos para registro. Estudos de estabilidade de longa duração, exigidos na documentação para registro, confirmam o prazo de validade e condições de armazenamento definidos anteriormente. Por sua vez, os estudos de acompanhamento são usados no controle de qualidade, para verificação de mudanças na formulação ou processo de produção que afetem adversamente a estabilidade do produto (BRASIL, 2019).

Um estudo de estabilidade deve ser conduzido segundo estabelecido na RDC nº. 318/2019 e guia Q1A (R2) do *International Conference on Harmonisation (ICH)*. Durante sua execução, deve ser realizado estudo de degradação forçada e o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade. Nos estudos de degradação forçada, conduzidos segundo a RDC nº. 53/2015, o insumo farmacêutico ativo, os excipientes, as misturas binárias e o produto são submetidos a condições extremas de estresse externos e internos, como calor, umidade, pH, oxidação, luz

e íons metálicos. Eventuais produtos de degradação formados serão, posteriormente, identificados e quantificados, para que se monitore problemas de qualidade e estabilidade do fármaco e medicamento durante seu ciclo de vida. Geralmente, o perfil de degradação obtido nestes estudos, denominado perfil de degradação potencial, é maior e pode ser diferente qualitativa e quantitativamente que o obtido nos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, denominado perfil de degradação real (BAERTSCHI *et al.*, 2011).

Nos estudos de estabilidade, deve-se avaliar o decaimento na quantidade do fármaco, identificar e quantificar os produtos de degradação formados, empregando-se um método indicativo de estabilidade, que permite o acompanhamento dos resultados provenientes destes estudos. Um método indicativo de estabilidade pode ser entendido como um procedimento analítico quantitativo validado que pode detectar as alterações com o tempo das propriedades relevantes do insumo farmacêutico e do medicamento. O método indicativo de estabilidade deve ser capaz de mensurar com seletividade, precisão e exatidão o fármaco e/ou produtos de degradação, sem a interferência de produtos de degradação, impurezas do processo produtivo, excipientes ou outras potenciais impurezas (DONG *et al.*, 2020).

Durante pesquisa bibliográfica, foram encontrados métodos indicativos de estabilidade para quantificação de acetazolamida e substâncias relacionadas, como impurezas e produtos de degradação, em insumo farmacêutico e medicamentos. Descrições minuciosas e resultados mais importantes destes métodos foram sumarizados e são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Métodos indicativos de estabilidade para determinação de teor e substâncias relacionadas de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo e em formas farmacêuticas.

Ensaio e amostra	Condições cromatográficas	Deteção	LQ (µg/ml)	Estabilidade	Referência
Teor em comprimidos, cápsulas de liberação sustentada e pó para injeção	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: fosfato de potássio 0,02 M-metanol-acetonitrila (86:12:2) – eluição isocrática	UV 265 nm	–	Degradação em NaOH 0,1 M, entre 46,7-60,5%. Estável nas outras condições de estresse avaliadas	GUPTA, PARASRAMPURIA, 2008
Teor e substâncias relacionadas em IFA e comprimidos	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: fosfato de potássio 0,02 M pH 3,0-acetonitrila (95:5) [A] + fosfato de potássio 0,02 M pH 3-acetonitrila (95:5) [B] – eluição em gradiente	UV 254 nm	0,04	Estável em todas as condições de estresse avaliadas. Degradação maior observada em HCl 1 M e NaOH 1 M por 24 horas, mas < 10,0%	SRINIVASU <i>et al.</i> , 2009
Teor em suspensão em SyrSpend® SF pH 4,0	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetato de sódio 4,1 g/L-metanol-acetonitrila (95:2:3) pH 4 – eluição isocrática	UV 254 nm	30,63	Estável em todas as condições de estresse avaliadas	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2014
Teor em suspensão extemporânea de comprimidos, em xarope	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetato de sódio 0,05 M-metanol-acetonitrila (475:30:20) – eluição isocrática	UV 254 nm	68,40	Não houve estudo de degradação forçada, mas recuperação de 112,3% foi reportada no estudo	SILA-ON <i>et al.</i> , 2015
Substâncias relacionadas em IFA, comprimidos e pó para injeção	FE: propoxibenzeno (150 x 4,6 mm, 4 µm) FM: fosfato de potássio 6,8 g/L-acetonitrila (90:10) – eluição isocrática	UV 265 nm	0,004	–	EUROPEAN, 2019
Substâncias relacionadas em comprimidos	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: fosfato de potássio-acetonitrila (90:10)	UV 254 nm	0,06	Degradação maior observada em NaOH 1 M, mas < 5%	SURESH <i>et al.</i> , 2020
Teor em suspensão oral	FE: C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) FM: ácido heptafluorobutírico 0,15% [A] e ácido heptafluorobutírico 0,15% em acetonitrila [B] – eluição em gradiente	UV 254 nm	25	Não houve estudo de degradação forçada, mas recuperações de 73,0-103,0% foram reportadas no estudo	GILLIUM <i>et al.</i> , 2020
Substâncias relacionadas em IFA, comprimidos e pó para injeção	FE: ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) FM: fosfato de potássio-metanol (90:10) – eluição isocrática	UV 254 nm	0,5	–	UNITED STATES, 2021
Teor e substâncias relacionadas em cápsulas	FE: ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) FM: ácido fosfórico 1%-metanol 90:10 pH 2 [A] e ácido fosfórico 1%-metanol 40:60 pH 2 [B]	UV 254 nm	0,50	Degradação em NaOH 0,1 M, a 85 °C. Estável nas outras condições de estresse avaliadas	CHINTA <i>et al.</i> , 2021

C18: octadecilsilano – FE: fase estacionária – FM: fase móvel – IFA: insumo farmacêutico ativo – LQ: limite de quantificação – UV: espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Pode-se observar que foram encontrados métodos compendiais e não-compendiais para insumo farmacêutico ativo, comprimidos, cápsulas de liberação sustentada, pó para injetáveis e soluções extemporâneas preparadas com veículos comerciais ou artificialmente produzidos, mas não para formulação de uso oftálmico. Em muitos estudos, fez-se degradação forçada, como recomendado e, como visão geral, conclui-se que o fármaco é estável nas condições de estresse, com susceptibilidade reportada apenas na condição hidrolítica em pH alcalino, como discutido anteriormente (PARASRAMPURIA, 1993).

Na fase pré-clínica, conduz-se ainda avaliação criteriosa de propriedades farmacodinâmicas e toxicodinâmicas do fármaco e formulação, buscando maior compreensão dos seus efeitos biológicos, quando administrados no organismo (ALLEN JR, POPOVICH, ANSEL, 2013). A avaliação é realizada inicialmente *in vitro*, em ensaios de citotoxicidade validados para linhagens celulares relevantes, como as células do epitélio pigmentar da retina humana (ARPE-19), no caso de medicamentos oftálmicos (DUSINSKA *et al.*, 2017). O uso dos ensaios com membrana cório-alantóica (CAM ou HET-CAM), em ovos fecundados de galinhas, para avaliar a toxicidade e potencial irritante de formulações oftálmicas, especialmente para produtos desenvolvidos para doenças do segmento anterior, é muito utilizado para avaliação prévia da segurança dos medicamentos (BARILE, 2010; WILSON, AHEARNE, HOPKINSON, 2015)

Posteriormente, os resultados obtidos durante avaliação da toxicidade ocular *in vitro* devem ser confirmados por ensaios *in vivo*, em modelos animais apropriados para a finalidade proposta. Para medicamentos oftálmicos, os coelhos são modelos animais mais frequentemente utilizados, pelas coincidências estruturais, fisiológicas e biomecânicas entre os olhos de coelhos e humanos (AHN *et al.*, 2016; ZERNII *et al.*, 2016). Todavia, pelo manuseio mais fácil e custo mais barato, ratos e camundongos podem ser úteis nestes estudos preliminares. Diferentes técnicas instrumentais podem ser utilizadas para este propósito e um estudo adequadamente delineado para toxicidade ocular deve incluir exames de imagem, como tomografia de coerência óptica, oftalmoscopia binocular indireta e biomicroscopia de lâmpada de fenda, avaliação histológica, estudo funcional da retina por eletrorretinografia e, dependendo do fármaco, exames bioquímicos para quantificação de marcadores específicos. Estes estudos são decisivos para comprovar a segurança dos produtos desenvolvidos para serem futuramente avaliados nos estudos clínicos (EDELHAUSER, GREEN, 1997; WILSON, AHEARNE, HOPKINSON, 2015)

3.9 Quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, especialidades farmacêuticas e fluidos biológicos oculares

O desenvolvimento de métodos analíticos para determinação quantitativa de fármacos em insumos farmacêuticos ativos, produtos acabados e fluidos biológicos, como sangue, plasma, urina, humor aquoso e humor vítreo, entre outros, é de fundamental importância para que se desenvolvam novos medicamentos e formas farmacêuticas, como implantes intraoculares, para alterações, inclusões e notificações pós-registro de medicamentos aprovados pela ANVISA, para monitorização terapêutica, para estudos farmacocinéticos, estudos de biodisponibilidade e estudos de bioequivalência, requeridos na documentação para registro (ABDEL-REHIM, 2011; CASSIANO *et al.*, 2006; ; DEVANSHU *et al.*; 2010, FERNANDES *et al.*, 2007).

Atualmente, os métodos propostos priorizam o emprego de cromatografia a líquido de alta eficiência ou ultra eficiência, com detecção por espectrofotometria de absorção no ultravioleta ou, preferencialmente, espectrometria de massas. Quando aplicados a amostras biológicas, muitas vezes é requerido preparo prévio de amostras para *clean up* e ou pré-concentração do analito, embora Silva *et al.* (2020) reportaram que, para fluidos oculares menos complexos, principalmente humor aquoso, não necessariamente se requer tratamento anterior. Estes métodos devem garantir confiabilidade, detectabilidade, seletividade e robustez em análises quantitativas de fármacos em amostras biológicas (KING *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2005).

Com o aumento crescente na prevalência de cegueira e perda parcial de visão por doenças oculares, como o glaucoma, percebe-se investimento proporcionalmente crescente para o desenvolvimento de medicamentos de uso oftálmico. Estes métodos são utilizados para avaliar a qualidade dos insumos adquiridos para a produção de medicamentos e dos próprios medicamentos. Evidentemente, métodos bioanalíticos são extremamente importantes para se determinar fármacos em fluidos corpóreos, produzindo dados que permitam estudar o perfil de distribuição destes fármacos pelo organismo para compreensão de sua farmacocinética, exigência regulatória para registro e sua farmacodinâmica, auxiliando na determinação de concentrações terapêuticas, no desenvolvimento de formas farmacêuticas e na monitorização terapêutica em grupos específicos (HEINIG *et al.*, 2017; XUE *et al.*, 2012).

Os primeiros métodos utilizados na quantificação de acetazolamida, desenvolvidos na década de 1950, baseavam-se em determinar indiretamente inibidores da anidrase carbônica, por método enzimático (HARKE, SCHIRREN, WEHRMANN, 1959; MAREN, ASH, BAILEY JR, 1954; YAKATAN, MARTIN, SMITH, 1976). Contudo, os métodos foram apenas parcialmente bem-sucedidos, pois, embora sensíveis, não possuíam seletividade e eram muito demorados (BAYNE, RODGERS, CRISOLOGO, 1975). Posteriormente, métodos por cintilografia líquida (KUNKA, MATTOCKS, 1978a) e polarografia de pulso diferencial (BALUGERA, GOICOLEA, BARRÍO, 1994) foram propostos, mas demonstraram baixa detectabilidade e seletividade. Os métodos cromatográficos, desenvolvidos mais recentemente para insumo farmacêutico, medicamentos ou amostras biológicas, encontram-se descritos na **Tabela 2**.

Dos métodos cromatográficos encontrados, a grande maioria empregou cromatografia líquida de fase reversa, com exceção de Hossie *et al.* (1981), Hartley *et al.* (1986) e Schwenk *et al.* (1995), que utilizaram cromatografia de fase normal e reportaram menores tempos de corrida, comparativamente aos métodos por fase reversa disponíveis. Predominou-se o uso de colunas empacotadas com sílica quimicamente modificada por octadecilsilano (C18) e foi observado ainda que a composição das fases móveis continha, via de regra, maior proporção de fase aquosa, variando entre 85-95%, e eluição isocrática, exceto pelo método de Herraez-Hernández, Campíns-Falcó e Sevillano-Cabeza (1992), que empregaram eluição em gradiente.

Na detecção, espectrofotometria no ultravioleta, mais acessível e barata, foi mais frequentemente utilizada, no geral realizada em 254 nm que, entretanto, não é o comprimento de máxima absorção para a acetazolamida nem em pH ácido nem em pH alcalino. Espectrometria de massas foi utilizada pela primeira vez somente em 2014, com Li *et al.*, para quantificar o fármaco em plasma de beagles. Posteriormente, Narapusetti e *et al.* (2015) e Hampson *et al.* (2016) propuseram métodos bioanalíticos espectrométricos para determinações em plasma e urina. Tanto Li *et al.* (2014) quanto Narapusetti *et al.* (2015) utilizaram ionização por *electrospray*, em modos diferentes, respectivamente negativo e positivo, enquanto Hampson *et al.* (2016) preferiram, em contrapartida, utilizar ionização química em pressão atmosférica, em modo positivo.

Curiosamente, percebe-se que a maioria das análises bioanalíticas foi feita em plasma, humano ou de ratos, cavalos e cachorros. Em poucos, o fármaco foi quantificado em outras

matrizes, como sangue, soro, saliva, urina, cérebro, líquido e dialisato, mas apenas em dois estudos o fármaco foi determinado em amostras biológicas oculares, quais sejam humor vítreo e humor aquoso, algo imprescindível para estudos de distribuição e farmacocinética ocular, o que reforça a necessidade de desenvolvimento analítico de métodos seletivos e sensíveis para a finalidade mencionada.

Tabela 2 – Métodos cromatográficos para quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, formas farmacêuticas e amostras biológicas, em ordem cronológica.

Amostra e extração	Condições cromatográficas	Deteção	Padrão interno	LQ e recuperação	Referência
Plasma (humanos) ELL (acetato de amônio 0,5 M pH 4,5; acetato de etila; glicina 0,25 M pH 2,0 e diclorometano)	FE: C18 (300 x 4,0 mm, 10 µm) FM: acetato de sódio 0,05 M pH 4,5-metanol (85:15)	UV 254 nm	5-propionamido-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida	LQ: 100 ng/ml R: 68,0-94,2%	BAYNE, RODGERS, CRISOLOGO, 1975
Sangue, plasma e saliva (humanos) ELL (acetato de sódio 0,1 M pH 5,0; éter etílico; diclorometano e isopropanol)	FE: coluna capilar 3% OV-17 (180 x 0,3 cm, 100-120 mesh) FM: argônio-metano (95:5)	DCE (Ni)	Fluoranteno	LQ: 5-100 ng/mL R: 96,0-104,0%	WALLACE, SHAH, RIEGELMAN, 1976
Plasma (humanos) ELL (tolueno e solução saturada de sulfato de prata)	FE: coluna de vidro 1% SE-50 (150 x 0,18 cm, 80-100 mesh) FM: nitrogênio	DCE (Ni)	2-[2-clorofenil]-5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol	LQ: 100 ng/mL R: não reportado	FAGERLUND, HARTVIG, LINDSTROM, 1979
Plasma (humanos) ELL (acetato de sódio 0,05 M pH 4,8 e acetato de etila)	FE: sílica gel (250 x 3,2 mm, 5 µm) FM: hexano-clorofórmio-metanol-ácido acético (65:25:10:0,25)	UV 280 nm	Clorotiazida	LQ: 500 ng/mL R: 94,0%	HOSSIE <i>et al.</i> , 1980
Soro (humanos) ELL (citrato de sódio 0,05 M pH 4,6; cloreto de sódio; acetato de etila e fosfato de sódio monobásico 0,1 M pH 11,9)	FE: C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) FM: acetonitrila-acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 (10:90)	UV 254 nm	Clorotiazida	LQ: 50 ng/mL R: 95,9-97,6%	CHAMBERS, WHITE, KOSTENBAUDER, 1981
Soro e plasma (humanos e coelhos) Humor aquoso e humor vítreo (coelhos) ELL (acetato de amônio 0,5 M pH 4,5 e acetato de etila)	FE: C18 (250 x 4,0 mm, 10 µm) FM: metanol-fosfato de amônio monobásico 1,44 g/L (5:16) com ácido fosfórico 0,2%	UV 254 nm	2-acetamido-4-metil-5-tiazolsulfonamida	LQ: 1000 ng/mL R: 83,5-86,7%	GAL, ELLIS, RENDI, 1981
Plasma (humanos) ELL (tolueno e solução saturada de sulfato de prata)	FE: coluna de vidro 3% OV-225 ou 3% OV-17 (150 x 0,2 cm) FM: nitrogênio	ECD (Ni)	2-[2-clorofenil]-5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol	LQ: 5000 ng/mL R: não reportado	ALM <i>et al.</i> , 1982
Sangue total, plasma e urina (humanos) ELL (acetato de etila, glicina pH 10,0 e éter etílico)	FE: C18 (300 x 3,9 mm) FM: acetonitrila-metanol-acetato de sódio 0,05 M (3:2:95)	UV 254 nm	Sulfadiazina	LQ: 50-1000 ng/mL R: 20,0-36,0%	CHAPRON, WHITE, 1984
Plasma (humanos) PPT (acetonitrila)	FE: C18 (300 x 3,9 mm) FM: acetato de sódio 0,05 M-acetonitrila (94:6)	UV 265 nm	Clorotiazida	LQ: 1000 ng/mL R: 90,0%	HWANG <i>et al.</i> , 1985

Tabela 2 – Métodos cromatográficos para quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, formas farmacêuticas e amostras biológicas, em ordem cronológica.

Amostra e extração	Condições cromatográficas	Deteção	Padrão interno	LQ e recuperação	Referência
Plasma e saliva (humanos) SPE (C18)	FE: sílica (300 x 3,9 mm, 10 µm) FM: água-etanol-diclorometano (65:65:500) com ácido acético 1,0%	UV 254 nm	Propazolamida	LQ: 100-125 ng/ml R: 87,7-96,6	HARTLEY <i>et al.</i> , 1986
Sangue total (humanos) ELL (solução saturada de cloreto de amônio e acetato de etila)	FE: coluna capilar de sílica (150 x 0,25 cm) FM: hélio	DIC	Alobarbitol	LQ: 10000 ng/mL R: 79,0%	SHARP, 1987
Plasma (humanos) ELL (citrato de sódio 0,05 M pH 4,6; cloreto de sódio; acetato de etila e fosfato de sódio monobásico 0,5 M pH 11,9)	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila-acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 (10:90)	UV 254 nm	Clorotiazida	LQ: 900 ng/mL R: não reportado	JOYCE <i>et al.</i> , 1989
Suspensões	FE: C18 (250 x 4,6 mm; 10 µm) FM: fosfato de potássio pH 5,0-metanol (65:35)	UV 280 nm	Teofilina	LQ: não reportado R: não reportado	HARIBHAKTI <i>et al.</i> , 1991
Urina (humanos) ELL (fosfato de sódio monobásico-fosfato de sódio dibásico 99:1; cloreto de sódio; acetato de etila e acetato de chumbo)	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: fosfato de sódio monobásico pH 3,0-acetonitrila (eluição em gradiente)	UV 275 nm	Hidroximetil-teofilina	LQ: 750 ng/mL R: 77,0-90,0	HERRAEZ-HERNANDEZ <i>et al.</i> , 1992
Comprimidos e pó para injeção	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetato de sódio pH 4-acetonitrila-metanol (88:12:2)	UV 254 nm	Sulfadiazina	LQ: não reportado R: não reportado	GOMAA <i>et al.</i> , 1993
Urina, soro e dialisato (humanos) ELL (acetato de sódio 0,05 M pH 4,8 e acetato de etila)	FE: sílica gel (250 x 3,2 mm, 5 µm) FM: hexano-clorofórmio-metanol-ácido acético (65:25:10:0,25)	UV 280 nm	Clorotiazida	LQ: 500 ng/mL R: não reportado	SCHWENK <i>et al.</i> , 1995
Soro (humanos) ELL (citrato de sódio 0,05 M pH 4,6; cloreto de sódio; acetato de etila e fosfato de sódio monobásico 0,1 M pH 11,9)	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila-acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 (10:90)	UV 254 nm	Clorotiazida	LQ: 100 ng/mL R: não reportado	YANO <i>et al.</i> , 1998

Tabela 2 – Métodos cromatográficos para quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, formas farmacêuticas e amostras biológicas, em ordem cronológica.

Amostra e extração	Condições cromatográficas	Deteção	Padrão interno	LQ e recuperação	Referência
Plasma, cérebro e FCE (ratos) ELL (acetato de etila e éter etílico)	FE: C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila-acetato de sódio (10:90) pH 4,1	UV 266 nm	Sulfadiazina	LQ: 4-50 ng/mL R: 96,1-105,7%	ICHIKAWA <i>et al.</i> , 1998
Plasma (cavalos) ELL (acetato de sódio 0,05 M e acetato de etila)	FE: C18 (150 x 4,6 mm, 100A) FM: não reportado	UV 254 nm	Clorotiazida	LQ: 190 ng/ml R: não reportado	ALBERTS <i>et al.</i> , 2000
Plasma (humanos) PPT (ácido perclórico 24%)	FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetato de sódio -acetonitrila-metanol (95:3:2)	UV 254 nm	Hidroclorotiazida	LQ: 250 ng/mL R: 91,9%	ZARGHI, SHAFATI, 2002
Humor aquoso (coelhos) Extração por microdiálise	Não reportado	UV 265 nm	Não reportado	LQ: não reportado R: não reportado	AGGARWAL <i>et al.</i> , 2007
Plasma, urina e dialisato (humanos) ELL (acetato de etila e sulfamato de amônio)	FE: C18 (300 x 3,9 mm) FM: acetonitrila-metanol-acetato de sódio (3:2:95)	UV 254 nm	Sulfadiazina	LQ: 10000 ng/mL R: não reportado	SENG YUE <i>et al.</i> , 2013
Plasma (beagles) PPT (acetonitrila)	FE: C18 (150 x 2,0 mm, 5 µm) FM: água-acetonitrila (eluição em gradiente)	IES-EM-EM (<i>m/z</i> 220,9-83,3)	Sulfadiazina	LQ: 200 ng/mL R: 93,8-98,4%	LI <i>et al.</i> , 2014
Plasma (humanos) PPT (ácido fórmico 0,1%), SPE (DVB)	FE: C18 (50 x 4,6 mm, 5 µm) FM: ácido fórmico 0,1%-acetonitrila (30:70)	IES-EM-EM (<i>m/z</i> 223,1-181,0)	Acetazolamida- H3	LQ: 50,3 ng/mL R: 79,4%	NARAPUSETTI <i>et al.</i> , 2015
Plasma, sangue total e urina (humanos) ELL (ácido fórmico 10% em acetonitrila e éter ter-butil metílico)	FE: C18 (100 x 4,6 mm, 5 µm) FM: metanol-água-ácido fórmico (15:85:0,05) com formiato de amônio 2 mmol/L	IQPA-EM-EM (<i>m/z</i> 223,1-181,0)	Acetazolamida- H3-N15	LQ: 10-50 ng/mL R: não reportado	HAMPSON <i>et al.</i> , 2016
Comprimidos	FE: C18 (100 x 4,6 mm) FM: fosfato de potássio pH 5-acetonitrila (78:22)	UV 254 nm	Não reportado	LQ: não reportado R: não reportado	BAKET, BELAL, 2018
Comprimidos, suspensão oral e pó para injeção	FE: ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) FM: fosfato de potássio 13,61 g/L-metanol (90:10)	UV 254 nm	Não reportado	LQ: não reportado R: não reportado	UNITED STATES, 2021

C18: octadecilsilano – C8: octilsilano – DCE: detector por captura de elétrons – DIC: detector por ionização de chama – DVB: divinilbenzeno – ELL: extração líquido-líquido – EM-EM: espectrometria de massas sequencial (em *tandem*) – FE: fase estacionária – FM: fase móvel – IES: ionização por eletrospray – IQPA: ionização química à pressão atmosférica – LQ: limite de quantificação – PPT: precipitação de proteínas – R: recuperação – UV: espectrofotometria de absorção no ultravioleta

CAPÍTULO 1

SÍNTESE, ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CONTROLE DE QUALIDADE DE IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ACETAZOLAMIDA

1 MATERIAIS

1.1 Substâncias químicas de referência e insumos farmacêuticos

- Acetazolamida substância química de referência (SQR), BCBN3938V (Fluka, EUA), grau de pureza de 99,9%
- Acetazolamida insumo farmacêutico ativo (Amphora, Brasil)
- Ácido polilático-co-glicólico 75:25 m/m (Boehringer Ingelheim, Brasil)
- Cloridrato de dorzolamida substância química de referência (SQR), 007ZP0 (USP, EUA), grau de pureza de 99,7%
- Hidroclorotiazida SQR (INCQS-Fiocruz, Brasil), grau de pureza de 99,5%
- Sulfadiazina SQR (INCQS-Fiocruz, Brasil), grau de pureza de 99,4%

1.2 Solventes e reagentes

1.2.1 Grau analítico

- Acetato de amônio (Sigma-Aldrich, EUA)
- Acetona (Vetec, Brasil)
- Ácido acético (Sigma-Aldrich, EUA)
- Ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Ácido trifluoroacético (Tedia, EUA)
- Cloreto de potássio (CRQ Química, Brasil)
- Cloreto de sódio (Synth, Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Hidróxido de amônio (Quimex, Brasil)
- Hidróxido de sódio (Vetec, Brasil)
- Nitrogênio gás (White Martins, Brasil)
- Nitrogênio líquido (White Martins, Brasil)
- Peróxido de hidrogênio (Perfyl Tech, Brasil)
- Sulfato de cobre pentaidratado (Sigma-Aldrich, EUA)

- Tolueno (Sigma-Aldrich, EUA)
- Trietilamina (Sigma-Aldrich, EUA)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Merck, Alemanha)

1.2.2 Grau cromatográfico

- Acetonitrila (JT Baker, México)
- Acetonitrila (Merck LiChrosolv, Alemanha)
- Acetonitrila (Scharlau, Espanha)
- Acetonitrila (Tedia, EUA)
- Metanol (JT Baker, México)
- Metanol (Merck, Alemanha)
- Metanol (Vetec, Brasil)

1.3 Vidrarias, consumíveis e colunas cromatográficas

- Balões volumétricos de 1-2000 mL
- Barras magnéticas
- Bastões de vidro
- Béqueres de 10-2000 mL
- Cadinho de alumínio
- Cadinho de alumina
- Coluna cromatográfica Atlantis HILIC, 250 x 4,6 mm, 5 µm (Waters, EUA)
- Coluna cromatográfica C18, 100 x 2,1 mm, 2,7 µm, (Agilent, EUA)
- Coluna cromatográfica C18, 100 x 2,1 mm, 5 µm (NST, Brasil)
- Coluna cromatográfica Nova-Pak fenil 150 x 3,9 mm, 5 µm (Waters, EUA)
- Coluna cromatográfica SeQuant Zic-HILIC, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Merck, Alemanha)
- Coluna cromatográfica SunFire C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm (Waters, EUA)
- Coluna cromatográfica Zorbax 300-SCX, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent, EUA)
- Coluna cromatográfica Zorbax-CN, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent, EUA)
- Coluna cromatográfica Zorbax-CN, 150 x 4,6 mm, 3,5 µm (Agilent, EUA)
- Dessecador
- Espátulas
- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha)

- Frascos para solventes e fase móvel de 250-1000 mL
- Frascos de penicilina
- Frascos *vial* de 1-2 mL, com tampas de rosca e septos de silicone (Waters, EUA)
- Kit de filtração à vácuo
- Lâminas de bisturi
- Micropipetas de 10-1000 µL modelo Labmate Soft (HTL Lab Solutions, Polônia)
- Minitubos de 1,5-2 mL (Eppendorf do Brasil, Brasil)
- Parafilme
- Placa de politetrafluoretileno (PTFE) (Teflon)
- Pipetas de Pasteur
- Ponteiras descartáveis para micropipetas de 200-1000 µL
- Provetas de 1-1000 mL
- Seringas de 1-5 mL
- Trocarte transescleral
- Tubos Falcon de 15-50 mL
- Tubos *insert* de fundo plano de 250-400 µL
- Unidade filtrante de fluoreto de polivinilideno (PVDF), 0,45 µm (Merck, Alemanha)

1.4 Equipamentos

- Agitador magnético (Nova Ética, Brasil)
- Agitador magnético com aquecimento modelo TMA20CF (Thelga, Brasil)
- Analisador térmico com termobalança DTA-TG modelo DTG-60 (Shimadzu, Japão)
- Balança analítica modelo AEG455M, com precisão de 0,05 mg (Shimadzu, Japão)
- Balança analítica modelo AUW2200, precisão de 0,001 mg (Shimadzu, Japão)
- Balança analítica modelo BP221D, precisão de 0,01 mg (Satorius, Alemanha)
- Balança semianalítica modelo AE20 (Mettler Toledo, EUA)
- Banho ultrassônico modelo Branson 220 (Branson Ultrasonics, EUA)
- Bomba de vácuo modelo KNF N842 (Laborport, Brasil)
- Calorímetro modelo DSC-50 (Shimadzu, Japão)
- Câmara climática modelo KBF LQC 720 (Binder, Alemanha)
- Câmara de fotoestabilidade modelo KBF LQC (Binder, Alemanha)
- Chapa aquecedora modelo C-MAG HP-4 (IKA, Brasil)

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência modelo 1200 Series, equipado com bomba quaternária, amostrador automático, forno, detector de arranjo de diodos e *software* ChemStation (Agilent, EUA)
- Cromatógrafo a líquido modelo 1200 Series, equipado com bomba binária, amostrador automático e forno acoplado a espectrômetro de massas modelo QTRAP 5500 (AB Sciex, Reino Unido)
- Cromatógrafo a líquido modelo Alliance e2695, equipado com bomba quaternária, amostrador automático, forno, detector ultravioleta-visível e *software* EmPower (Waters, Estados Unidos)
- Difratorômetro modelo XRD-7000 (Shimadzu, Japão)
- Espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível modelo UV1800, equipado com *software* UV Probe 2.33 (Shimadzu, Japão)
- Espectrômetro de absorção no infravermelho modelo Spectrum One, equipado com *software* Spectrum (Perkin Elmer, Estados Unidos)
- Estufa modelo B180 (Nabertherm Inc., Estados Unidos)
- Ultra-freezer modelo REVCO, temperatura de -80 °C (Thermo Scientific, Estados Unidos)
- Incubadora com agitação orbital e refrigeração tipo *shaker* (Agimaxx, Brasil)
- Irradiador panorâmico multipropósito categoria II modelo IR-214 GB-127, com fonte de cobalto-60, com atividade máxima de 2.200 TBq (MDS Nordion, Canadá)
- Liofilizador modelo Liobras K105 (Biobrás, Brasil)
- Microscópio eletrônico SIGMA VP modelo GmbHa (Carl Zeiss, Alemanha)
- Paquímetro digital Mitutoyo
- Potenciômetro modelo 827 pH Lab (Metrohm, Suíça)
- Refrigerador, temperatura de 4 °C (Consul, Brasil)
- Refrigerador modelo GRC-4PV, temperatura de 2 °C (Gelopar, Brasil)
- Ultrapurificador de água modelo Millipore Direct Q3 (Merck, Alemanha)

2 MÉTODOS

Os experimentos de desenvolvimento farmacotécnico e analítico, estudos de compatibilidade fármaco-excipientes, caracterização físico-química e controle de qualidade foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, na Faculdade de Farmácia, e no Laboratório de Análise Térmica, do Departamento de Química, ambos localizados na Universidade Federal de Minas Gerais, e no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear. Os estudos de estabilidade foram desenvolvidos em colaboração com a Fundação Ezequiel Dias.

2.1 Desenvolvimento e síntese de implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

Os implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida foram produzidos pelo método de moldagem a quente, conforme descrito por Fialho e Silva-Cunha (2005). Pesou-se, exatamente, 25 mg do insumo farmacêutico ativo e 75 mg de ácido polilático-co-glicólico 75:25 m/m. Transferiu-se, quantitativamente, a mistura física para frasco de penicilina, dissolveu-se em 5 mL de acetona e congelou-se em nitrogênio líquido por 5 minutos. Posteriormente, os frascos foram liofilizados, por 24 horas, a -100 °C, sob vácuo, obtendo-se uma mistura sólida homogênea, o líofilo ou *cake*, que foi transferida, com auxílio de espátula, para placa de politetrafluoretileno (PTFE) e mantida sob aquecimento, a 65 °C, em chapa aquecedora. Os implantes intravítreos foram moldados, na forma de bastões cilíndricos, utilizando-se espátula de plástico, e padronizados com comprimento de 5,0 mm e diâmetro de 0,4 mm, por paquímetro digital e trocarte transescleral. Implantes intravítreos brancos foram preparados pelo mesmo procedimento, sem adição do insumo farmacêutico ativo. Uma vez produzidos, os implantes intravítreos foram armazenados em minitubos e esterilizados por irradiação gama, com dose de 15 kGy.

2.2 Estudos de compatibilidade fármaco-excipiente e caracterização físico-química dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

2.2.1 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

O comportamento térmico do fármaco, excipiente e implantes intravítreos foi avaliado empregando calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*), termogravimetria (TG, do inglês *thermogravimetry*) e análise térmica diferencial (DTA, do inglês *differential thermal analysis*). Na análise de DSC, foram obtidas curvas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, na vazão de 50 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de 30 a 400 °C, em cadinho de alumínio fechado e massa de amostra exatamente pesada de 1,5 mg, após calibração prévia do equipamento com índio ($T_{onset} = 156,59$ °C, $DH = 28,45$ J/g). Na análise de TG/DTA, foram obtidas curvas em termobalança, com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de 30 a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, vazão de 50 mL/min, em cadinho de alumina e massa exatamente pesada de 2,5 mg.

2.2.2 Difração de raios X

Nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, medidas de difração de raios X foram realizadas para fármaco, excipiente, mistura física, liófilo e implantes intravítreos a 40 kV, 30 mA, utilizando radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056$ Å), em difratômetro equipado com policapilar para obtenção de difratogramas em geometria paralela, acoplado a monocromador de grafite a 30 rpm, para minimizar orientação preferencial. Os experimentos foram conduzidos em faixa angular de 5-35° (2θ), com tamanho de passo de 0,01° (2θ) e constante de tempo de 2 s/step. Um refinamento pelo método de Rietveld, utilizando *software FullProf*, foi realizado para o fármaco, avaliando-se o ajuste pelo fator numérico índice ponderado (Rw). Também foram efetuadas medidas de difração de raios X de pequeno ângulo com incidência rasante.

2.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Espectros de infravermelho foram obtidos para fármaco, polímero, mistura física, liófilo, implantes intravítreos e implantes intravítreos brancos, pelo método de reflexão total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflectance*), na faixa de 650 a 4.000 cm^{-1} , por 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva

Microscopia eletrônica de varredura (MEV), nos aumentos de 100 e 1000 vezes de magnitude, e espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) foram utilizadas para caracterização superficial e microestrutural e mapeamento elementar do fármaco e implantes intravítreos, conforme procedimento operacional padrão interno.

2.3 Estudos de estabilidade do insumo farmacêutico e implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

2.3.1. Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta para quantificação de acetazolamida, impurezas e produtos de degradação em insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreos

Um estudo de degradação forçada foi conduzido para o insumo farmacêutico ativo, polímero e misturas físicas, na proporção de 25% m/m de fármaco, conforme preconizado pela RDC nº. 53/2015, pelo Guia 04/2015, pelos guias internacionais para testes de estresse ICH Q1A(R2) (2003) e ICH Q1B (1998) e por Baertschi, Alsante e Reed (2011). O objetivo deste estudo foi obter o perfil de degradação e utilizar as amostras degradadas para o desenvolvimento e otimização do método indicativo de estabilidade. Todas as condições de estresse químico (hidrólises ácida e alcalina, oxidação e íons metálicos) e físicas (umidade, fotólise e calor),

descritas na **Tabela 3**, foram avaliadas nos períodos de 24, 72 e 168 horas ou até que fosse atingido nível desejável de degradação, em pequena extensão, com decaimento do teor do analito entre 10-30%, exceto para o estresse por íons metálicos, estudado apenas por 24 horas.

Tabela 3 – Condições de estresse e agentes de degradação empregados no estudo de degradação forçada.

Condição de estresse	Descrição da amostra	Estressante e outros parâmetros
Hidrólise ácida	Amostra em solução	HCl 0,1 M e 1,0 M – 37 °C
Hidrólise alcalina	Amostra em solução	NaOH 0,1 M e 1,0 M – 37 °C
Oxidação	Amostra em solução	H ₂ O ₂ 0,3% e 3,0% – 37 °C
Íons metálicos	Amostra em solução	CuSO ₄ 5 mM – 37 °C
Calor seco	Amostra em estado sólido	70 °C
Umidade	Amostra em estado sólido	> 75% UR – 25 °C
Fotólise	Amostra em estado sólido	1,2 milhões de lux.h, 200 watts.h/m ² – 25 °C

UR: umidade relativa

Para as condições de estresse químico, pesaram-se, exatamente, cerca de 50 mg de insumo farmacêutico e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 5 mL do co-solvente acetonitrila e submeteu-se ao banho de ultrassom, por 10 minutos. Em seguida, diluiu-se para volume com água ultrapura e homogeneizou-se, obtendo-se solução estoque na concentração de 2 mg/mL de fármaco. Pipetou-se 0,5 mL desta solução para *vial*, adicionou-se 0,1 mL de agente degradante e manteve-se sob agitação constante, a 150 rpm, em incubadora com agitação orbital. Decorridos os intervalos de tempo pré-estabelecidos, adicionou-se volumetricamente 0,4 mL de água ultrapura, homogeneizou-se e filtrou-se para *vial* utilizando filtro de seringa de 0,45 µm, obtendo-se soluções na concentração de 1 mg/mL. Soluções da mistura binária e do polímero foram preparadas da mesma forma, pesando-se 200 mg de mistura binária (equivalente a 50 mg do fármaco) ou 150 mg de PLGA, respectivamente.

Para as condições de estresse físico, pesaram-se, exatamente, cerca de 10 mg de insumo farmacêutico, 40 mg de mistura binária (equivalente a 10 mg do fármaco) e 30 mg de PLGA. Transferiu-se quantitativamente para placas de Petri, espalhando-se os materiais de modo a se obter finas camadas de pó. Na condição degradativa por calor, as amostras foram transferidas para estufa, a 70 °C; na degradação fotolítica, foram transferidas para câmara de fotoestabilidade; na degradação por umidade, foram transferidas para dessecador contendo béquer de 100 mL preenchido com solução supersaturada de cloreto de potássio (KCl),

hermeticamente vedado. Decorridos os intervalos de tempo pré-estabelecidos, pesou-se, exatamente, cerca de 1 mg de amostra degradada para *vial*, adicionou-se 0,1 mL do co-solvente acetonitrila e submeteu-se ao ultrassom, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se volumetricamente 0,9 mL de água ultrapura, homogeneizou-se e filtrou-se para *vial* utilizando filtro de seringa de 0,45 μm , obtendo-se soluções na concentração de 1 mg/mL.

Amostras brancas, contendo apenas diluente e estressante, na ausência de fármaco, mistura binária e polímero, foram submetidas aos mesmos procedimentos. Também foram preparados, ainda, controle de estresse químico e físico, conforme descrito anteriormente, sem exposição ao agente estressante. Na condição fotolítica, placas de Petri controle foram expostas na câmara de fotoestabilidade, mas protegidas por papel alumínio, para prevenir exposição à luz. Em sequência, as amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente.

Todas as amostras degradadas, controle e brancas, foram analisadas em triplicata e utilizadas no desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas do método indicativo de estabilidade para quantificação do fármaco e das substâncias relacionadas por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta.

No desenvolvimento, um gradiente exploratório foi utilizado para entendimento do perfil cromatográfico das amostras degradadas, mantendo-se condições cromatográficas provenientes de métodos publicados anteriormente (**Tabela 1**). As condições cromatográficas empregadas no método inicial proposto são descritas na **Tabela 4** e o gradiente exploratório é descrito na **Tabela 5**.

Tabela 4 – Condições cromatográficas do método inicial.

Parâmetro	Condição
Coluna cromatográfica	Zorbax C18 250 x 4,6 mm, 5 μm
Fase móvel	Água ultrapura e acetonitrila
Eluição	Gradiente
Temperatura da coluna	25 °C
Vazão de fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Comprimento de onda	254 nm
Tempo de corrida	60 min

C18: octadecilsilano

Tabela 5 – Gradiente exploratório inicial.

Tempo (min)	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0	95	5
55	5	95
56	95	5
60	5	5

Posteriormente, parâmetros como comprimento de onda de detecção, composição e vazão de fase móvel, modo de eluição, modificador orgânico e aditivos, temperatura da coluna, fase estacionária e volume de injeção foram otimizados, objetivando-se desenvolver um método com elevada detectabilidade, capaz de identificar e quantificar analito e produtos de degradação, com suficiente resolução entre os picos do fármaco e dos interferentes e tempo de corrida mais curto. Verificou-se, durante o desenvolvimento, ser necessário desenvolver métodos distintos para a determinação do teor de acetazolamida e teor das substâncias relacionadas, por causa dos intervalos de concentrações muito diferentes.

Depois de desenvolvidos, os métodos foram validados, conforme RDC nº. 53/2007, RDC nº. 166/2017, guia Q2(R1) da *International Conference on Harmonisation (ICH)*, por Souza e Junqueira (2005), Souza (2007) e apêndice F do Guia Para Padronização de Requisitos de Performance de Métodos da *Association of Official Agricultural Chemists Peer-Verified Methods Program (AOAC, 2016)*. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, repetibilidade (precisão intradia), precisão intermediária (precisão inter-dias), exatidão, limites de quantificação e detecção e robustez. Os resultados foram analisados nos *softwares* Excel 10 (Microsoft, Estados Unidos), ActionStat (Portal Action, Brasil) e Prism 7.0 (GraphPad, Estados Unidos).

Para a avaliação da seletividade, amostras de diluente, fase móvel, placebo contendo PLGA, amostras brancas e amostras degradadas do IFA e mistura física, nas respectivas concentrações de trabalho, foram filtradas para *vial* e analisadas, em triplicata. Os cromatogramas obtidos foram comparados, avaliando-se a presença de picos interferentes, nos tempos de retenção do analito e a resolução entre analito e produtos de degradação. A pureza cromatográfica do pico do analito foi confirmada *a posteriori*, em um segundo equipamento, com detector de arranjo de diodos.

Para a linearidade, foram preparadas, de forma independente, três curvas de calibração, a partir de soluções estoques do fármaco, a 1,0 mg/mL, em diluente composto por mistura de água ultrapura e acetonitrila, na proporção 50:50 v/v. No método para determinação do teor de acetazolamida, foram preparadas soluções em cinco níveis de concentração equidistantes entre 80-120% da concentração de trabalho, ou 80-120 µg/mL, pela diluição das soluções estoques utilizando-se água ultrapura como diluente. No método para determinação das substâncias relacionadas, procedeu-se de modo similar, mas a faixa adotada variou do limite de quantificação do método (0,4 µg/mL) até 120% do limite de notificação de impurezas (0,1% ou 1 µg/mL), que é 1,2 µg/mL. Todas as diluições realizadas para se obter as soluções empregadas na avaliação da linearidade estão descritas na **Tabela 6** e na **Tabela 7**.

Tabela 6 – Descrição do preparo das soluções de linearidade, para o método de determinação do teor de acetazolamida

Nível (%)	Volume SE (mL)	Volume final (mL)	Concentração (µg/mL)
80	0,8	10	80
90	0,9	10	90
100	1,0	10	100
110	1,1	10	110
120	1,2	10	120

SE: solução estoque

Tabela 7 – Descrição do preparo das soluções de linearidade, para o método de determinação do teor de substâncias relacionadas

Nível (%)	Volume SE (mL)	Volume final (mL)	Concentração (µg/mL)
40 (LQ)	0,04	100	0,40
60	0,06	100	0,60
80	0,08	100	0,80
100	0,10	100	1,00
120	0,12	100	1,20

SE: solução estoque

Todas as soluções foram preparadas, filtradas para *vial* e analisadas aleatoriamente. As áreas obtidas para o analito foram plotadas, em função da concentração, para representação gráfica e estimativa da equação da reta. Todos os pressupostos requeridos para modelo de regressão

linear simples pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), conforme preconizado pela RDC n.º 166/2017, por Souza e Junqueira (2005) e por Souza (2007), foram verificados pelos testes estatísticos do resíduo padronizado de Jacknife, Shapiro-Wilk, Cochran e Durbin-Watson, utilizados na avaliação de *outliers* e normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos, respectivamente.

Depois, o MMQO e análise de variância (ANOVA) foram utilizados para se verificar significância da regressão e desvio da linearidade e para estimar parâmetros de regressão linear, como coeficiente angular (b), intercepto (a) e coeficientes de determinação (R^2) e determinação (r^2). Todos os ensaios consideraram nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$). Os critérios esperados foram resíduos normais, homocedásticos e independentes, no máximo 22% de *outliers*, regressão significativa, coeficiente de correlação maior que 0,99 e intercepto estatisticamente igual a 0 (INTERNATIONAL, 2005; SOUZA, JUNQUEIRA, 2005. SOUZA, 2007. BRASIL, 2017).

Exatidão e precisão foram verificadas por meio da adição ao placebo de solução estoque de fármaco, preparados de forma independente, em triplicata, obtendo-se soluções nas concentrações baixa, média e alta, ou seja, 80, 100 e 120 $\mu\text{g/mL}$ para teor de acetazolamida e 0,4, 0,8 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$ para teor de substâncias relacionadas. A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade ou precisão intradia e precisão intermediária ou interdias. Na repetibilidade, as amostras foram avaliadas nas mesmas condições de operação, analista e instrumentação, em uma única corrida, enquanto a precisão intermediária foi avaliada no mesmo laboratório, mesmas condições de operação e mesma instrumentação, mas em diferentes dias e com diferentes analistas. Determinou-se a recuperação e o desvio padrão relativo (DPR), admitindo-se DPR de 5,3% e 11,0% e recuperações entre 90-107% e 80-110% para métodos de teor de acetazolamida e teor de substâncias relacionadas, respectivamente (AOAC, 2016).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados pelos parâmetros da curva (coeficiente angular e desvio padrão do intercepto) e pela razão sinal:ruído, definida como, no mínimo, 2:1 para LD e 10:1 para LQ. Os resultados estimados para LQ foram confirmados pela determinação da exatidão e precisão na concentração encontrada, admitindo-se DPR e recuperação conforme preconizado para precisão e exatidão (INTERNATIONAL, 2005; BRASIL, 2017; AOAC, 2016).

No estudo da robustez, empregou-se planejamento experimental fatorial 2^5 , com ponto central, para avaliar o efeito de variações deliberadas nas condições cromatográficas. Os

parâmetros concentração de aditivo [X1], proporção de acetonitrila [X2], vazão de fase móvel [X3], inclinação do gradiente [X4] e comprimento de onda de detecção [X5] foram escolhidos como fatores enquanto recuperação, fator de retenção, assimetria, razão sinal:ruído e números de pratos teóricos foram estudados como respostas. Na **Tabela 8**, está apresentada a matriz experimental proposta. Os resultados foram avaliados estatisticamente no *software* Design Expert 12 (Stat-Ease, EUA), a nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$), pelo diagrama de Pareto e por ANOVA.

Tabela 8 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento fatorial 2^5 para avaliação da robustez

Experimento	Variável				
	X1 (%)	X2 (%)	X3 (mL/min)	X4 (min)	X5 (nm)
1	0,05 [-1]	3 [-1]	0,8 [-1]	4 [-1]	263 [-1]
2	0,15 [+1]	3 [-1]	0,8 [-1]	4 [-1]	263 [-1]
3	0,05 [-1]	7 [+1]	0,8 [-1]	4 [-1]	263 [-1]
4	0,15 [+1]	7 [+1]	0,8 [-1]	4 [-1]	263 [-1]
5	0,05 [-1]	3 [-1]	1,2 [+1]	4 [-1]	263 [-1]
6	0,15 [+1]	3 [-1]	1,2 [+1]	4 [-1]	263 [-1]
7	0,05 [-1]	7 [+1]	1,2 [+1]	4 [-1]	263 [-1]
8	0,15 [+1]	7 [+1]	1,2 [+1]	4 [-1]	263 [-1]
9	0,05 [-1]	3 [-1]	0,8 [-1]	6 [+1]	263 [-1]
10	0,15 [+1]	3 [-1]	0,8 [-1]	6 [+1]	263 [-1]
11	0,05 [-1]	7 [+1]	0,8 [-1]	6 [+1]	263 [-1]
12	0,15 [+1]	7 [+1]	0,8 [-1]	6 [+1]	263 [-1]
13	0,05 [-1]	3 [-1]	1,2 [+1]	6 [+1]	263 [-1]
14	0,15 [+1]	3 [-1]	1,2 [+1]	6 [+1]	263 [-1]
15	0,05 [-1]	7 [+1]	1,2 [+1]	6 [+1]	263 [-1]
16	0,15 [+1]	7 [+1]	1,2 [+1]	6 [+1]	263 [-1]
17	0,05 [-1]	3 [-1]	0,8 [-1]	4 [-1]	267 [+1]
18	0,15 [+1]	3 [-1]	0,8 [-1]	4 [-1]	267 [+1]
19	0,05 [-1]	7 [+1]	0,8 [-1]	4 [-1]	267 [+1]
20	0,15 [+1]	7 [+1]	0,8 [-1]	4 [-1]	267 [+1]
21	0,05 [-1]	3 [-1]	1,2 [+1]	4 [-1]	267 [+1]
22	0,15 [+1]	3 [-1]	1,2 [+1]	4 [-1]	267 [+1]
23	0,05 [-1]	7 [+1]	1,2 [+1]	4 [-1]	267 [+1]
24	0,15 [+1]	7 [+1]	1,2 [+1]	4 [-1]	267 [+1]
25	0,05 [-1]	3 [-1]	0,8 [-1]	6 [+1]	267 [+1]
26	0,15 [+1]	3 [-1]	0,8 [-1]	6 [+1]	267 [+1]
27	0,05 [-1]	7 [+1]	0,8 [-1]	6 [+1]	267 [+1]
28	0,15 [+1]	7 [+1]	0,8 [-1]	6 [+1]	267 [+1]
29	0,05 [-1]	3 [-1]	1,2 [+1]	6 [+1]	267 [+1]
30	0,15 [+1]	3 [-1]	1,2 [+1]	6 [+1]	267 [+1]
31	0,05 [-1]	7 [+1]	1,2 [+1]	6 [+1]	267 [+1]
32	0,15 [+1]	7 [+1]	1,2 [+1]	6 [+1]	267 [+1]
33	0,10 [0]	5 [0]	1,0 [0]	5 [0]	265 [0]
34	0,10 [0]	5 [0]	1,0 [0]	5 [0]	265 [0]
35	0,10 [0]	5 [0]	1,0 [0]	5 [0]	265 [0]

2.3.2 Estudo de estabilidade acelerada

Depois de desenvolvidos e validados, os métodos foram aplicados em estudo de estabilidade acelerada. No estudo, amostras do insumo farmacêutico ativo, implantes intravítreos, implantes intravítreos brancos e polímero foram pesadas e transferidas, individualmente, para frascos de penicilina, que foram fechados hermeticamente, com parafilme, e envolvidos com papel alumínio, para simular os materiais de embalagem e dispositivos de inserção utilizados para a forma farmacêutica. Todas as amostras foram cuidadosamente acondicionadas em câmara de estabilidade, a 40 °C e 75% UR. Decorridos três e seis meses de exposição, as amostras foram retiradas e analisadas pelo método indicativo de estabilidade para quantificação do analito e dos produtos de degradação.

2.4 Controle de qualidade físico-químico dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

2.4.1 Determinação de peso médio

O peso médio dos implantes intravítreos foi determinado em 20 unidades, conforme descrito no método geral da Farmacopeia Brasileira 6ª edição, determinando-se média, desvio padrão absoluto, desvio padrão relativo (DPR) e variação individual (%), admitindo-se não mais que 5,0% de DPR, não mais que duas unidades fora da especificação de $\pm 10,0\%$ e nenhuma unidade fora da especificação de $\pm 20,0\%$.

2.4.2 Determinação de comprimento, espessura, volume e área superficial

O comprimento e a espessura dos implantes intravítreos foram determinados nas mesmas 20 unidades, com paquímetro digital, enquanto o volume e a área superficial foram calculados pelas equações para determinação de volume e área superficial de cilindros, determinando-se média, desvio padrão absoluto, desvio padrão relativo (DPR) e variação individual (%),

admitindo-se não mais que 5,0% de DPR, não mais que duas unidades fora da especificação de $\pm 10,0\%$ e nenhuma unidade fora da especificação de $\pm 20,0\%$.

2.4.3 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, implantes intravítreos e fluidos biológicos

Desenvolveu-se método por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para quantificação do fármaco no insumo farmacêutico ativo, nos implantes intravítreos, no humor vítreo e humor aquoso. Decidiu-se utilizar padrão interno (PI) no desenvolvimento e, portanto, na primeira etapa focou-se na sua escolha, avaliando-se a dorzolamida, a hidroclorotiazida e a sulfadiazina. A escolha foi pautada em critérios como similaridade estrutural e química, capacidade de ionização e resolução entre PI e analito.

Todas as condições espectrométricas e cromatográficas foram criteriosamente estudadas, em sequência, de modo a se obter método analítico com seletividade e detectabilidade suficientes para ser aplicável a matrizes diferentes. Durante a otimização, foram utilizadas soluções do analito e substâncias candidatas a padrão interno, na concentração de 50 ng/mL empregando acetonitrila como diluente.

De início, priorizou-se otimizar parâmetros operacionais do espectrômetro de massas, como condições de ionização, de fragmentação e da fonte de ionização por *electrospray*. Os parâmetros estudados foram modo de ionização, transições de massa para quantificação e confirmação, potencial de desagregação (DP, do inglês *declustering potential*), potencial de entrada (EP, do inglês *entrance potential*), energia de colisão (CE, do inglês *collision energy*), potencial da célula de saída (CXP, do inglês *collision cell exit potential*), voltagem do capilar (ISV, do inglês *ionspray voltage*), dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), gás contracorrente (CUR, do inglês *curtain gas*), temperatura (T) e pressão dos gases de nebulização (GS1) e secagem (GS2). O gás nitrogênio foi empregado como gás contracorrente, gás de nebulização, gás de colisão e gás de secagem.

Nesta fase, a análise prévia foi realizada para verificar-se a influência dos solventes acetonitrila, metanol e água ultrapura e aditivos modificadores de pH, como hidróxido de

amônio, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS), acetato de amônio e trietilamina, em concentrações usuais, preparados em água ultrapura, na intensidade do sinal de analito e padrão interno. Todos os solventes, aditivos, analito e padrões internos foram avaliados por infusão direta, em vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, nos modos negativo e positivo, por varredura em modo *full scan*, na faixa de razão massa-carga (m/z) de 200 a 400 Da. Esse procedimento foi realizado para identificação de interferentes ou modo de varredura do íon precursor para monitoramento da intensidade do sinal dos íons precursores de analito e PI nos solventes e aditivos. Posteriormente, perfis de fragmentação foram obtidos para a faixa de razão m/z de 50 a 250 Da para analito e 100 a 350 Da para PI, em ampla faixa de energia de colisão, no modo varredura do íon produto.

Posteriormente, parâmetros espectrométricos foram otimizados utilizando-se planejamentos experimentais, separadamente, de forma multivariada. Para os parâmetros de ionização e fragmentação, propôs-se planejamento experimental de composto central (CCD, do inglês *central composite design*), composto por planejamento fatorial 2^4 , pontos axiais e ponto central, avaliado em triplicata, conforme matriz experimental descrita na **Tabela 9**, que descreve os níveis e condições para os fatores DP [X1], EP [X2], CE [X3] e CXP [X4], conforme intervalo anteriormente definido por procedimento semiautomático univariado do equipamento. Nos experimentos, analito e PI foram analisados por infusão direta, no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*). Definiu-se a intensidade das transições de massas de quantificação como resposta, que foram avaliadas estatisticamente no *software* Statistica 10.0 (StatSoft, EUA).

Na sequência, os parâmetros da fonte de ionização por *electrospray* ISV, temperatura, CID, CUR, GS1 e GS2. Todos os experimentos foram conduzidos no modo MRM por análise de injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*), conectando-se o espectrômetro de massas ao cromatógrafo, mas sem coluna cromatográfica. No procedimento, uma mistura de acetonitrila e água ultrapura, na proporção de 80:20 v/v, foi utilizada como fase móvel, sob vazão de 0,5 mL/min, *dwell time* de 250 ms, tempo de corrida em 0,7 min. Todos os experimentos foram conduzidos com soluções de analito e PI a 10 ng/mL, em acetonitrila. Depois de uma triagem prévia dos fatores mais significativos, os parâmetros mais críticos GS2 [X1], temperatura [X2], GS1 [X3] e CID [X4] foram selecionados como fatores para planejamento Doehlert, enquanto ISV e CUR foram mantidos nos níveis definidos pelo equipamento. Todos os níveis e intervalos avaliados estão descritos na matriz experimental, na **Tabela 10**. Os resultados, mensurados como a intensidade dos sinais obtidos a partir das

transições de massa do analito e do PI, foram avaliados estatisticamente com o *software* Statistica 10.0 (StatSoft, EUA).

Tabela 9 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento de composto central para otimização de condições espectrométricas de ionização e fragmentação para analito e padrão interno.

Experimento	Variável – Analito				Variável – Padrão interno			
	X1 (V)	X2 (V)	X3 (V)	X4 (V)	X1 (V)	X2 (V)	X3 (V)	X4 (V)
1	-160 [-1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-13 [-1]	-180 [-1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-18 [-1]
2	-140 [+1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-13 [-1]	-120 [+1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-18 [-1]
3	-160 [-1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-13 [-1]	-180 [-1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-18 [-1]
4	-140 [+1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-13 [-1]	-120 [+1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-18 [-1]
5	-160 [-1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-13 [-1]	-180 [-1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-18 [-1]
6	-140 [+1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-13 [-1]	-120 [+1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-18 [-1]
7	-160 [-1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-13 [-1]	-180 [-1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-18 [-1]
8	-140 [+1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-13 [-1]	-120 [+1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-18 [-1]
9	-160 [-1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-7 [+1]	-180 [-1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-10 [+1]
10	-140 [+1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-7 [+1]	-120 [+1]	-11 [-1]	-35 [-1]	-10 [+1]
11	-160 [-1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-7 [+1]	-180 [-1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-10 [+1]
12	-140 [+1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-7 [+1]	-120 [+1]	-5 [+1]	-35 [-1]	-10 [+1]
13	-160 [-1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-7 [+1]	-180 [-1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-10 [+1]
14	-140 [+1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-7 [+1]	-120 [+1]	-11 [-1]	-25 [+1]	-10 [+1]
15	-160 [-1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-7 [+1]	-180 [-1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-10 [+1]
16	-140 [+1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-7 [+1]	-120 [+1]	-5 [+1]	-25 [+1]	-10 [+1]
17	-170 [-2]	-8 [0]	-30 [0]	-10 [0]	-210 [-2]	-8 [0]	-30 [0]	-14 [0]
18	-130 [+2]	-8 [0]	-30 [0]	-10 [0]	-90 [+2]	-8 [0]	-30 [0]	-14 [0]
19	-150 [0]	-14 [-2]	-30 [0]	-10 [0]	-150 [0]	-14 [-2]	-30 [0]	-14 [0]
20	-150 [0]	-2 [+2]	-30 [0]	-10 [0]	-150 [0]	-2 [+2]	-30 [0]	-14 [0]
21	-150 [0]	-8 [0]	-40 [-2]	-10 [0]	-150 [0]	-8 [0]	-40 [-2]	-14 [0]
22	-150 [0]	-8 [0]	-20 [+2]	-10 [0]	-150 [0]	-8 [0]	-20 [+2]	-14 [0]
23	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-16 [-2]	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-22 [-2]
24	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-4 [+2]	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-6 [+2]
25	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-10 [0]	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-14 [0]
26	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-10 [0]	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-14 [0]
27	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-10 [0]	-150 [0]	-8 [0]	-30 [0]	-14 [0]

Tabela 10 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento Doehlert para otimização de condições da fonte *electrospray* para analito e padrão interno.

Experimento	Variável			
	X1 (psi)	X2 (°C)	X3 (psi)	X4 (psi)
1	45,0 [0]	550 [0]	45,0 [0]	Médio [0]
2	45,0 [0]	550 [0]	45,0 [0]	Médio [0]
3	45,0 [0]	550 [0]	45,0 [0]	Médio [0]
4	50,0 [+1]	550 [0]	45,0 [0]	Médio [0]
5	47,5 [+0,5]	650 [+0,866]	45,0 [0]	Médio [0]
6	47,5 [+0,5]	583 [+0,289]	50,0 [+0,817]	Médio [0]
7	47,5 [+0,5]	583 [+0,289]	47,0 [+0,204]	Alto [+0,791]
8	40,0 [-1]	550 [0]	45,0 [0]	Médio [0]
9	42,5 [-0,5]	450 [-0,866]	45,0 [0]	Médio [0]
10	42,5 [-0,5]	517 [-0,289]	40,0 [-0,817]	Médio [0]
11	42,5 [-0,5]	517 [-0,289]	43,0 [-0,204]	Baixo [-0,791]
12	47,5 [+0,5]	450 [-0,866]	45,0 [0]	Médio [0]
13	47,5 [+0,5]	517 [-0,289]	40,0 [-0,817]	Médio [0]
14	47,5 [+0,5]	517 [-0,289]	43,0 [-0,204]	Baixo [-0,791]
15	42,5 [-0,5]	650 [+0,866]	45,0 [0]	Médio [0]
16	45,0 [0]	617 [+0,577]	40,0 [-0,817]	Médio [0]
17	45,0 [0]	617 [+0,577]	43,0 [-0,204]	Baixo [-0,791]
18	42,5 [-0,5]	583 [+0,289]	50,0 [+0,817]	Médio [0]
19	45,0 [0]	483 [-0,577]	50,0 [+0,817]	Médio [0]
20	45,0 [0]	550 [0]	49,0 [+0,613]	Baixo [-0,791]
21	42,5 [-0,5]	583 [+0,289]	47,0 [+0,204]	Alto [+0,791]
22	45,0 [0]	483 [-0,577]	47,0 [+0,204]	Alto [+0,791]
23	45,0 [0]	550 [0]	41,0 [-0,613]	Alto [+0,791]

Na etapa de separação cromatográfica, fases estacionárias de diferentes polaridades, em fase reversa, fase normal ou interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography*) foram testadas durante o desenvolvimento, avaliando-se parâmetros como fator de retenção (k) para analito e PI e resolução dos picos. Na fase móvel, verificou-se, por infusão direta nos modos varredura total (*full scan*) e MRM, interferência dos solventes e aditivos na seletividade e detectabilidade do método, monitorando-se possíveis interferentes com razão m/z e perfis de fragmentação iguais ao analito ou PI e efeito indutor ou supressor na ionização de analito e PI, empregando-se como fase móvel mistura de solvente orgânico e

fase aquosa mais aditivo na proporção de 90:10 v/v, vazão de 0,5 mL/min, *dwell time* de 250 ms e corrida de 0,7 min.

Uma vez definidos o solvente e aditivo que resultaram em métodos mais seletivos e sensíveis, ajustes finos na composição e vazão de fase móvel e outros parâmetros cromatográficos foram efetuados em planejamento Doehlert. Vazão de fase móvel [X1], proporção de fase aquosa [X2] e concentração do aditivo [X3] foram escolhidos como fatores e os respectivos intervalos para cada um foram determinados embasados por estudos preliminares, suficientes para uma retenção satisfatória e corridas curtas, conforme matriz experimental disposta na **Tabela 11**. Todos os experimentos foram conduzidos, de forma randômica, no modo MRM, em triplicata, monitorando-se simultaneamente as transições de massas de quantificação e confirmação para analito e PI, com *dwell time* de 250 ms e corrida de 10 min.

Como respostas, foram avaliados fator de capacidade, resolução e razão sinal:ruído, combinados em uma única resposta e otimizados simultaneamente, pela ferramenta desejabilidade, e assimetria, que foi avaliada separadamente, *a posteriori*, por ajustes finos na fase móvel. Na estimativa dos valores de desejabilidades individuais, definiu-se que, para a razão sinal:ruído, quanto maior, mais desejável, admitindo-se 1000 como mínimo, enquanto que, para fator de retenção e resolução, o objetivo era aproximar-se dos alvos de 0,5 e 3,0, respectivamente, admitindo-se resultados entre 0,1 e 1,5 e entre 1,5 e 6,5 como aceitáveis para separação cromatográfica apropriada e duração de corrida aceitável. Todos os resultados foram estatisticamente avaliados no *software* Statistica[®] 10.0 (StatSoft, EUA).

Depois de desenvolvido, o método analítico foi validado, conforme preconizado pela RDC nº. 166/2017, pelo guia Q1(R2) da *International Conference on Harmonisation* (ICH), por Souza e Junqueira (2005), por Souza (2007) e pelo apêndice F do Guia Para Padronização de Requisitos de Performance de Métodos da *Association of Official Agricultural Chemists Peer-Verified Methods Program* (AOAC, 2016). Os resultados foram analisados nos *softwares* Excel 10 (Microsoft, EUA), ActionStat (Portal Action, Brasil) e Prism 7.0 (GraphPad, EUA) e nas planilhas de Souza (2007). Os parâmetros validados foram seletividade, linearidade, repetibilidade (precisão intradia), precisão intermediária (precisão inter-dias), exatidão, limites de quantificação e detecção e robustez.

Tabela 11 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento Doehlert para otimização da composição da fase móvel.

Experimento	Variável		
	X1 (mL/min)	X2 (%)	X3 (mmol/L)
1	0,50 [0]	10,0 [0]	10,0 [0]
2	0,60 [+1]	10,0 [0]	10,0 [0]
3	0,55 [+0,5]	15,0 [+0,866]	10,0 [0]
4	0,55 [+0,5]	11,7 [+0,289]	15,0 [+0,816]
5	0,40 [-1]	10,0 [0]	10,0 [0]
6	0,45 [-0,5]	5,0 [-0,866]	10,0 [0]
7	0,45 [-0,5]	8,3 [-0,289]	5,0 [-0,816]
8	0,55 [+0,5]	5,0 [-0,866]	10,0 [0]
9	0,55 [+0,5]	8,3 [-0,289]	5,0 [-0,816]
10	0,50 [0]	13,3 [+0,577]	5,0 [-0,816]
11	0,45 [-0,5]	15,0 [+0,866]	10,0 [0]
12	0,45 [-0,5]	11,7 [+0,289]	15,0 [+0,816]
13	0,50 [0]	6,7 [-0,577]	15,0 [+0,816]
14	0,50 [0]	10,0 [0]	10,0 [0]
15	0,50 [0]	10,0 [0]	10,0 [0]

Na seletividade, foram obtidos, em triplicata, cromatogramas para os solventes, diluente, fase móvel, placebo contendo PLGA 75:25 v/v a 500 ng/mL e placebo fortificado com analito e PI na concentração de 50 ng/mL. Avaliou-se a presença de picos interferentes nos tempos de retenção do analito e PI e determinou-se a recuperação de analito e PI no placebo fortificado, pela comparação das respostas encontradas para analito e PI com as encontradas para solução padrão, em diluente, admitindo-se como critérios recuperações entre 98-102% e DPR inferior a 5,0%. A pureza cromatográfica dos picos de analito e PI foram avaliadas pela observação dos espectros de massas referentes aos picos.

Na linearidade, foram preparadas, de forma independente, três curvas de calibração, a partir de soluções estoque preparadas em fase móvel, na concentração de 500.000 ng/mL, para analito e PI. Para a acetazolamida, a solução primária foi utilizada para se obter soluções estoque de concentrações 5, 50, 500, 2.500 e 10.000 ng/mL, identificadas por SE1, SE2, SE3, SE4 e SE5, enquanto para o padrão interno foi preparada apenas uma solução estoque, a 10.000 ng/mL, codificada por SE6. A linearidade foi estudada em sete níveis, por diluições

sucessivas das soluções estoque, mantendo-se fixa em 250 ng/mL a concentração do PI, conforme **Tabela 12**.

Tabela 12 – Descrição do preparo das soluções de linearidade

Volume SE analito (mL)	Volume SE PI (mL)	Volume fase móvel (mL)	Concentração (ng/mL)
0,100 [SE1]	0,025 [SE6]	0,875	0,5
0,100 [SE2]	0,025 [SE6]	0,875	5,0
0,100 [SE3]	0,025 [SE6]	0,875	50,0
0,100 [SE4]	0,025 [SE6]	0,875	250,0
0,050 [SE5]	0,025 [SE6]	0,925	500,0
0,075 [SE5]	0,025 [SE6]	0,900	750,0
0,100 [SE5]	0,025 [SE6]	0,875	1.000,0

PI: padrão interno – SE: solução estoque

Depois de preparadas, as soluções foram filtradas para *vial* e analisadas, de forma aleatória, em triplicata. As razões entre áreas obtidas para analito e PI foram plotados em função da concentração do analito, para representação gráfica e estimativa da equação da reta. Todas as premissas requeridas para modelo de regressão linear simples pelo método MMOQ foram verificadas, conforme proposto pela RDC n.º 166/2017, por Souza e Junqueira (2005) e por Souza (2007), pelos testes estatísticos do resíduo padronizado de Jackknife, Ryan-Joiner, Brown-Forsythe e Durbin-Watson, usados na avaliação de possíveis *outliers* e normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos, respectivamente.

Posteriormente, MMOQ e ANOVA foram utilizados para se verificar a significância da regressão e o desvio da linearidade e para estimar parâmetros de regressão linear, como coeficiente angular (b), intercepto (a) e coeficiente de determinação (R^2), com nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$). Os critérios esperados foram resíduos normais, homocedásticos e independentes, no máximo 22% de *outliers*, regressão significativa, coeficiente de correlação maior que 0,99 e intercepto estatisticamente igual a zero (INTERNATIONAL, 2005; SOUZA, JUNQUEIRA, 2005. SOUZA, 2007. BRASIL, 2017).

Exatidão e precisão foram verificadas pelo método de fortificação do placebo com padrão, nas concentrações 0,5 ng/mL, 500 ng/mL e 1.000 ng/mL, preparadas de modo independente, em triplicata. A precisão foi estudada nos níveis de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão inter-dias). Na repetibilidade, as amostras foram avaliadas nas mesmas condições de operação, analista e instrumentação, em corrida única, enquanto a

precisão intermediária foi estudada no mesmo laboratório, mesmas condições de operação e mesma instrumentação, mas em dias e com analistas diferentes. Determinou-se a recuperação e desvio padrão relativo (DPR), admitindo-se recuperações entre 80-110% e DPR inferior a 11,0% para os dois maiores níveis de concentração e recuperação entre 40-120% e DPR inferior a 30,0% para o limite de quantificação (AOAC, 2016).

Os limites de detecção e quantificação foram estimados pelos parâmetros da curva analítica, utilizando-se coeficiente angular e desvio do coeficiente linear ou intercepto, e pela razão sinal:ruído, definida como, no mínimo, 2:1 para LD e 10:1 para LQ. Os resultados estimados para LQ foram confirmados pela determinação da exatidão e precisão na concentração encontrada, adotando-se os mesmos critérios discutidos no item anterior (INTERNATIONAL, 2005; BRASIL, 2017; AOAC, 2016).

Na robustez, um planejamento experimental fatorial fracionário 2^{5-1} , com ponto central, em triplicata, foi utilizado para se monitorar a influência dos fatores vazão da fase móvel [X1], proporção de fase aquosa [X2], concentração de aditivo [X3], marca de acetonitrila [X4] e lote da coluna cromatográfica [X5] na recuperação do analito. Os níveis e intervalos avaliados estão descritos na **Tabela 13**. Os resultados foram avaliados estatisticamente no *software* Statistica (StatSoft, Estados Unidos), com nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$), pelo diagrama de Pareto e por ANOVA.

Tabela 13 – Variáveis, níveis e matriz experimental de planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para avaliação da robustez.

Experimento	Variável				
	X1 (mL/min)	X2 (%)	X3 (mmol/L)	X4	X5
1	0,46 [-1]	6 [-1]	9 [-1]	-1	+1
2	0,50 [+1]	6 [-1]	9 [-1]	-1	-1
3	0,46 [-1]	8 [+1]	9 [-1]	-1	-1
4	0,50 [+1]	8 [+1]	9 [-1]	-1	+1
5	0,46 [-1]	6 [-1]	15 [+1]	-1	-1
6	0,50 [+1]	6 [-1]	15 [+1]	-1	+1
7	0,46 [-1]	8 [+1]	15 [+1]	-1	+1
8	0,50 [+1]	8 [+1]	15 [+1]	-1	-1
9	0,46 [-1]	6 [-1]	9 [-1]	+1	-1
10	0,50 [+1]	6 [-1]	9 [-1]	+1	+1
11	0,46 [-1]	8 [+1]	9 [-1]	+1	+1
12	0,50 [+1]	8 [+1]	9 [-1]	+1	-1
13	0,46 [-1]	6 [-1]	15 [+1]	+1	+1
14	0,50 [+1]	6 [-1]	15 [+1]	+1	-1
15	0,46 [-1]	8 [+1]	15 [+1]	+1	-1
16	0,50 [+1]	8 [+1]	15 [+1]	+1	+1
17	0,48 [0]	7 [0]	12 [0]	0	0
18	0,48 [0]	7 [0]	12 [0]	0	0
19	0,48 [0]	7 [0]	12 [0]	0	0

2.4.4 Determinação de eficiência de incorporação, teor e uniformidade de doses unitárias

Depois de desenvolvido e validado, o método foi aplicado para quantificar acetazolamida nos implantes intravítreos. A eficiência de incorporação do fármaco na matriz polimérica, durante o procedimento de síntese, foi avaliada para 10 unidades, que foram individualmente pesadas e transferidas para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, adicionou-se cerca de 8 mL de acetonitrila e submeteu-se ao ultrassom por 10 minutos. Pipetou-se 0,1 mL, adicionou-se 0,125 mL de solução de PI a 10.000 ng/mL e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL. Completou-se o volume com fase móvel, homogeneizou-se e filtrou-se para *vial*, analisando em triplicata. Os resultados de incorporação foram expressos como a razão da concentração encontrada pela concentração teórica, considerando-se o peso do implante intravítreo e a proporção esperada de fármaco na matriz, igual a 25% m/m. Estimou-se média e DPR (%) para as 10 unidades, admitindo-se DPR não maior que 5,0%. Este percentual de incorporação foi utilizado para se determinar a dose declarada de acetazolamida por unidade de implante, expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$.

No doseamento, 5 unidades dos implantes intravítreos foram pesadas e transferidas para balão volumétrico de 50 mL. Em seguida, adicionou-se cerca de 45 mL de acetonitrila e submeteu-se ao ultrassom, por 10 minutos. Completou-se o volume com o mesmo diluente e homogeneizou-se. Este procedimento foi feito em triplicata. Depois, efetuou-se o mesmo procedimento de diluição e fortificação com padrão interno descrito anteriormente, filtrou-se para *vial* e analisou-se em triplicata. Os resultados foram expressos como quantidade do fármaco no implante intravítreo, em $\mu\text{g}/\text{mg}$, e percentual em relação ao valor rotulado, determinado anteriormente. Determinou-se a média e o DPR (%), admitindo-se resultados compreendidos entre 90,0 a 110,0% do valor rotulado e não mais que 5,0% de DPR, especificações baseadas nas reportadas para implantes intravítreos registrados na ANVISA e disponíveis comercialmente, como o Ozurdex[®].

A uniformidade de doses unitárias foi realizada para 10 unidades conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 6^a edição (BRASIL, 2019), empregando-se o método uniformidade de conteúdo. Prepararam-se as amostras, individualmente, conforme procedimento realizado para eficiência de incorporação, filtrou-se para *vial*, analisou-se em triplicata e estimou-se a quantidade de fármaco nos implantes, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ e como percentual do valor rotulado. Posteriormente, calculou-se o valor de aceitação (VA), não se admitindo VA superior a 15,0%.

2.4.5 Perda de massa *in vitro* e absorção de água

Na avaliação *in vitro* da perda de massa e absorção de água, 5 unidades dos implantes intravítreos foram previamente pesadas, transferidas para frascos de penicilina, imersos em 20 mL de tampão fosfato-salina pH 7,4 e incubados a 37 °C, sob agitação a 150 rpm, por 42 dias. Em intervalos de tempo pré-determinados, os implantes intravítreos foram retirados do meio de incubação, o excesso de líquido na superfície foi removido por papel de filtro e cada unidade foi pesada, para registro do peso úmido. Depois, foram secos em dessecador a vácuo, a 25 °C, por 72 horas, e novamente pesados, para registro do peso seco final. Tanto a absorção de água, pelo peso úmido, quanto a perda de massa, pelo peso seco final, foram estimadas como a razão, em percentual, da redução ou aumento de massa em relação ao peso inicial, para cada unidade. Os resultados encontrados foram plotados em função do tempo.

2.4.6 *Estudo de liberação in vitro*

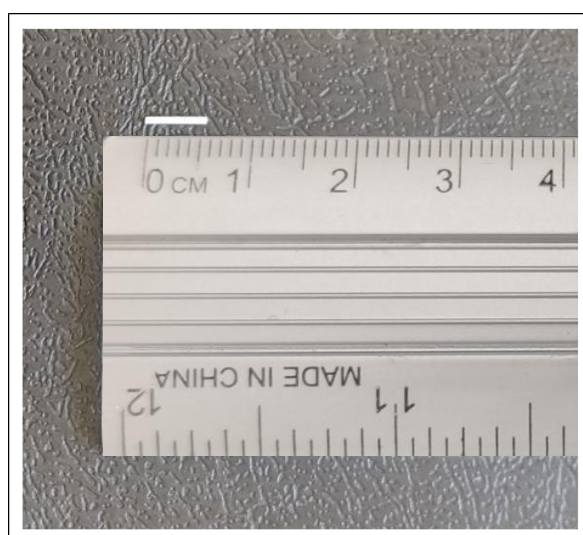
O perfil de liberação dos implantes intravítreos foi avaliado para 5 unidades a 37 °C, sob agitação constante de 150 rpm. Os implantes intravítreos, previamente pesados, foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL contendo 4 mL de tampão fosfato-salina pH 7,4. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, 0,5 mL de meio de incubação foram retirados, com reposição, filtrados para *vial* e analisados. O perfil de liberação foi avaliado como o percentual acumulado de acetazolamida liberada no meio de incubação durante 42 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento e síntese de implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

Os implantes intravítreos foram convenientemente produzidos na proporção e procedimento propostos, como já realizado em outros trabalhos no grupo de pesquisa (FIALHO *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2017; TOLEDO *et al.*, 2018). Apresentaram formato cilíndrico, com superfície lisa, uniforme e homogênea, cor branca e aspecto opaco, padronizados em comprimento e diâmetro, como apresentado na **Figura 5**. Em todos os lotes produzidos, houve uniformidade no aspecto e rendimento, sendo obtidos entre 65-70 unidades por lote, com rendimentos entre 82,6-88,9% em relação ao peso teórico esperado, considerando-se as massas pesadas para o insumo farmacêutico ativo e excipiente. Uma vez que o procedimento de manufatura é manual, estes rendimentos foram considerados satisfatórios e indicativos de que o processo pode ser escalonado para escala industrial, o que é imprescindível, porque o *scaling up* é fator limitante nos processos de transferência de produtos desenvolvidos em centros de pesquisa para as indústrias farmacêuticas. Todavia, outros pontos importantes devem ser ressaltados para produção em escala industrial desses dispositivos, como por exemplo o impacto do uso de acetona durante o processo produtivo no custo e toxicidade dos implantes produzidos. Neste contexto, o ensaio de determinação de solventes residuais deve ser mandatório.

Figura 5 – Fotografia de um implante intravítreo de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) contendo acetazolamida, de 5,0 mm por 0,45 mm, produzido por moldagem a quente.

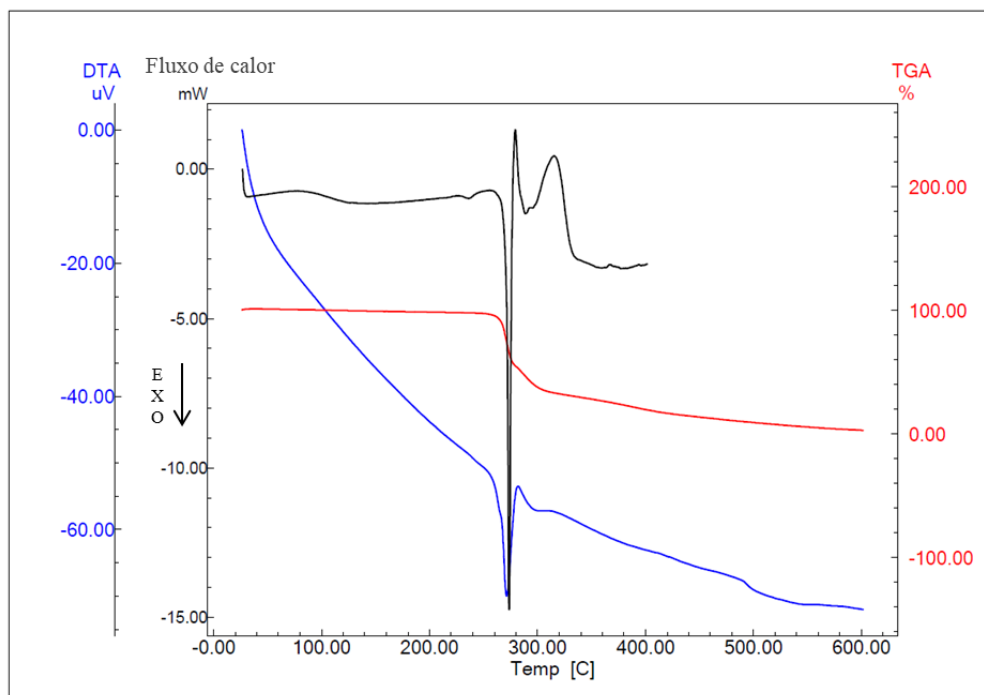


3.2 Estudos de compatibilidade fármaco-excipiente e caracterização físico-química dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

3.2.1 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

O comportamento térmico do fármaco, excipiente, misturas binárias e implantes intravítreos foi investigado por calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e análise térmica diferencial. Na **Figura 6**, encontram-se sobrepostas as curvas termoanalíticas obtidas para o fármaco acetazolamida. Na curva de calorimetria exploratória diferencial, podem ser observados dois picos, referentes a eventos endotérmicos. No primeiro evento, marcado por pico mais discreto, que se inicia em aproximadamente 230 °C, ocorre a conversão polimórfica do fármaco, do polimorfo I, mais estável, para o polimorfo II, metaestável, uma vez que se observa ganho energético. Buscando confirmar a hipótese proposta, o fármaco foi aquecido até temperatura superior a 230 °C, mas inferior àquela da sua decomposição, e mantido em isoterma por 10 minutos. O resíduo foi retirado e analisado posteriormente por difração de raios X.

Figura 6 – Curvas termoanalíticas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC, em preto), termogravimetria (TGA, em vermelho) e análise térmica diferencial (DTA, em azul) para investigação do comportamento térmico do fármaco acetazolamida, nas faixas de temperatura de 25 a 400°C (DSC) ou 25 a 600 °C (TGA/DTA), com evidência de eventos endotérmicos referentes aos processos de conversão polimórfica e fusão com decomposição.



No segundo e principal evento, verifica-se um pico mais agudo, intenso, estreito e fechado, com *Tonset* de 272,1 °C e variação de entalpia de 229 J/g, que, pelo formato característico do pico, decorre da fusão do fármaco. Este resultado difere ligeiramente dos reportados nos compêndios e literatura científica para ponto de fusão da acetazolamida, entre 259-262 °C (BRASIL, 2019; MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2011), o que pode ser explicado muito provavelmente em virtude da ocorrência simultânea de decomposição, após fusão, confirmada na curva de termogravimetria, o que dificulta uma observação mais precisa do ponto de fusão (ZHU *et al.*, 2021). Uma explicação adicional plausível é que, no geral, o ensaio é determinado com o polimorfo I, mais estável, que possui ponto de fusão ligeiramente menor que o polimorfo II (metaestável) (LATOSINSKA, LATOSINSKA, 2011). Outro ponto interessante a ser destacado é que o enorme ganho energético durante a fusão é forte indicativo de que o fármaco possui grande empacotamento e organização na rede cristalina, isto é, apresenta considerável cristalinidade (LANYI *et al.*, 2019).

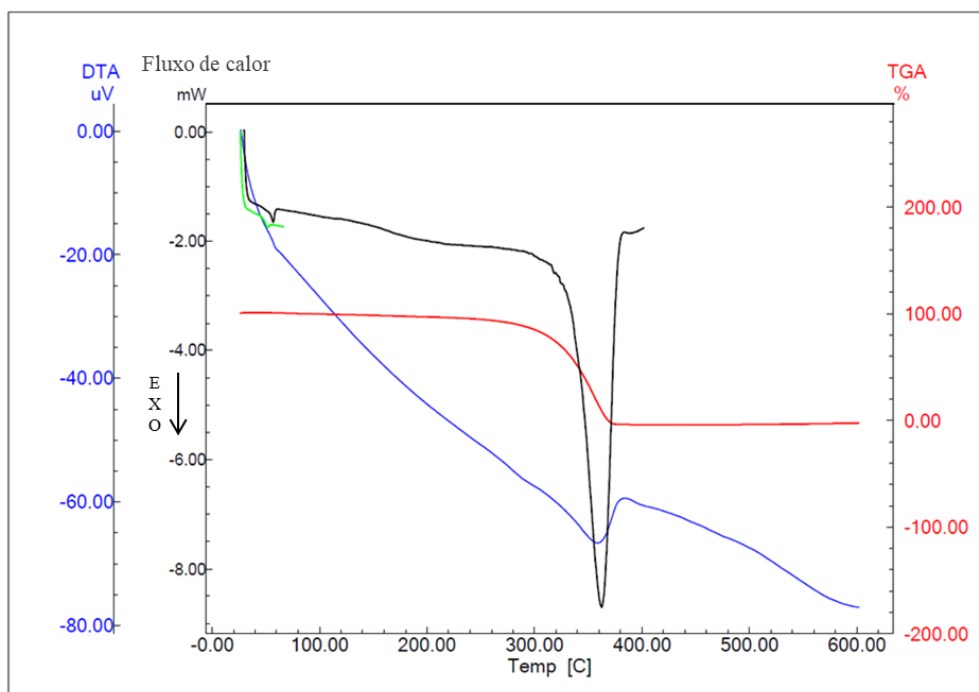
Na investigação por termogravimetria e análise térmica diferencial, observa-se que o fármaco se apresenta termicamente estável em temperaturas inferiores a 250 °C, com decomposição observável apenas com *Tonset* de 252 °C. O processo de decomposição ocorre em três etapas, representadas nas curvas pelas três diferentes inflexões. Na primeira etapa, acredita-se que ocorra liberação dos grupos de maior labilidade na estrutura, dióxido de enxofre (SO₂) e amina volátil (NH₂), com perda de massa de aproximadamente 36%. Em um segundo momento, que se inicia em 276 °C, ocorreria perda de monóxido de carbono (CO) e um grupo metila (CH₃), com perda de massa de cerca de 20%. Na última fase de decomposição, o anel, porção mais seria tável, é finalmente degradado, resultando em perda de massa final de cerca de 94%. O resíduo final corresponde ao resíduo carbonizado, que pode ser evidenciado visivelmente no cadinho. Todas as perdas de massa observadas foram condizentes com as modificações esperadas na estrutura, por dedução química e são corroborados pelos estudos para avaliação da compatibilidade entre acetazolamida e diversos excipientes publicados (ROJEK, WESOŁOWSKI, 2018).

Curvas termoanalíticas para o estudo do comportamento térmico do excipiente ácido polilático-co-glicólico estão apresentadas na **Figura 7**. Na curva por calorimetria exploratória diferencial, dois picos foram observados, referentes aos eventos endotérmicos. O primeiro, mais sutil, ocorrido em 49,66 °C, com variação de entalpia de 3,6 J/g, representa a temperatura de transição vítrea (T_g). Este parâmetro foi determinado apenas após correção do histórico térmico do polímero, que elimina desordens na matriz polimérica, decorrentes do procedimento de síntese, que pudessem provocar flutuações no fluxo de calor e interferir na visualização do evento. O procedimento promove alinhamento e reorganização da matriz polimérica, permitindo mensuração correta. O segundo pico, intenso e bastante alargado, refere-se ao processo de decomposição, ocorrido em uma única fase, a partir de 245 °C, com perda de massa final de aproximadamente 98%. É importante ressaltar que o polímero se decompõe sem se fundir. Os resultados encontrados estão em consonância com os resultados obtidos em outros trabalhos (MAKADIA, SIEGEL, 2011).

Portanto, confirma-se que a temperatura utilizada para produção dos implantes (65 °C) foi adequada, uma vez que supera a temperatura de transição vítrea, mas distancia-se das temperaturas de instabilidade térmica. Na produção de implantes intravítreos por moldagem a quente, a temperatura empregada deve sempre ser obrigatoriamente maior que a transição vítrea, pois apenas assim assegura-se que a matriz polimérica adquirirá propriedades plásticas

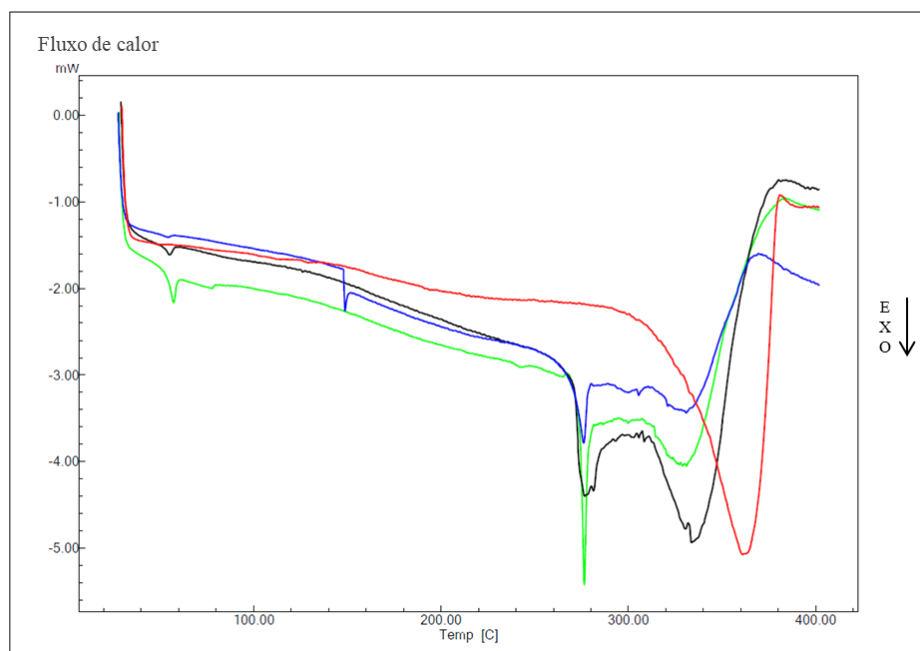
e elásticas necessárias, mostrando-se em estado mais maleável e moldável que não só permite seu molde, como favorece a incorporação, com mais homogeneidade, do fármaco.

Figura 7 – Curvas termoanalíticas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC, em preto ou em verde, para curva obtida depois de limpeza do histórico térmico), termogravimetria (TGA, em vermelho) e análise térmica diferencial (DTA, em azul) para investigação do comportamento térmico do ácido polilático-co-glicólico (PLGA), nas faixas de temperatura de 25 a 400°C (DSC) ou 25 a 600 °C (TGA/DTA), com evidência de eventos endotérmicos referentes aos processos de transição vítrea e decomposição.



Sobreposições das curvas termoanalíticas, obtidas por calorimetria exploratória diferencial, para mistura binária, liófilo, implantes intravítreos contendo acetazolamida e implantes intravítreos brancos, estão demonstradas na **Figura 8**. A incorporação da acetazolamida nos implantes intravítreos foi confirmada, uma vez que o pico endotérmico, referente a sua fusão com decomposição, com *T_{onset}* em 267,9 °C, *T_{máximo}* em 272,8 °C e variação de entalpia de 3,35 J/g, encontra-se presente na curva termoanalítica referente ao implante contendo o fármaco, mas ausente nos implantes intravítreos produzidos sem fármaco. Nos implantes intravítreos brancos, observa-se comportamento térmico idêntico ao perfil para polímero, discutido anteriormente.

Figura 8 – Sobreposição de curvas termoanalíticas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) para mistura binária (em verde), líófilo (em preto), implante intravítreo (em azul) e implante intravítreo branco (em vermelho), com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e ausência de incompatibilidade físico-química entre fármaco e ácido polilático-co-glicólico (PLGA).



Nas curvas, percebe-se que o primeiro pico endotérmico, decorrente de conversão polimórfica do fármaco, se faz presente apenas na mistura binária, mas não no líófilo ou nos implantes intravítreos. Ademais, o pico endotérmico principal, que foi agudo, intenso e estreito no fármaco e na mistura física, encontra-se menos intenso, mais irregular e mais largo depois da liofilização. Normalmente, alterações na intensidade e/ou perfil dos picos são indícios de incompatibilidade físico-química (CHADHA, BHANDARI, 2013). Entretanto, como não se observou nenhuma modificação no comportamento térmico na mistura binária, pode-se concluir que acetazolamida e o ácido polilático-co-glicólico são compatíveis.

Propõe-se que o que ocorre nesse caso é o processo de amorfização ou perda de cristalinidade do fármaco durante sua liofilização, com formação de entidade menos cristalina, que são observadas nos perfis de comportamento térmico encontrados para líófilo e implantes intravítreos, como discutido anteriormente em outro trabalho do grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2018). Sabe-se que a liofilização, por combinar um ambiente a vácuo e exposição prolongada, é capaz de modificar significativamente a estrutura e as propriedades termodinâmicas dos materiais no estado sólido, porque provoca enorme desarranjo na célula

unitária e desorganização na rede cristalina. Entretanto, a amorfização é benéfica, pois o fármaco na forma amorfa é muito mais facilmente incorporado na matriz polimérica, formando uma mistura mais homogênea. Também, a amorfização é favorável em sistemas de liberação, pois o aumento no grau de desordenamento espacial facilita a difusão do fármaco, com menor requerimento de energia, influenciando positivamente nas suas propriedades biofarmacêuticas. Esses resultados foram corroborados pelos resultados da análise por difração de raios X, como discutido posteriormente, similarmente aos resultados divulgados por Arioglu-Tuncil *et al.* (2020), em estudo com cloridrato de tiamina.

Esse processo de amorfização parece ser parcialmente revertido durante a moldagem dos implantes intravítreos, uma vez que é perceptível que, na curva termoanalítica dos implantes intravítreos, o pico para fusão da acetazolamida é um pouco mais agudo, estreito e regular. Sugere-se, portanto, que durante esta fase, restaura-se moderadamente a entalpia e entropia e promove-se certo reordenamento no sistema, em virtude da recristalização parcial do fármaco, embora o formato do pico do evento possa estar associado ao fármaco não-incorporado, superficialmente presente no dispositivo intravítreo.

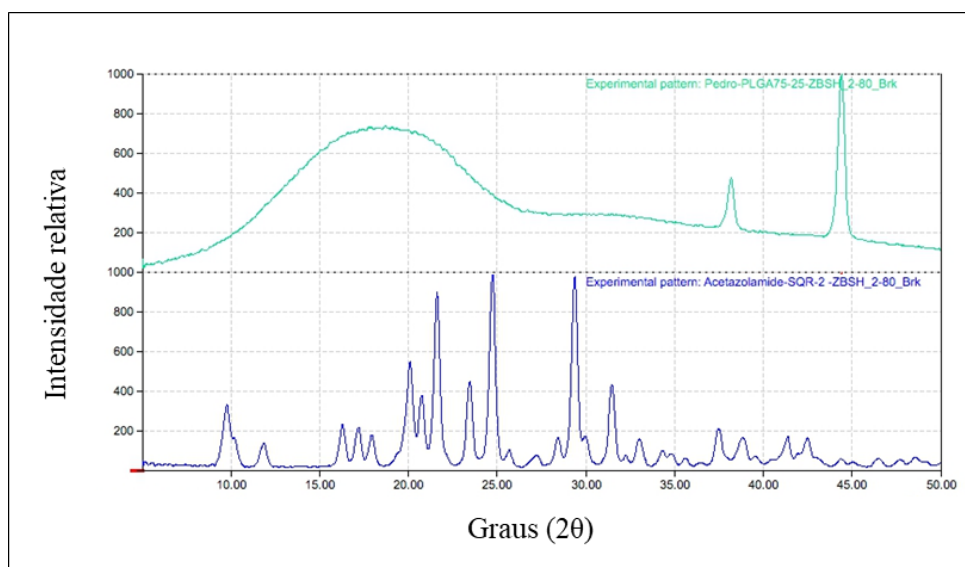
Nota-se ainda desvio para a esquerda, para temperaturas menores, do pico associado à decomposição do ácido polilático-co-glicólico nas amostras contendo o fármaco, mas as mudanças observadas não são significativas, por ocorrerem após a fusão do fármaco. O fármaco é quem governa a cristalinidade do sistema e, uma vez que se funde e se decompõe, desordena todo o estado sólido, influenciando no comportamento térmico e no fluxo de calor. Nos implantes intravítreos, não foi possível observar pico relativo à transição vítrea do polímero, próximo a 50 °C, mas vê-se pico muito mais agudo e estreito, deslocado para *Tonset* de 147,8 °C, mesmo sem exclusão prévia do histórico térmico. Este resultado demonstra a influência da notável cristalinidade do fármaco no arranjo tridimensional das cadeias poliméricas lineares, cuja presença provoca maior dificuldade de movimento, sendo, portanto, mais uma prova de que o fármaco foi devidamente incorporado. Deve-se ressaltar ainda que o aumento na temperatura de transição vítrea é vantajoso porque impacta no perfil de absorção de água pela matriz polimérica, causando uma diminuição na capacidade do dispositivo em absorver água, retardando a liberação do fármaco e propiciando um perfil de liberação mais sustentado, como desejável.

O importante é confirmar que, até sua decomposição, nas temperaturas de manufatura, estabilidade e armazenamento dos dispositivos, não foram observados resultados para refutar a compatibilidade fármaco-excipiente.

3.2.2 Difração de raios X

Difratogramas obtidos para fármaco e polímero são apresentados na **Figura 9**. Nesta figura, pode-se observar a característica amorfa dos polímeros, em virtude da ausência de picos indicativos de cristalinidade, uma vez que os dois picos, muito intensos, encontrados no final do difratograma para o ácido polilático-co-glicólico devem-se a interferentes do porta-amostra de alumínio. Em contrapartida, a acetazolamida mostrou cristalinidade considerável, como se percebe pelos inúmeros picos de grande intensidade observados no seu difratograma, o que corrobora os resultados discutidos anteriormente, como a grande variação entálpica reportada para sua fusão, durante estudo do comportamento térmico.

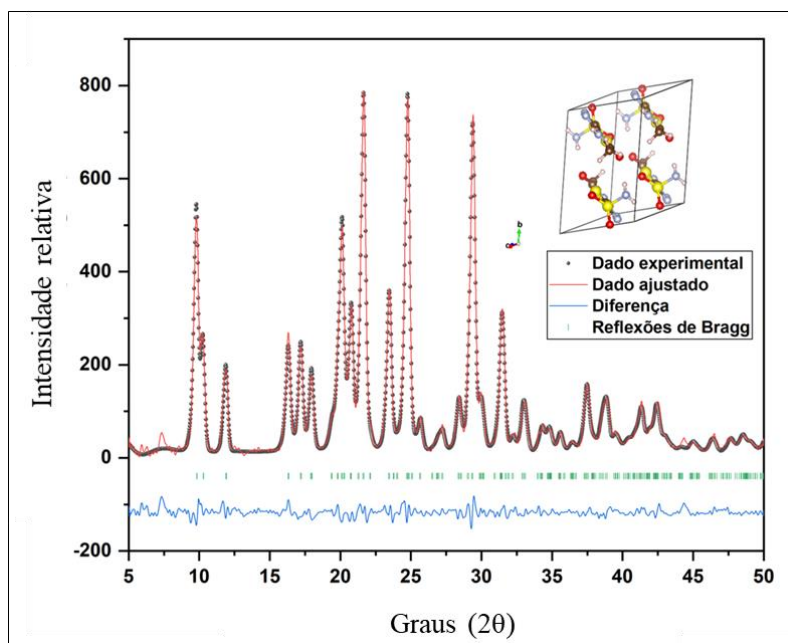
Figura 9 – Difratogramas obtidos para o ácido polilático-co-glicólico (PLGA, parte superior) e para o fármaco acetazolamida (parte inferior), com evidência de estrutura amorfa para o polímero e estrutura cristalina para o fármaco.



Os valores em graus 2θ observados experimentalmente para o fármaco foram comparados com os dados ajustados, previstos pela Lei de Bragg, conforme apresentado na **Figura 10**, que inclui ainda, em destaque, representação para a célula unitária do cristal de acetazolamida, com $z = 4$. Pode-se confirmar que o insumo farmacêutico usado na produção dos implantes intravítreos encontra-se como polimorfo I do fármaco, com reflexões intensas nos ângulos $9,8^\circ$; $20,1^\circ$; $21,6^\circ$; $24,7^\circ$ e $29,3^\circ$ (2θ). Os parâmetros de rede ajustados da acetazolamida polimorfo I, pelo método de Rietveld são tipo de rede triclinica, grupo espacial P-1, a (Å) 5.31621 ± 0.00089 , b (Å) 9.06289 ± 0.00158 , c (Å) 9.43953 ± 0.00163 , α ($^\circ$) 105.48317 ± 0.00730 , β ($^\circ$) 98.62015 ± 0.00528 , γ ($^\circ$) 100.38875 ± 0.00759 , $R_w = 10,76\%$, indicativo de refinamento adequado ($R_w \leq 15\%$) (MCCUSKER *et al.*, 1999). Contudo, pelas diferenças observadas em certos trechos do difratograma, conclui-se que, ainda que de forma residual, o polimorfo II faz-se presente.

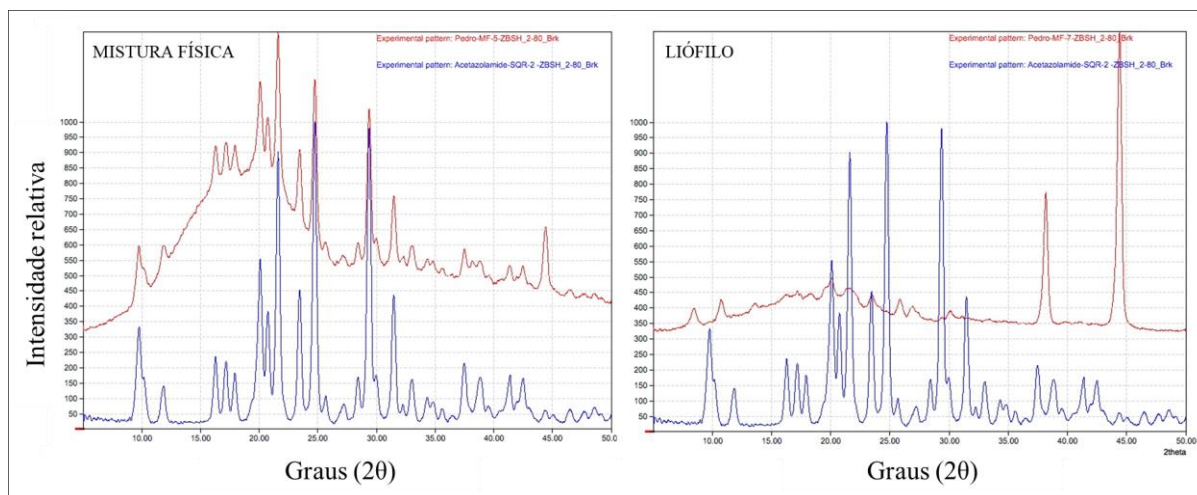
A difração de raios X do resíduo do fármaco, após aquecimento a 250°C , a 5°C por minuto, e manutenção em isoterma por 10 minutos, antes da decomposição, gerou difratograma inteiramente distinto do observado para o polimorfo I, confirmando que o fármaco sofre conversão polimórfica termodinâmica, depois de 230°C , como especulado na seção anterior. No entanto, como os implantes intravítreos são produzidos em temperaturas muito inferiores, encontra-se, na sua composição, o polimorfo I.

Figura 10 – Sobreposição entre dados experimentais (em preto, linha pontilhada) e dados ajustados (em vermelho, linha inteira), para identificação da forma polimórfica I do fármaco acetazolamida presente no insumo farmacêutico ativo utilizado na síntese dos implantes intravítreos.



Tanto no difratograma para a mistura binária quanto para o liófilo, dispostos na **Figura 11**, notam-se picos referentes ao fármaco, como esperado. Todavia, na mistura após liofilização, observou-se diminuição na intensidade dos picos, o que certifica que, de fato, o processo faz com que a acetazolamida se amorfize, como discutido anteriormente. Novamente, a atenuação na intensidade dos picos, mesmo que repercuta nas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas do fármaco, não significa necessariamente que fármaco e excipiente são incompatíveis.

Figura 11 – Difratogramas obtidos para a mistura binária (parte esquerda) e líófilo (parte direita), comparados ao fármaco acetazolamida (em azul), com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e sugestivo processo de perda de cristalinidade e amorfização induzido durante a liofilização.

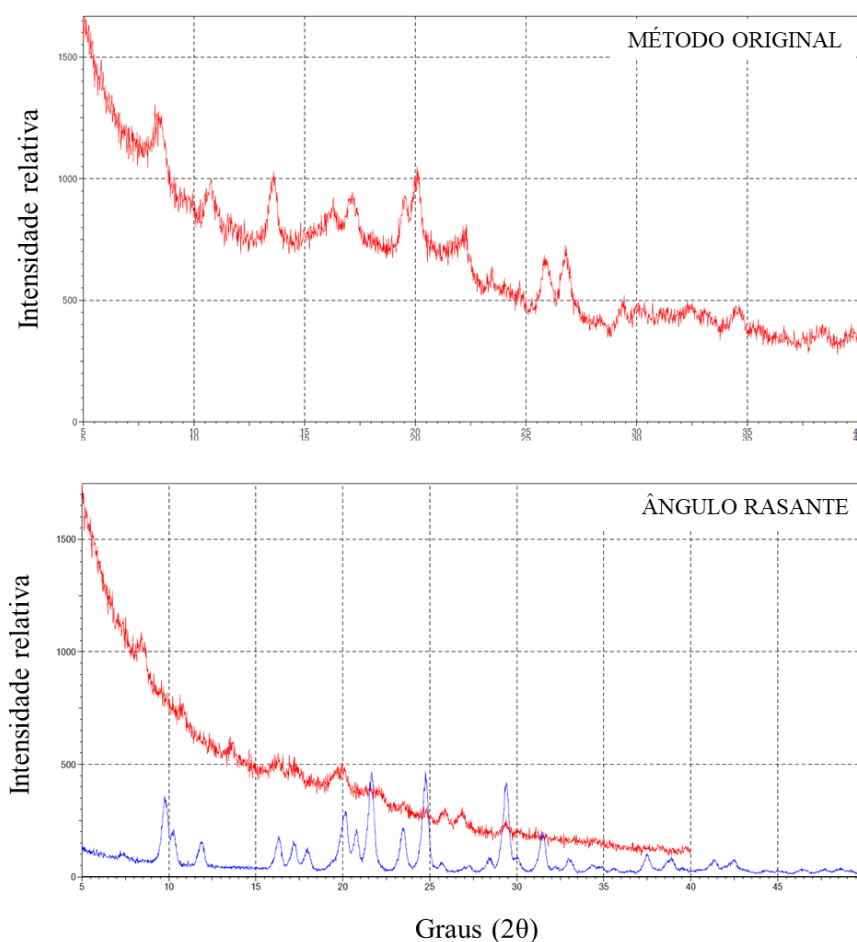


Não foi observado nenhum pico nos difratogramas dos implantes intravítreos brancos, como se esperava, mas nos difratogramas para os implantes intravítreos contendo acetazolamida, obtidos pelo método original ou por dispersão de raios X de pequeno ângulo com incidência rasante ou filme fino, a visualização dos picos permite certificar que o fármaco foi adequadamente incorporado. Observa-se, no primeiro difratograma da **Figura 12**, que a intensidade dos picos obtidos com o implante intravítreo é maior que as intensidades obtidas com o líófilo, mas razoavelmente menor que as obtidas para a mistura binária, permitindo-nos concluir que realmente o processo de moldagem a 65 °C contribui para recristalização, mesmo que parcial, do fármaco. Esse difratograma retrata a matriz polimérica como um todo, uma vez que o feixe atravessa a amostra. O segundo difratograma, disposto na mesma figura, que foi adquirido em filme fino, propicia uma investigação mais superficial dos dispositivos intravítreos. São observados picos referentes ao fármaco, mas apenas resquícios, pois os sinais são claramente menores. Assim, pode-se afirmar que quantidade consideravelmente menor do fármaco encontra-se na superfície dos implantes intraoculares.

Em outras palavras, a comparação entre os difratogramas obtidos para a mesma amostra, mas com protocolos e objetivos diferentes, demonstra que a maior parte do fármaco presente nos implantes intravítreos encontra-se no seu interior, não na superfície, demonstrando mais uma vez, inequivocamente, a eficiência do procedimento de preparo na incorporação do fármaco.

Esse perfil pode ser desejável, especialmente para se prevenir um *burst* na liberação do fármaco, assegurando perfil de liberação sustentado.

Figura 12 – Difratomogramas obtidos para o implante intravítreo, pelo método original e por dispersão de raios X de pequeno ângulo com incidência rasante, com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e pequena incidência de adesão de fármaco na superfície dos dispositivos.



3.2.3 Espectrofotometria na região do infravermelho por transformada de Fourier

Espectros de absorção no infravermelho, obtidos por transformada de Fourier, para acetazolamida, ácido polilático-co-glicólico, mistura física e implante intravítreo contendo fármaco ou não estão apresentados na **Figura 13**. Não foram obtidos espectros para o liófilo, uma vez que sua pulverização, necessária para a análise, não foi possível. Previamente, o espectro do insumo farmacêutico ativo foi comparado com o espectro da substância química

de referência, encontrando-se máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas. As bandas de absorção mais relevantes e suas respectivas atribuições, para fármaco e excipiente, estão descritas nas **Tabelas 14 e 15**, respectivamente.

Figura 13 – Espectros de absorção no infravermelho obtidos para o fármaco acetazolamida (IFA, em preto), ácido polilático-co-glicólico (PLGA, em vermelho), mistura binária (MF, em azul), implantes intravítreos (I-ACZ, em verde) e implantes intravítreos brancos (I-BR, em roxo), com evidência de incorporação do fármaco na matriz polimérica e ausência de incompatibilidade físico-química entre fármaco e ácido polilático-co-glicólico (PLGA)

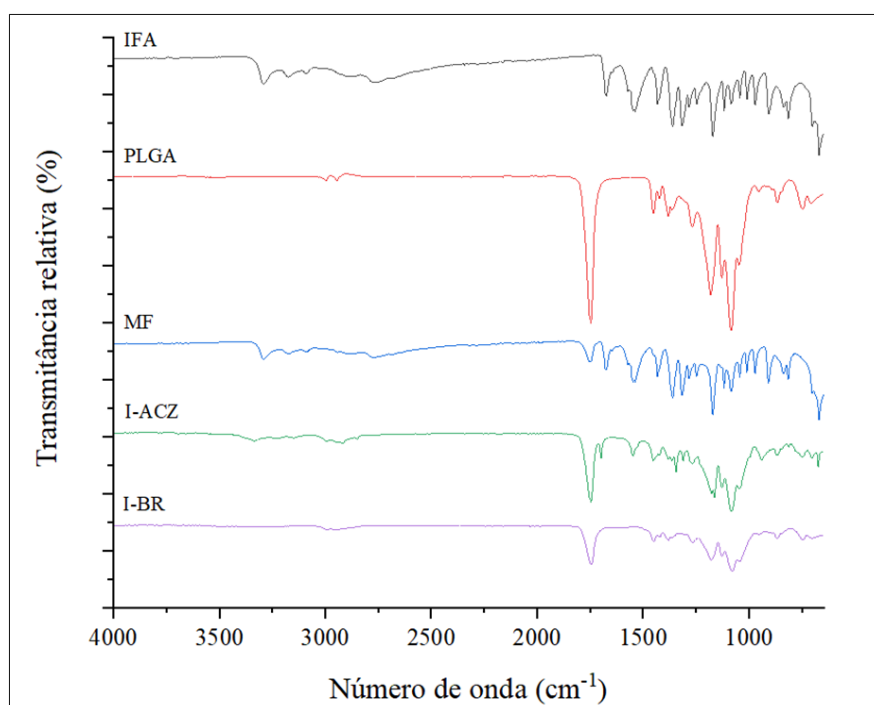


Tabela 14 – Bandas de absorção e respectivas atribuições para o fármaco acetazolamida

Banda de absorção	Atribuição
3294 [f]	Estiramento assimétrico N–H (NH ₂ SO ₂)
3175 [m]	Estiramento simétrico N–H (NH ₂ SO ₂)
3089 [fr]	Estiramento N–H (RCONH)
2980 [o], 2940 [o], 2890 [fr/a]	Estiramento CH ₃
2770 [m/a]	Estiramento N–H no anel
1675 [f]	Estiramento C=O (amida I)
1573 [o]	Deformação axial N–H no plano
1548 [mf], 1537 [o]	Estiramento assimétrico C=N no anel
1435 [m]	Estiramento simétrico C=N + deformação angular assimétrica CH ₃
1362 [mf]	Estiramento assimétrico SO ₂
1319 [mf]	Estiramento assimétrico C–N–C
1285 [m]	Estiramento C–N no anel
1250 [m]	Estiramento C–C
1173 [mf]	Estiramento simétrico SO ₂
1120 [m]	Deformação angular CNNC no plano
1087 [m], 1045 [m], 1012 [m]	Deformação e vibração no anel 1,3,4-tiadiazólico
973 [m]	Estiramento N–N
911 [f]	Estiramento S–N
838 [m], 817 [m]	Deformação e vibração no anel 1,3,4-tiadiazólico
703 [m]	Estiramento assimétrico C–S no anel
672 [f]	Estiramento simétrico C–S no anel

a: alargada – f: forte – fr: fraca – m: média – mf: muito forte – o: ombro

Tabela 15 – Bandas de absorção e respectivas atribuições para o excipiente ácido polilático-co-glicólico

Banda de absorção	Atribuição
3450-3500	Estiramento O–H
2947, 2992	Estiramentos C–H
1748	Estiramento C=O
1183, 1085	Estiramento C–O
1454, 1424, 1382, 1270, 1130, 1048, 956, 868	Deformações angulares C–H

Tanto no espectro do copolímero quanto no espectro do implante intravítreo branco, foram observadas bandas de absorção características do ácido polilático-co-glicólico, referentes aos grupos carbonila dos ésteres e aos grupos metila, nas mesmas posições, conforme apresentado na **Tabela 14**, resultados que foram semelhantes aos reportados para o excipiente em estudos do nosso e dos outros grupos de pesquisa, como Saliba *et al.* (2012), Soares *et al.* (2017), Vieira *et al.* (2020) e Toledo *et al.* (2020). Todos estes picos mais importantes para identificação do copolímero, como esperado, foram encontrados nas mesmas posições na mistura física e no implante intravítreo contendo o fármaco.

Bandas de absorção mais relevantes foram encontradas, nas mesmas posições, nos espectros do insumo farmacêutico ativo, mistura física e implante intravítreo, permitindo identificar grupos funcionais característicos da acetazolamida e outras sulfonamidas, como deformações no anel 1,3,4-tiadiazólico, estiramentos e deformações angulares do grupo amida e estiramentos simétrico e assimétrico do grupo sulfonamida.

Especialmente no implante intravítreo, percebeu-se sobreposição de bandas de absorção do fármaco e do ácido polilático-co-glicólico, o que, entretanto, não impediu a caracterização inequívoca de ambos nos sistemas. Também nesse produto, houve marcante diminuição nas intensidades das bandas de absorção, mesmo das principais. No geral, a diminuição das intensidades das bandas de absorção no infravermelho pode significar incompatibilidade física ou química entre fármaco e excipiente. Entretanto, observou-se que o mesmo problema foi observado com a amostra branca, de modo que esse comportamento parece estar mais relacionado com a limitação do método utilizado do que com qualquer interação não-desejável.

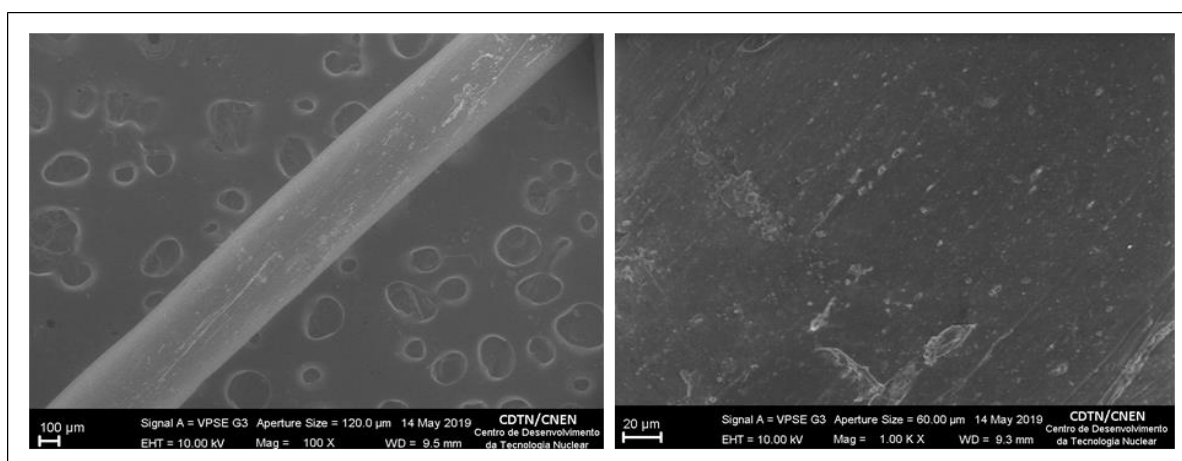
No método de reflectância total atenuada, as amostras são analisadas em estado sólido, na forma de pós, diretamente, sem nenhum preparo prévio. Desse modo, a mistura física liofilizada e os implantes intravítreos precisaram ser pulverizados antes de serem adicionados ao equipamento. Todavia, a pulverização desses materiais, por suas características físico-químicas, foi muito difícil e pouco eficaz, o que pode ter influenciado na obtenção do espectro de absorção no infravermelho. Faz-se imprescindível, portanto, que novos espectros no infravermelho sejam obtidos para essas amostras, utilizando modo de análise mais apropriado para sua natureza.

De todo modo, as proporções relativas entre as bandas de absorção foram mantidas e a mistura física preservou o mesmo perfil e intensidades observadas para o fármaco sozinho. Uma vez que não houve desaparecimento ou deslocamento significativo das bandas de absorção, pode-se concluir que o fármaco foi suficientemente incorporado na matriz polimérica e que a mistura física não proporciona interações físico-químicas entre fármaco e excipiente, corroborando com os resultados anteriores sobre a compatibilidade entre fármaco e excipiente.

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva

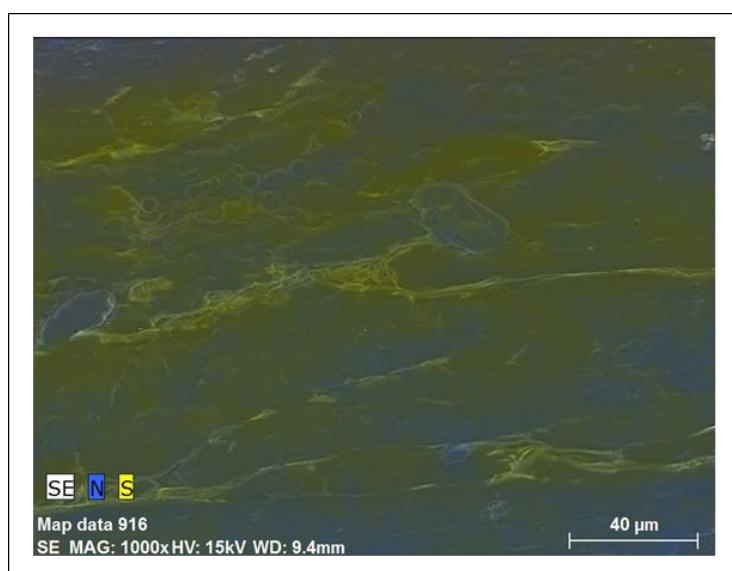
A microscopia eletrônica de varredura foi combinada com espectroscopia de energia dispersiva de raios X para caracterização físico-química dos implantes intravítreos com acetazolamida. Nas micrografias apresentadas na **Figura 14**, nas magnitudes de 100 e 1000 vezes, foram observados detalhes da topografia geral dos dispositivos, como aspecto e tamanho. Pode-se confirmar que os implantes intravítreos possuem formato de bastonetes cilíndricos, de cerca de 5 mm de comprimento, com superfície lisa, regular, densa e morfologicamente homogênea, sem evidência de poros, canais ou outros caminhos preferenciais. No aumento de 1000 vezes, percebe-se organização em camadas das cadeias poliméricas, comum para sistemas de liberação matriciais ou monolíticos, dos quais se espera uma liberação constante do fármaco a partir das multicamadas. Também pode-se observar a presença de resquícios de cristais de acetazolamida, que não foram incorporados durante a síntese, aderidos na superfície dos implantes, que provavelmente resultarão em uma liberação maior ou *burst* do fármaco nos primeiros minutos ou horas do perfil de liberação *in vitro* ou *in vivo*. Este perfil se justifica pois o processo de produção dos implantes foi manual, não mecanizado, o que causa alguma heterogeneidade ao sistema.

Figura 14 – Micrografias obtidas nas magnitudes de 100 (parte esquerda) e 1000x (parte direita), para os implantes intravítreos contendo acetazolamida, com evidência de aspecto cilíndrico, superfície lisa e uniforme e organização em multicamadas, com pequena incidência de cristais do fármaco aderidos na superfície dos dispositivos.



Na espectroscopia por energia dispersiva de raios X, faz-se mapeamento superficial, em função do número atômico, atribuindo-se, nas imagens, uma cor diferente para cada número atômico. Uma vez que cada elemento químico possui uma assinatura única de absorção e emissão. Uma vez que o ácido polilático-co-glicólico é composto apenas por carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), foi possível monitorar a presença do fármaco nos implantes pelo mapeamento de elementos químicos diferenciados de sua estrutura, como nitrogênio (N) e enxofre (S). Na **Figura 15**, observa-se uniformidade na distribuição das colorações amarela e azul, referentes ao enxofre e nitrogênio respectivamente, na micrografia dos dispositivos intravítreos. Desse modo, conclui-se que o fármaco foi incorporado na matriz polimérica e, mais do que isso, que possui distribuição relativamente homogênea, característica que pode influenciar positivamente no perfil de liberação do fármaco a partir dos implantes.

Figura 15 – Mapa elementar obtido por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para os implantes intravítreos, com mapeamento elementar de enxofre (S, em amarelo) e nitrogênio (N, em azul) para monitoramento do fármaco acetazolamida com evidência de homogeneidade na distribuição do fármaco na matriz polimérica.



3.3 Estudos de estabilidade do insumo farmacêutico e dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

3.3.1 Desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplado à detecção por ultravioleta (CLAE-UV) para quantificação de acetazolamida, impurezas e produtos de degradação em insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreos

No desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, notou-se que não haviam disponíveis métodos cromatográficos para doseamento ou para quantificação de impurezas na monografia do insumo farmacêutico ativo presente na Farmacopeia Brasileira 6ª edição, na qual são propostos o uso de volumetria e cromatografia em camada delgada para a realização desses testes, respectivamente. Por isso, fez-se pesquisa bibliográfica preliminar, que orientasse a escolha dos parâmetros cromatográficos.

Na maioria dos métodos disponíveis nos estudos científicos, empregou-se sílica quimicamente liga a grupo octadecilsilano (C18) como fase estacionária. Nos estudos preliminares, percebeu-se que, na cromatografia de fase reversa com C18, o analito ficava fracamente retido na coluna cromatográfica, mesmo no gradiente exploratório e, ainda, sob proporções superiores a 85% de fase aquosa na fase móvel. Observou-se, ainda, que não havia resolução suficiente entre analito, produtos de degradação, impurezas de síntese e outros interferentes nas amostras mais críticas do estudo de degradação forçada. Nos métodos farmacopeicos, entretanto, fases estacionárias diferentes, com polaridade intermediária, foram propostas. Na indisponibilidade da coluna utilizada pela Farmacopeia Europeia, testou-se como fase estacionária cianopropil, como nos métodos desenvolvidos pela Farmacopeia Americana (UNITED STATES, 2021) e por Chinta *et al.* (2022). O perfil cromatográfico foi consideravelmente melhor quando se usou cianopropil que, por isso, foi escolhida como fase estacionária. A redução do tamanho de partícula de 5 µm para 3,5 µm teve efeito favorável na separação dos picos, como melhor resolução e afinamento de picos, e foi escolhida.

No método farmacopeico, a fase móvel utilizada é composta por mistura de tampão fosfato de potássio e metanol, na proporção de 90:10 v/v, por eluição isocrática. O método foi reprodutível, permitindo separação suficiente entre o analito e seus produtos de degradação,

mas dois problemas puderam ser identificados: fase móvel incompatível com espectrometria de massas e corridas muito demoradas, de aproximadamente 40 minutos. Uma vez que se pretendia, em etapa posterior, identificar e elucidar estruturalmente os produtos de degradação encontrados, era imprescindível que a fase móvel contivesse somente aditivos voláteis, para que pudesse ser usada, sem necessidade de desenvolver um novo método. Chinta *et al.* (2022), por sua vez, controlaram o pH da fase móvel com ácido fosfórico, mas o método, desenvolvido para cápsulas, não se reproduziu para as misturas binárias contendo ácido polilático-co-glicólico, uma vez que não houve resolução entre os picos do analito e interferentes e os picos, no geral, eram assimétricos. Além disso, embora compatível com espectrometria de massas, o ácido fosfórico não é recomendado por ser pouco volátil, apresentando ponto de ebulição de 158 °C.

Diferentes aditivos foram testados e resultados mais promissores foram obtidos com ácido trifluoroacético (TFA), na concentração usual de 0,1% v/v, que era suficiente não só para manter o pH da fase móvel controlado, como funcionava como um pareador iônico, aumentando a retenção de analito e produtos de degradação e produzindo picos mais finos e com maior razão sinal:ruído, com impacto positivo para a separação cromatográfica e detectabilidade do método. Para o desenvolvimeto do método indicativo de estabilidade, foi necessário realizar, em paralelo, estudo de degradação forçada. Foi necessário conhecer o perfil de degradação nas diferentes condições de degradação para otimizar o método cromatográfico e maiores detalhes deste estudo serão apresentados adiante, em seção própria.

No desenvolvimento, observou-se ainda que, diferentemente do proposto nos métodos discutidos, a acetonitrila promoveu separações mais seletivas, com menor interferência e maior resolução entre os picos, sem contar outros impactos positivos na detectabilidade, pela menor interferência, menor valor de cutoff no ultravioleta (190 nm), no formato dos picos, na vida útil da coluna, pelas menores pressões operacionais no seu uso, na força eluotrópica, produzindo corridas mais curtas e na segurança dos analistas.

Desse modo, decidiu-se que a fase móvel se constituiria por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1%. Em seguida, outros parâmetros cromatográficos, como temperatura, volume de injeção, proporção inicial e final de fase orgânica na fase móvel e gradiente, foram otimizados por ajustes finos, visando aumentar a seletividade do método, sem prolongar desnecessariamente a corrida. Uma modificação decisiva foi reduzir o volume de injeção de 20 para 10 µL, que repercutiu em afinamento e mais simetria no pico do analito no método de

substâncias relacionadas. De modo geral, a temperatura foi o parâmetro menos influente. A eluição foi mantida por gradiente, considerando a ampla variação de polaridade, mas duas rampas ou inclinações foram necessárias. No início, propôs-se uma variação mais gradual e lenta na composição da fase móvel, para assegurar resolução entre os picos, até a eluição do analito, mas depois, aumentou-se a inclinação da rampa, para eluir produtos de degradação menos polares e interferentes, reduzindo o tempo de corrida.

Todas as amostras do insumo farmacêutico ativo, misturas binárias e excipientes, degradadas ou não, foram monitoradas nos comprimentos de onda 220 nm, 254 nm, como reportado nos métodos disponíveis, 265 nm, comprimento máximo de absorção no ultravioleta para a acetazolamida em meio ácido, e 280 nm. Em 254 nm e 265 nm foi identificado maior número de produtos de degradação, sendo que todos os produtos de degradação observados nos outros comprimentos de onda foram também observados nestes comprimentos de onda. Entre eles, 265 nm demonstrou-se mais sensível para o analito. Em relação aos produtos de degradação, alguns absorveram mais em 254 nm, mas outros em 265 nm. Contudo, um melhor balanço de massas foi obtido em 265 nm, portanto, este foi definido como comprimento de onda de análise do método desenvolvido.

As condições cromatográficas otimizadas para o método indicativo de estabilidade estão descritas na **Tabela 16**, enquanto parâmetros do gradiente encontram-se apresentados na **Tabela 17**. Um único método provou-se aplicável para o doseamento da acetazolamida e para a determinação de substâncias relacionadas, mas em faixas de concentração diferentes, como discutido posteriormente. Nos métodos, a acetazolamida eluiu no tempo de retenção de, aproximadamente, 4,8 minutos.

Tabela 16 – Condições cromatográficas para métodos indicativos de estabilidade para doseamento e substâncias relacionadas

Parâmetro	Condição
Coluna cromatográfica	Zorbax-CN 150 x 4,6 mm, 3,5 µm
Fase móvel	Ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila
Eluição	Gradiente
Temperatura	25 °C
Vazão de fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda	265 nm
Tempo de corrida	15 min

CN: cianopropil

Tabela 17 – Gradiente para métodos indicativos de estabilidade para teor e substâncias relacionadas

Tempo (min)	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0	95	5
5	80	20
12	5	95
12,5	95	5
15	95	5

3.3.2 Validação do método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplado à detecção por ultravioleta (CLAE-UV) para quantificação de acetazolamida, impurezas e produtos de degradação em insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreos

Os métodos desenvolvidos para doseamento e substâncias relacionadas foram validados conforme a RDC nº. 166/2017 e guias de validação internacionais.

3.3.2.1 Seletividade

A seletividade foi comprovada uma vez que nos cromatogramas do diluente e placebo não foram observados picos nos tempos de retenção referentes ao analito ou aos produtos de degradação relevantes. No cromatograma do ácido polilático-co-glicólico, obtido com o método de doseamento, um pico interferente, no tempo de retenção da acetazolamida, foi relatado, mas sua área foi menor que 0,5% da encontrada para o analito na amostra controle, sendo considerado insignificante. Este pico não foi observado no cromatograma do placebo no método de quantificação de impurezas. Os cromatogramas de diluente, placebo, amostra controle do fármaco e amostra controle da mistura física estão sobrepostos na **Figura 16** e na **Figura 18**, para os métodos de doseamento e substâncias relacionadas, respectivamente. Versões dos cromatogramas sobrepostos, com ampliação na escala no eixo Y, são fornecidos na **Figura 17** e na **Figura 19** para ambos, para melhor visualização da seletividade dos métodos.

Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.

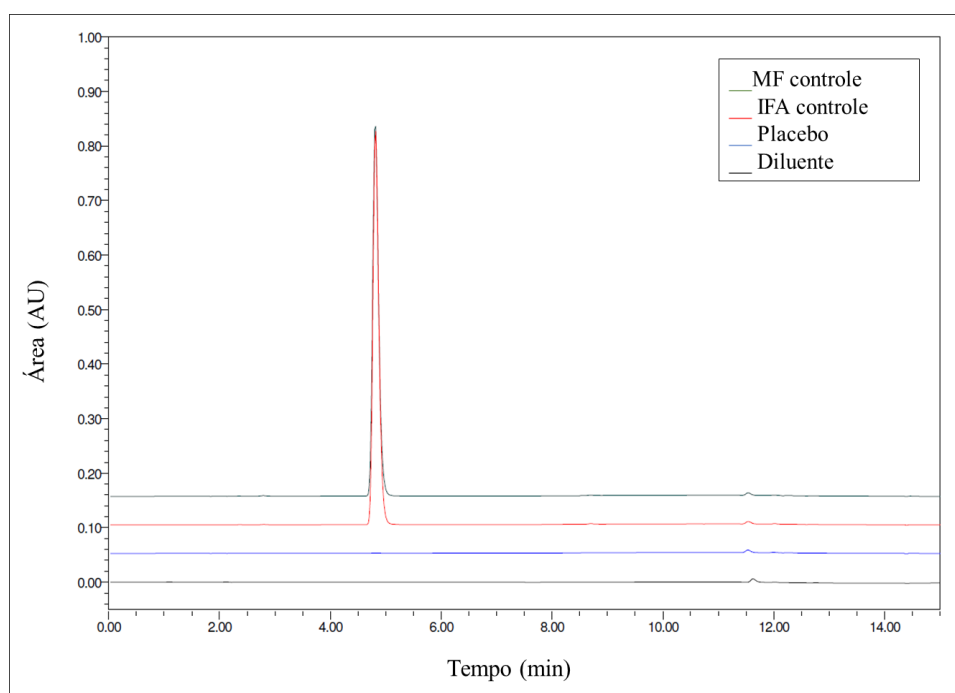


Figura 17 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.

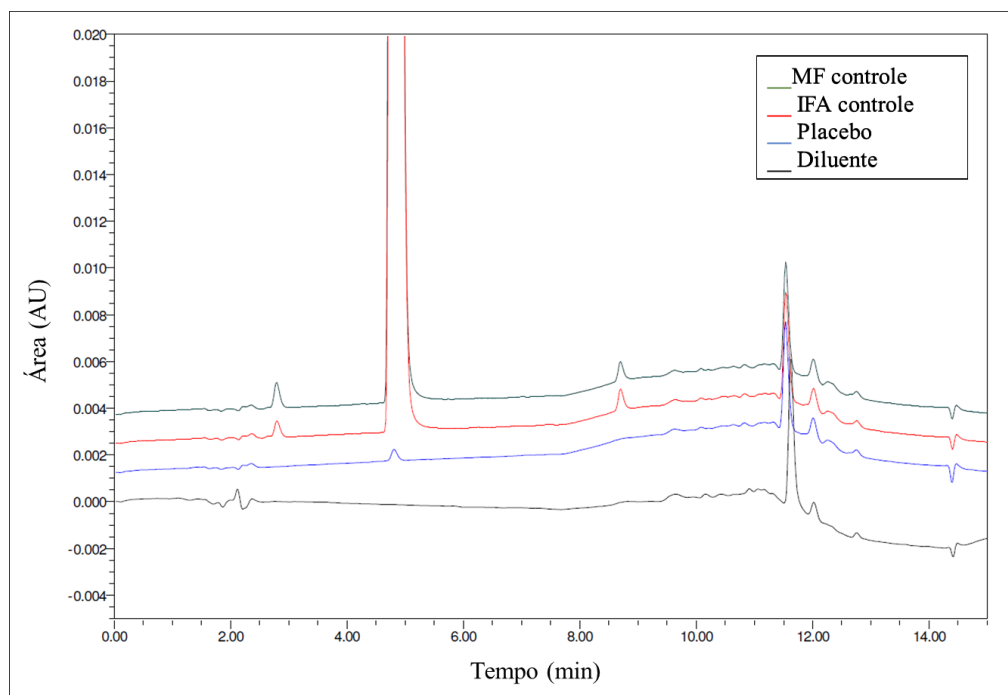


Figura 18 – Sobreposição dos cromatogramas para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.

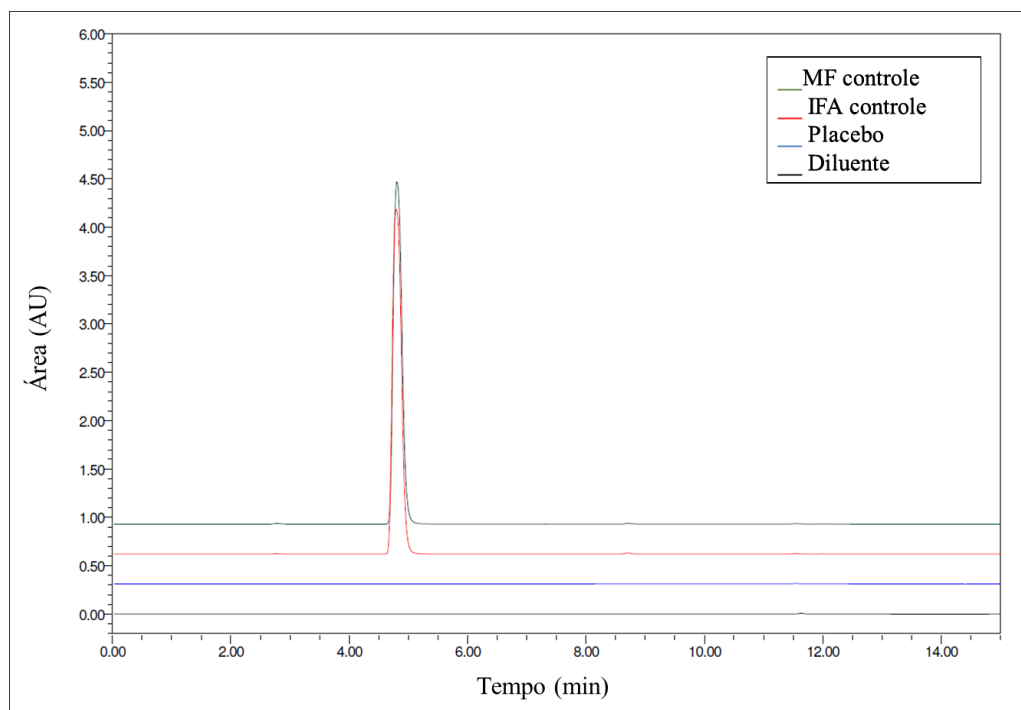
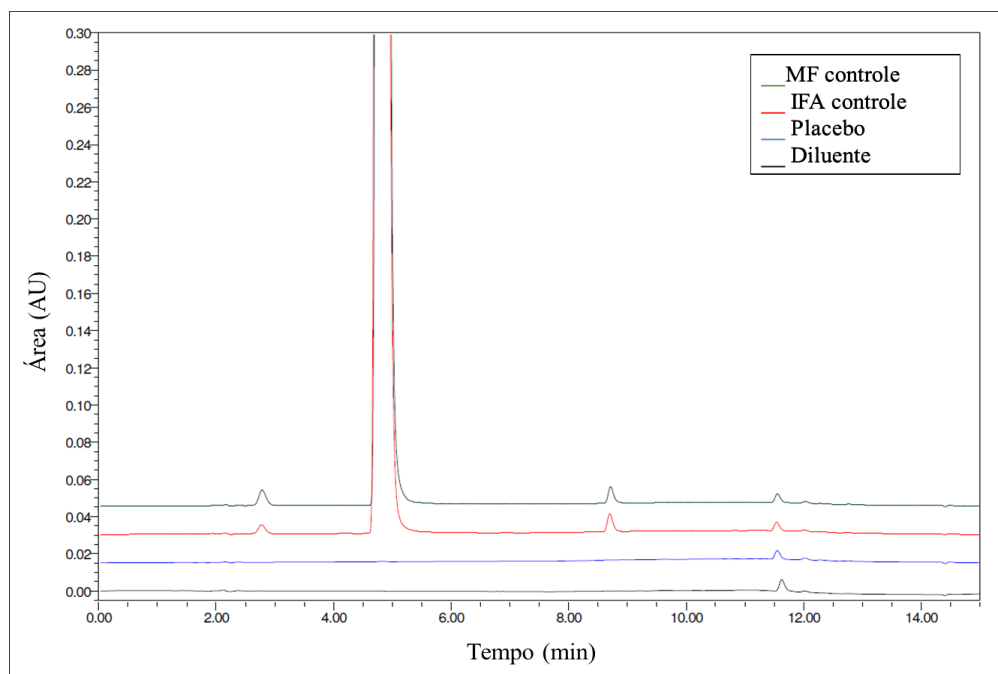


Figura 19 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para diluente (em preto), placebo (em azul) e amostras controle de fármaco (IFA, em vermelho) e mistura física (MF, em verde), obtidos em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.



Do estudo de degradação forçada (descrito na seção 3.3.3), foram definidos *endpoints* para cada condição de estresse, isto é, condições de exposição do insumo farmacêutico ativo e mistura física que reduzissem o teor do ativo em 10-30%, considerados os limites de exposição máximos preconizados pelos guias internacionais e por Baertschi *et al.* (2011).

A sobreposição dos cromatogramas obtidos para as amostras degradadas nas condições de estresse finais é apresentada na **Figura 20** e na **Figura 21**, ampliada, para o método de doseamento, e na **Figura 22** e na **Figura 23**, para substâncias relacionadas. Pelas figuras, percebe-se que os picos de analito, impurezas, produtos de degradação e interferentes estão suficientemente resolvidos entre si, com resolução $> 1,5$ para analito e produto de degradação mais próximo e ou > 1 para produtos de degradação e interferentes, entre si. As amostras foram analisadas, posteriormente, em equipamento equipado com detector de arranjo de diodos, confirmando-se a pureza do pico de acetazolamida nas condições de estresse. Portanto, pode-se concluir que os métodos desenvolvidos foram seletivos.

Figura 20 – Sobreposição dos cromatogramas para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.

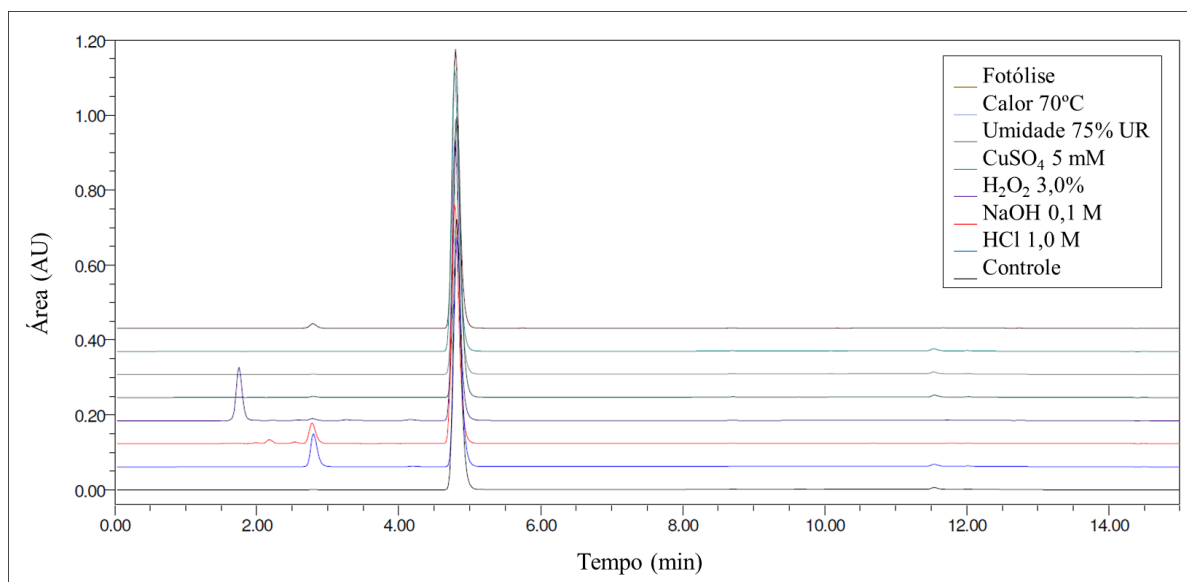


Figura 21 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de teor, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.

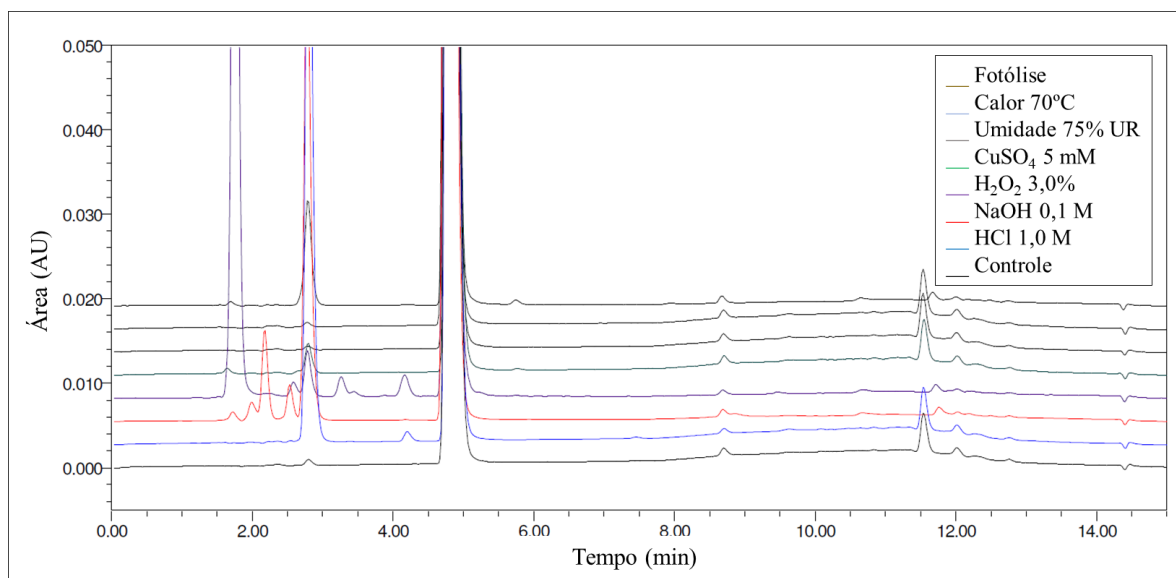


Figura 22 – Sobreposição dos cromatogramas para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.

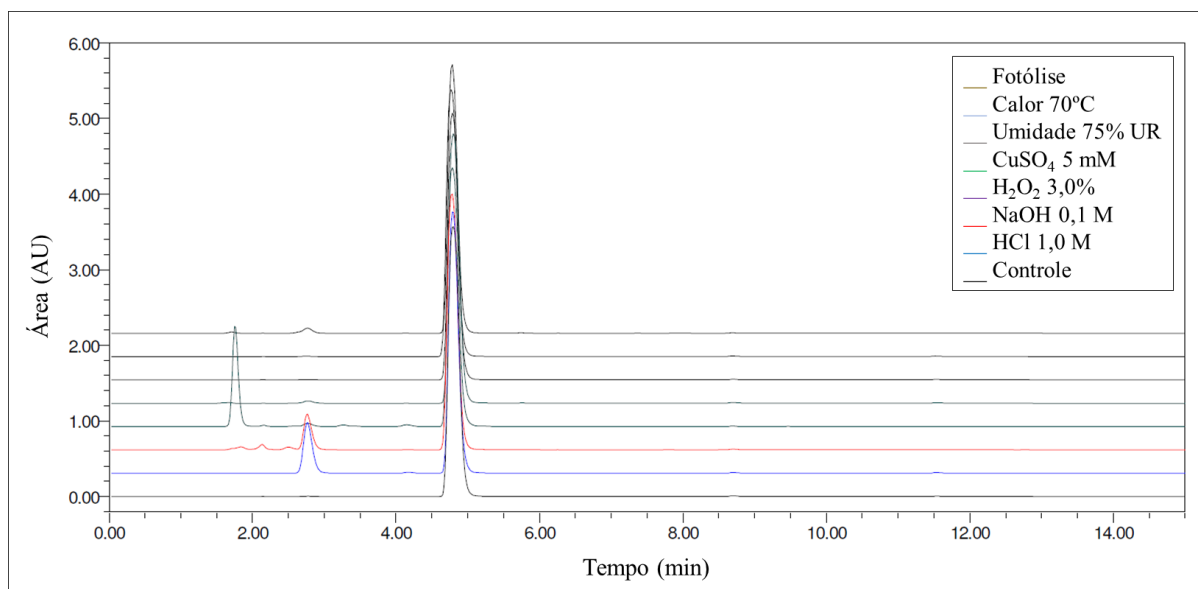
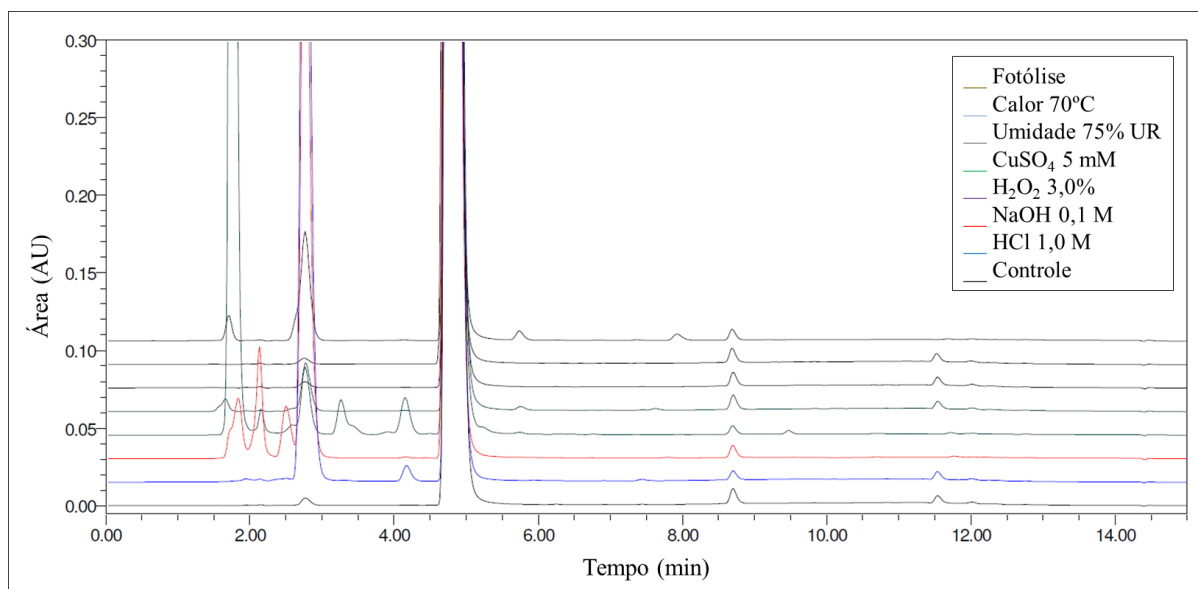


Figura 23 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados para amostra controle (em preto) e amostras degradadas nas condições de estresse ácido (HCl 1,0 M, em azul), estresse básico (NaOH 0,1 M, em vermelho), estresse oxidativo (H₂O₂ 3,0%, em roxo), estresse por íons metálicos (CuSO₄ 5 mM, em verde), estresse úmido (75% UR, em cinza), estresse térmico (70 °C, em ciano) e estresse fotolítico (em dourado), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm para avaliação da seletividade do método de substâncias relacionadas, com ausência de picos interferentes no tempo de retenção do analito e adequada resolução entre analito e produtos de degradação relevantes.



3.3.2.2 Linearidade

Os dados obtidos na construção das três curvas para avaliação da linearidade dos métodos foram avaliados estatisticamente, para verificar o cumprimento das premissas do modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários e posteriormente estimar os parâmetros de regressão. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 18**, para o método de determinação de acetazolamida, e na **Tabela 19**, para o método de determinação de substâncias relacionadas.

Tabela 18 – Parâmetros para avaliação da linearidade do método empregado para determinação do teor de acetazolamida

Parâmetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Normalidade dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,06 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,77 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,13 > 0,05$
Homocedasticidade dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,15 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,06 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,67 > 0,05$
Independência dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,88 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,06 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,09 > 0,05$
Valores extremos ou <i>outliers</i>	0 pontos	1 ponto	0 pontos
Significância da regressão	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$
Significância do intercepto	$p\text{-valor} = 0,25 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,42 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,58 > 0,05$
Desvio da linearidade	Não significativo	Não significativo	Não significativo
Coefficiente angular \pm desvio padrão	67079 ± 1237	68677 ± 1046	68562 ± 546
Coefficiente linear \pm desvio padrão	-155739 ± 129712	-89426 ± 106696	-32143 ± 56908
Coefficiente de correlação (r)	$0,9978 > 0,99$	$0,9985 > 0,99$	$0,9996 > 0,99$
Coefficiente de determinação (r^2)	$0,9956 > 0,99$	$0,9970 > 0,99$	$0,9992 > 0,99$
Equação da reta	$y = 67079x - 155739$	$y = 68677x - 89426$	$y = 68562x - 32143$

Tabela 19 – Parâmetros para avaliação da linearidade do método para determinação de substâncias relacionadas

Parâmetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Normalidade dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,06 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,88 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,13 > 0,05$
Homocedasticidade dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,63 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,47 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,18 > 0,05$
Independência dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,06 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,48 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,85 > 0,05$
Valores extremos ou <i>outliers</i>	0 pontos	0 pontos	0 pontos
Significância da regressão	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$
Significância do intercepto	$p\text{-valor} = 0,90 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,39 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,21 > 0,05$
Desvio da linearidade	Não significativo	Não significativo	Não significativo
Coefficiente angular \pm desvio padrão	73893 ± 343	74001 ± 358	73327 ± 164
Coefficiente linear \pm desvio padrão	37 ± 302	273 ± 307	186 ± 143
Coefficiente de correlação (r)	$0,9999 > 0,99$	$0,9998 > 0,99$	$0,9992 > 0,99$
Coefficiente de determinação (r^2)	$0,9997 > 0,99$	$0,9997 > 0,99$	$0,9996 > 0,99$
Equação da reta	$y = 73893x + 37$	$y = 74001x + 273$	$y = 73327x + 186$

Todos os pressupostos requeridos para regressão linear foram devidamente cumpridos para ambos os métodos, uma vez que, nesses testes estatísticos, espera-se $p\text{-valor}$ maior que 0,05, adotando-se nível de significância de 0,05, para que não se encontre evidências para rejeição

da hipótese nula. Confirma-se que os resíduos para todas as curvas foram independentes, homocedásticos e normais e apenas na segunda curva do método de doseamento de acetazolamida foi encontrado um único valor extremo, que foi removido do conjunto de dados. Esse mesmo raciocínio se aplica na avaliação da significância do intercepto por ANOVA, em que valores de p maiores que 0,05 encontrados nas seis curvas confirmam que não se rejeita a hipótese nula de que o intercepto não difere estatisticamente de zero, como desejado.

Em contrário, para a significância da regressão, por ANOVA, o valor de p deve ser inferior a 0,05 (F estimado por ANOVA $>$ F crítico), para demonstrar que o coeficiente angular ou inclinação é estatisticamente diferente de 0, ou seja, que variações na concentração do fármaco resultam em variações nas áreas do analito, como se espera, o que foi observado para as curvas, sem exceção. Tanto a falta de ajuste do modelo, quanto o desvio da linearidade não foram significativos, conforme planilha disponibilizada por Souza (2007). Todos os resultados obtidos por ANOVA confirmam que o modelo de regressão linear é apropriado para descrever o conjunto de dados, em ambos os métodos. Desse modo, foi possível fazer estimativa dos parâmetros de regressão, equação da reta e coeficientes de correlação, que foram superiores a 0,99, requisito final exigido pela RDC nº. 166/2017 e guias de validação internacionais para comprovação da linearidade. Portanto, os métodos para doseamento e substâncias relacionadas provaram-se lineares, nos intervalos de 80-120 $\mu\text{g/mL}$, para doseamento de acetazolamida, e 0,4-1,2 $\mu\text{g/mL}$, para impurezas.

As curvas foram comparadas estatisticamente, para cada método, a nível de significância de 5%, referente aos coeficientes angulares e aos coeficientes lineares. Uma vez que, do ponto de vista estatístico, não houve diferença significativa entre interceptos e inclinações, as curvas foram combinadas em uma só, para construção de uma única curva que representasse o conjunto de dados. Esta curva única, para cada método, foi plotada como áreas em função da concentração do fármaco, e estão apresentadas na **Figura 24** e na **Figura 25**, respectivamente. Equações da reta estimadas para as novas curvas foram usadas para quantificar o fármaco e produtos de degradação, por interpolação, nas amostras dos ensaios de validação subsequentes, no estudo de degradação forçada e no ensaio de perfil de liberação *in vitro*.

Figura 24 – Curva analítica e equação da reta obtidas durante avaliação de linearidade para método de teor de acetazolamida, no intervalo de concentração de 80 a 120 µg/mL.

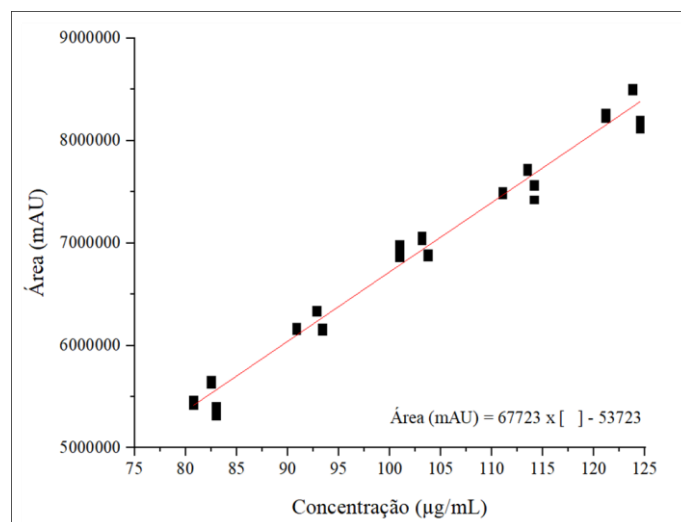
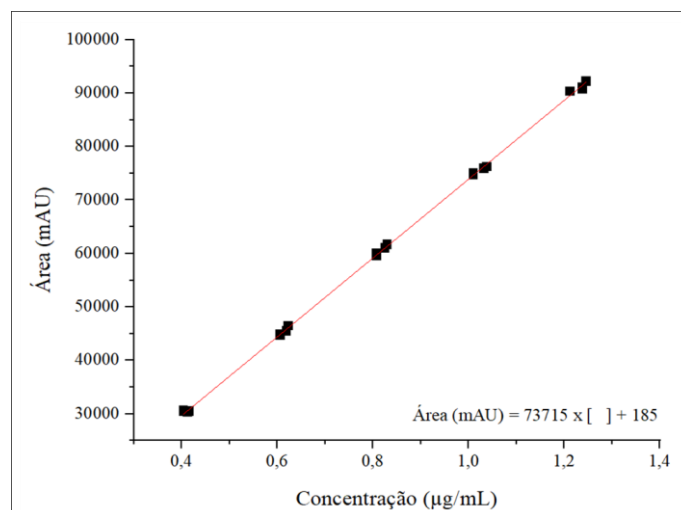


Figura 25 – Curva analítica e equação da reta obtidas durante avaliação de linearidade para método de substâncias relacionadas, no intervalo de concentração de 0,4 (LQ) a 1,2 µg/mL



3.3.2.3 Precisão

Dados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária dos métodos de doseamento de acetazolamida e de substâncias relacionadas são apresentados nas **Tabelas 20** e **21**, respectivamente. Ambos os métodos foram precisos nos dois níveis avaliados de precisão,

uma vez que os valores de DPR obtidos no estudo, intradia e interdias, foram inferiores aos valores de 5,3% e 11,0%, limites máximos especificados no guia utilizado (AOAC, 2016).

Tabela 20 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método para determinação do teor de acetazolamida

Concentração (µg/mL)	Nível (%)	Recuperação (%)	
		Dia 1, analista 1	Dia 2, analista 2
80	80	97,91	101,29
80	80	99,55	97,83
80	80	97,08	100,35
100	100	101,94	97,38
100	100	99,19	96,96
100	100	98,60	102,09
120	120	101,48	97,24
120	120	100,97	98,38
120	120	98,95	100,56
Média	-	99,52	99,12
DPR (%) intradia	-	1,65	1,97
DPR (%) interdias	-	-	1,78

Tabela 21 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método para determinação do teor de substâncias relacionadas

Concentração (µg/mL)	Nível (%)	Recuperação (%)	
		Dia 1, analista 1	Dia 2, analista 2
0,4	40	99,71	97,83
0,4	40	98,82	100,43
0,4	40	100,65	98,78
0,8	80	99,58	99,82
0,8	80	100,44	100,13
0,8	80	97,48	99,04
1,2	120	99,30	97,40
1,2	120	100,06	98,16
1,2	120	98,75	98,13
Média	-	99,42	98,86
DPR (%) intradia	-	0,98	1,09
DPR (%) interdias	-	-	1,25

3.3.2.4 Exatidão

Dados obtidos na avaliação da exatidão dos métodos de doseamento de acetazolamida e substâncias relacionadas estão apresentados nas **Tabelas 22** e **23**, respectivamente. No método para determinação de teor de acetazolamida, foram obtidas recuperações variando entre 98,90 e 102,81% e DPR variando de 1,38 e 1,58%, com recuperação média de 100,88% e DPR entre níveis de 1,30%. Estes resultados estão dentro das especificações definidas pela AOAC (2016), que admitem recuperações entre 90,0 e 107,0% e DPR inferior a 5,3%. No método para determinação de substâncias relacionadas, as recuperações variaram entre 98,46 e 102,71% e o DPR entre 0,88 e 2,11%, com recuperação média de 100,55% e DPR entre níveis de 1,27%, dentro dos limites estabelecidos pela AOAC de 80,0-110,0% e 11,0%, respectivamente. Portanto, os dois métodos foram considerados exatos.

Tabela 22 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da exatidão do método determinação do teor de acetazolamida

Concentração			
Nível (%)	Téorica (µg/mL)	Estimada (µg/mL)	Recuperação (%)
80	82,56	83,44	101,07
80	82,56	81,65	98,90
80	82,56	83,39	101,61
100	103,20	103,39	100,18
100	103,20	103,12	99,92
100	103,20	106,10	102,81
120	123,84	125,48	101,32
120	123,84	126,85	102,43
120	123,84	123,42	99,66
Média	-	-	100,88
DPR (%)	-	-	1,30

Tabela 23 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da exatidão do método para determinação do teor de substâncias relacionadas

Concentração			
Nível (%)	Téorica (µg/mL)	Estimada (µg/mL)	Recuperação (%)
40	0,4040	0,4067	100,66
40	0,4040	0,4095	101,37
40	0,4040	0,4024	99,61
80	0,8080	0,8299	102,71
80	0,8080	0,8110	100,37
80	0,8080	0,7956	98,46
120	1,2120	1,2339	101,81
120	1,2120	1,2138	100,15
120	1,2120	1,2096	99,80
Média	-	-	100,55
DPR (%)	-	-	1,27

3.3.2.5 Robustez

Na avaliação da robustez, avaliou-se a influência de diferentes fatores na recuperação, DPR, fator de retenção, assimetria, razão sinal:ruído e número de pratos teóricos para o analito. Para recuperação e DPR, foram utilizadas as mesmas especificações para precisão e exatidão. Na assimetria, determinaram-se como aceitáveis valores entre 0,8 e 1,5. No fator de retenção, estabeleceu-se como critério valores de, no mínimo, 0,5, como razão sinal:ruído e pratos teóricos, foi considerado apenas informativo, exceto para substâncias relacionadas, em que a razão sinal:ruído foi fixada em pelo menos 10, necessária para quantificação. Na **Tabela 24** e na **Tabela 25** foram reportados os resultados obtidos durante a avaliação da robustez, nos métodos de doseamento de acetazolamida e de substâncias relacionadas, em que células coloridas de vermelho destacam valores fora das especificações.

Tabela 24 – Resultados da avaliação da robustez para o método de teor de acetazolamida

Experimento	Parâmetro					
	R (%)	DPR (%)	k	A	Razão s/n	N
1	104,59	0,10	1,88	1,14	36823	15740
2	106,25	0,23	1,84	1,18	18978	12118
3	105,28	0,19	1,64	1,13	32899	13281
4	106,22	0,08	1,61	1,20	22238	9776
5	95,02	0,09	1,02	1,11	14041	10006
6	97,34	0,02	1,00	1,16	7356	7891
7	95,28	0,03	0,80	1,10	17925	8139
8	97,14	0,03	0,78	1,15	9281	6522
9	104,81	0,42	2,05	1,15	67259	14021
10	105,03	0,07	2,01	1,20	62299	10210
11	103,93	0,84	1,72	1,14	41235	11954
12	103,86	0,09	1,69	1,21	41229	8574
13	94,99	0,50	1,12	1,13	16334	8426
14	95,50	0,08	1,09	1,19	11117	7028
15	96,51	0,07	0,84	1,11	21671	7519
16	95,29	0,10	0,82	1,17	15733	6100
17	104,90	0,21	1,88	1,14	32924	15930
18	106,67	0,98	1,86	1,19	27705	12113
19	105,60	0,22	1,64	1,14	30743	12400
20	107,30	0,26	1,61	1,20	21235	9483
21	95,07	0,06	1,02	1,11	14965	9458
22	95,77	0,71	1,01	1,16	8490	7772
23	95,42	0,06	0,80	1,10	20180	7983
24	93,98	2,18	0,78	1,15	14557	6439
25	102,72	0,11	2,04	1,15	66319	13533
26	103,78	0,33	2,02	1,21	63408	10094
27	102,33	0,17	1,72	1,13	43267	11496
28	104,06	0,20	1,69	1,21	45209	8573
29	96,41	0,26	1,11	1,13	19308	9008
30	97,99	0,13	1,09	1,18	11886	7032
31	96,12	0,08	0,83	1,11	27875	7741
32	97,39	0,01	1,10	1,18	4396	8404
33	99,47	0,25	1,28	1,17	4367	9756
34	99,45	0,04	1,30	1,16	4979	10778
35	98,45	0,97	1,30	1,17	4611	11001

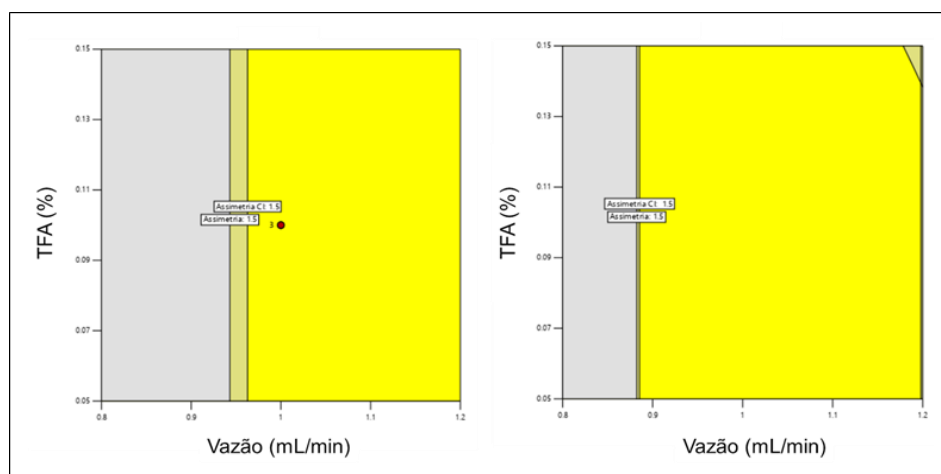
Tabela 25 – Resultados da avaliação da robustez para o método de determinação de substâncias relacionadas

Experimento	Parâmetro					
	R (%)	DPR (%)	k	A	Razão s/n	N
1	103,28	0,31	1,87	1,15	2334	16186
2	103,10	0,51	1,87	1,20	2296	13702
3	104,25	1,09	1,61	1,15	1516	11957
4	105,06	1,22	1,61	1,20	1384	8645
5	97,06	0,01	1,01	1,12	389	9493
6	98,03	0,44	1,01	1,15	328	8415
7	99,03	0,37	0,79	1,10	445	8230
8	99,47	0,03	0,79	1,14	540	7088
9	105,45	0,16	2,03	1,17	5916	13712
10	104,89	0,35	2,04	1,21	3111	11611
11	105,82	0,12	1,71	1,16	5779	11195
12	105,83	1,07	1,71	1,20	2598	9622
13	95,25	0,02	1,11	1,13	808	8986
14	96,43	0,58	1,11	1,17	565	7986
15	98,61	0,06	0,84	1,12	1275	7808
16	98,10	0,60	0,83	1,14	803	6741
17	104,67	0,11	1,89	1,15	2664	16303
18	103,99	0,09	1,88	1,18	3241	13091
19	104,78	0,06	1,64	1,15	1546	13120
20	104,66	0,03	1,62	1,19	960	10295
21	97,80	0,07	1,02	1,11	463	10414
22	97,89	0,06	1,02	1,15	395	8674
23	98,67	0,28	0,80	1,10	543	8376
24	99,90	0,17	0,79	1,15	584	6962
25	103,50	0,07	2,06	1,16	2878	14437
26	103,94	1,18	2,05	1,22	1025	10403
27	104,15	0,25	1,72	1,16	4186	11658
28	104,78	0,33	1,71	1,22	1888	8405
29	98,23	0,48	1,12	1,13	1003	9190
30	97,44	0,98	1,11	1,17	544	7282
31	98,88	0,13	0,84	1,12	1478	7864
32	97,60	1,20	0,83	1,16	729	6267
33	99,97	0,03	1,27	1,17	146	10152
34	99,63	0,10	1,29	1,16	263	10500
35	100,40	0,04	1,30	1,16	286	10082

Todos os resultados foram analisados estatisticamente, pelo diagrama de Pareto e por ANOVA, com conclusões similares para os métodos de doseamento de acetazolamida ou de substâncias relacionadas. No geral, os métodos foram robustos, principalmente para as respostas mais relevantes, como recuperação e DPR, para as quais respostas encontradas cumpriram as especificações no intervalo avaliado no delineamento, de modo que pequenas variações nas condições cromatográficas exerceriam influência sutil ou nula na qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, como demonstrado na **Figura 26**. O *design space*

compreende uma região de trabalho nos quais, mesmo com pequenas mudanças nas condições cromatográficas, seriam conseguidos resultados satisfatórios, dentro das especificações definidas para o produto. A assimetria foi o parâmetro mais sensível mas, mesmo assim, não houve resultados fora da especificação. Comparativamente, o método de substâncias relacionadas foi um pouco mais robusto.

Figura 26 – *Design spaces* obtidos durante avaliação da robustez para os métodos de teor e substâncias relacionadas, com evidência de grande faixa de trabalho (em amarelo) em que a combinação das variáveis críticas concentração de ácido trifluoroacético (TFA, 0,1% v/v) e vazão de fase móvel produz resultados dentro das especificações.



Estudo dos efeitos dos fatores sobre respostas mostrou que vazão de fase móvel é o parâmetro mais crítico para todas as respostas, exceto DPR, contribuindo para cerca de 90% das variações observadas para recuperação e assimetria e pelo menos 45% para fator de capacidade, razão sinal:ruído e número de pratos teóricos. No geral, quando vazões menores foram utilizadas, resultados fora de uma ou mais especificações foram reportados, mas simplesmente porque não se cumpriam os requisitos para assimetria, porque, para recuperação, resultados válidos foram seguramente observados na faixa investigada. Este parâmetro deve, portanto, ser rigorosamente controlado durante as análises. Em seguida, concentração de TFA e proporção de acetonitrila foram, nessa ordem, os fatores mais significativos, enquanto a rampa do gradiente exerceu pequeno efeito e o comprimento de onda não foi estatisticamente relevante, nem mesmo para a recuperação do analito nas amostras.

3.3.2.6 Limites de detecção e quantificação

Limites de detecção e quantificação foram estimados pelos parâmetros de regressão da curva linear, apenas para o método de substâncias relacionadas, para o qual são exigidos pela legislação. Foram obtidos os valores de 0,009 µg/mL e 0,026 µg/mL para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Soluções do fármaco foram preparadas nestas concentrações e, para o limite de quantificação, precisão e exatidão foram determinadas. O método conseguiu detectar o fármaco na concentração proposta para o limite de detecção. Todavia, mesmo que razões sinal:ruído maiores que 10 fossem obtidas, o método não foi capaz de quantificar o fármaco na concentração do limite de quantificação proposto. Testes posteriores foram realizados e a menor concentração em que uma determinação precisa e exata foi observada foi 0,08 µg/mL que foi, portanto, definido como limite de quantificação.

Este método atendeu aos requisitos para validação e foi o primeiro método desenvolvido e validado para quantificação de acetazolamida e produtos de degradação em implantes intravítreos, uma vez que os outros não foram reprodutíveis para esta finalidade. Comparado aos outros métodos disponíveis, o método apresentado neste trabalho foi mais rápido, com duração de 15 minutos, mais econômico, mais seguro para analistas e com detectabilidade similar à dos métodos descritos por Srinivasu *et al.* (2009) e Suresh *et al.* (2020). Por isso, mostrou-se adequado para ser aplicado na avaliação do estudo de estabilidade acelerado.

3.3.3 Estudo de degradação forçada

As condições finais de estresse ou *endpoints* definidos para o analito durante estudo de degradação forçada, que foram utilizados para avaliação do decaimento e formação de produtos de degradação, estão dispostas na **Tabela 26**.

Tabela 26 – Condições de estresse finais ou *endpoints* definidos no estudo de degradação forçada

Condição de estresse	Estressante e outros parâmetros	Exposição (horas)
Hidrólise ácida	HCl 1,0 M – 37 °C	24
Hidrólise alcalina	NaOH 0,1 M – 37 °C	72
Oxidação	H ₂ O ₂ 3,0% – 37 °C	168
Íons metálicos	CuSO ₄ 5 mmol/L – 37 °C	24
Calor seco	70 °C	168
Umidade	> 75% UR – 25 °C	168
Fotólise	1,2 milhões de lux.h, 200 watts.h/m ² – 25 °C	168

UR: umidade relativa

Após realização do estudo de degradação forçada, concluiu-se que o fármaco, sozinho ou em mistura física, é estável na maioria das condições de estresse químico e físico, uma vez que, para calor seco, oxidação, íons metálicos e fotólise o seu teor se manteve entre 98,0-102,0%. Contudo, o fármaco mostrou-se susceptível à degradação por hidrólise, pois nas condições de hidrólise ácida e alcalina e umidade o teor do fármaco decaiu 17,79, 12,65 e 3,96%, no IFA, e 17,19, 12,81 e 3,49% na mistura binária, respectivamente, como demonstrado na **Tabela 27**. Este resultado condiz com os reportados em outros estudos, como aquele descrito por Srinivasu *et al.* (2009), que discutiram a instabilidade do fármaco em meios ácido e alcalino, ou por Gupta e Parasrampur (2008), Suresh *et al.* (2020) e Chinta *et al.* (2021), que realizaram o estudo em diferentes formulações e reportaram instabilidade somente no meio alcalino. Em nenhum estudo, entretanto, a condição de estresse ácido havia sido aquela em que ocorreu maior porcentagem de degradação, diferença que pode ser advinda dos excipientes contidos nas formulações avaliadas.

Tabela 27 – Teor do fármaco acetazolamida e dos produtos de degradação e balanço de massas para condições de estresse no estudo de degradação

Condição de estresse	Insumo farmacêutico ativo			Mistura física		
	Teor (%)	PD (%)	BM (%)	Teor (%)	PD (%)	BM (%)
Controle	100,0000	0,1825	100,1825	100,0000	0,1764	100,1764
HCl 1,0 M – 24 horas	82,2141	8,7082	90,9223	82,8105	7,2955	90,1060
NaOH 0,1 M – 72 horas	87,3538	6,7191	94,0729	87,1894	6,7404	93,9298
H ₂ O ₂ 3% – 168 horas	101,0971	1,2940	102,3911	99,3047	1,2902	100,5949
CuSO ₄ 5 mmol/L – 24 horas	101,0387	0,5086	101,5473	101,0731	0,4368	101,5099
Calor 70 °C – 168 horas	100,5192	0,1708	100,6900	99,7905	0,1702	99,9607
Umidade 75% UR – 168 horas	96,0373	0,1771	96,2144	96,5121	0,1646	96,6767
Fotólise – 168 horas	100,1795	1,7086	101,8881	100,0612	1,4328	101,4940

BM: balanço de massas – PD: produtos de degradação

Produtos de degradação foram encontrados nas amostras degradadas, sem exceção, mesmo nas quais não houve decaimento significativo do fármaco. Pelo gradiente exploratório inicial, verificou-se que, como esperado, a maioria dos produtos de degradação e impurezas de síntese eram mais polares que o analito, eluindo no início do cromatograma, quando a fase móvel era composta por proporções maiores da fase aquosa. Os picos mais retidos decorriam de interferentes presentes no diluente, que não precisavam ser quantificados.

Nas condições de estresse físico por calor e umidade, os percentuais desses produtos foram pequenos, idênticos aos encontrados para amostra controle, enquanto para as condições oxidativa, por peróxido ou íons, e fotolítica, percebeu-se aumento qualitativo e quantitativo no perfil de degradação, ainda que muito sutil. Interferentes presentes na amostra controle, não exposta, podem ser impurezas ou intermediários de síntese não eliminados, contaminantes do insumo farmacêutico ativo ou produtos de degradação formados por descumprimento de orientações do fornecedor para seu armazenamento. Entretanto, ressalta-se que as quantidades das substâncias relacionadas encontradas na amostra controle, identificados pelos tempos de retenção relativos RRT~ 0,578 e RRT~ 1,814, foram de 0,0986% e 0,0839%, de modo que o IFA cumpre as especificações para substâncias relacionadas requeridas na Farmacopeia Europeia (EUROPEAN, 2020) e Americana (UNITED STATES, 2021), que estabelece limite aceitável de 0,1% para impurezas desconhecidas. Por isso, o insumo farmacêutico ativo possui qualidade necessária para uso. Os resultados para formação de produtos de degradação estão relatados na **Tabela 27**. Interferentes do placebo degradado e brancos foram desconsiderados.

Na **Tabela 28** e na **Tabela 29**, encontra-se resumo geral dos produtos de degradação formados e outros picos interferentes, suas origens e seus teores, se aplicável, para as condições de estresse, no insumo farmacêutico ativo e mistura binária. Somados, 24 produtos de degradação diferentes foram identificados. Nas exposições ao hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, sulfato de cobre e luz ultravioleta, foram formados maior número de produtos de degradação, mas, no geral, em teores muito pequenos. Somente os picos de RRT~ 0,578 e RRT~ 1,820, mais os picos de diluente nos RRT~ 2,462, RRT~ 2,518 e RRT~ 2,659, foram identificados nas amostras degradadas de IFA e mistura física, sem exceção. Eles foram considerados impurezas de síntese, mas o pico no RRT~ 0,578, mais proeminente, deve ser tratado como produto de degradação pois, embora presente na amostra controle, encontra-se em quantidades significativamente maiores na maioria das condições de estresse, indicando ser formado durante o processo de degradação do fármaco.

Uma importante conclusão com o estudo de degradação forçada é que não se observou incompatibilidade físico-química entre fármaco e excipiente, uma vez que, independentemente da condição de estresse, mesmo perfil de decaimento do ativo e formação de produtos de degradação, qualitativa e quantitativamente, foi encontrado. Contrariamente, na condição mais crítica, por hidrólise ácida, menos fármaco se degrada e menos produtos de degradação foram formados, indicativo de que, em certa extensão, o excipiente pode prevenir ou pelo menos retardar a degradação.

Tabela 28 – Quadro geral do perfil de degradação do fármaco acetazolamida no insumo farmacêutico ativo

Condição de estresse, produtos de degradação (%) e origens									
PD	Controle	HCl 1,0M	NaOH 0,1M	H ₂ O ₂ 3,0%	CuSO ₄ 5 mM	Calor 70 °C	Umidade	Fotólise	Origem
RRT~ 0,370	-	-	0,1226	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,384	-	-	0,2161	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,393	-	-	0,2044	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,406	-	-	-	-	0,0018	-	-	0,0014	PD
RRT~ 0,446	-	-	0,5747	0,0871	0,0033	-	-	0,0040	PD
RRT~ 0,524	-	-	0,3696	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,554	-	-	-	0,0543	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,578	0,0986	7,9039	5,1400	0,5010	0,3861	0,0926	0,0975	1,5144	IS + PD
RRT~ 0,668	-	-	-	0,2231	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,685	-	0,0020	-	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,705	-	-	0,0012	0,0610	-	-	-	0,0001	PD
RRT~ 0,816	-	-	-	0,0086	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,871	-	0,1094	0,0074	0,2666	0,0026	-	-	0,0027	PD
RRT~ 0,939	-	-	-	0,0024	-	-	-	-	PD
RRT~ 1,199	-	-	-	-	0,0221	-	-	0,0824	PD
RRT~ 1,237	-	0,0039	-	0,0105	-	-	-	-	PD
RRT~ 1,303	-	0,0005	-	-	0,0026	-	-	0,0026	PD
RRT~ 1,414	-	-	-	0,0031	-	-	-	0,0036	PD
RRT~ 1,551	-	0,0108	-	-	0,0013	-	-	0,0061	PD
RRT~ 1,597	-	-	-	-	0,0096	-	-	0,0102	PD
RRT~ 1,629	-	-	0,0049	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 1,820	0,0839	0,0477	0,0676	0,0466	0,0793	0,0782	0,0796	0,0730	IS
RRT~ 1,970	-	-	-	0,0204	-	-	-	-	PD
RRT~ 2,234	-	-	0,0107	0,0092	-	-	-	0,0082	PD
RRT~ 2,462	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Diluyente
RRT~ 2,518	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	Diluyente
RRT~ 2,659	-	NA	-	NA	NA	-	-	NA	Diluyente

IS: impureza de síntese – mM: milimolar – M: molar – NA: presente, mas não quantificado – PD: produto de degradação – RRT: tempo de retenção relativo

Tabela 21 – Quadro geral do perfil de degradação do fármaco acetazolamida na mistura física

Condição de estresse, produtos de degradação (%) e origens									
PD	Controle	HCl 1,0M	NaOH 0,1M	H ₂ O ₂ 3,0%	CuSO ₄ 5 mM	Calor 70 °C	Umidade	Fotólise	Origem
RRT~ 0,370	-	-	0,1723	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,384	-	-	0,1942	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,393	-	-	0,4199	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,406	-	-	-	-	0,0017	-	-	0,0015	PD
RRT~ 0,446	-	-	0,5927	0,1218	0,0039	-	-	-	PD
RRT~ 0,524	-	-	0,3596	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,554	-	-	-	0,0781	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,578	0,0986	7,1372	4,8895	0,4584	0,3267	0,0917	0,0921	1,2745	IS + PD
RRT~ 0,668	-	-	-	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,685	-	0,0020	-	0,2634	-	-	-	0,0001	PD
RRT~ 0,705	-	-	0,0023	0,0360	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,816	-	-	-	0,0110	-	-	-	-	PD
RRT~ 0,871	-	0,1000	0,0072	0,2314	0,0024	-	-	0,0042	PD
RRT~ 0,939	-	-	-	0,0041	-	-	-	-	PD
RRT~ 1,199	-	-	0,0120	0,0118	0,0150	-	-	0,0511	PD
RRT~ 1,237	-	0,0043	-	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 1,303	-	-	-	-	0,0018	-	-	-	PD
RRT~ 1,414	-	-	0,0131	0,0033	-	-	-	0,0027	PD
RRT~ 1,551	-	0,0066	-	-	0,0010	-	-	0,0053	PD
RRT~ 1,597	-	-	-	-	0,0118	-	-	0,0123	PD
RRT~ 1,629	-	-	0,0045	-	-	-	-	-	PD
RRT~ 1,820	0,0778	0,0455	0,0640	0,0362	0,0726	0,0785	0,0726	0,0724	IS
RRT~ 1,970	-	-	-	0,0255	-	-	-	-	PD
RRT~ 2,234	-	-	0,0090	0,0093	-	-	-	0,0087	PD
RRT~ 2,462	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Diluyente
RRT~ 2,518	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	-	Diluyente
RRT~ 2,659	-	NA	-	NA	NA	-	-	NA	Diluyente

IS: impureza de síntese – mM: milimolar – M: molar – NA: presente, mas não quantificado – PD: produto de degradação – RRT: tempo de retenção relativo

Uma descrição e discussão mais minuciosa é fornecida para as condições de hidrólise alcalina e ácida, que foram mais críticas no estudo de degradação. A **Figura 27** e a **Figura 28** mostram o perfil de produtos de degradação, o cromatograma com ampliação, das amostras do insumo farmacêutico ativo e misturas físicas, degradadas nas condições de hidrólise ácida e alcalina, respectivamente, sobrepostos com diluente, placebo e brancos.

Figura 27 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados obtidos para diluente (em preto), agente degradante (branco, em azul), placebo (em vermelho), insumo farmacêutico ativo (IFA, em verde) e mistura binária (MF, em roxo), na condição crítica de estresse ácido (HCl 1,0 M), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.

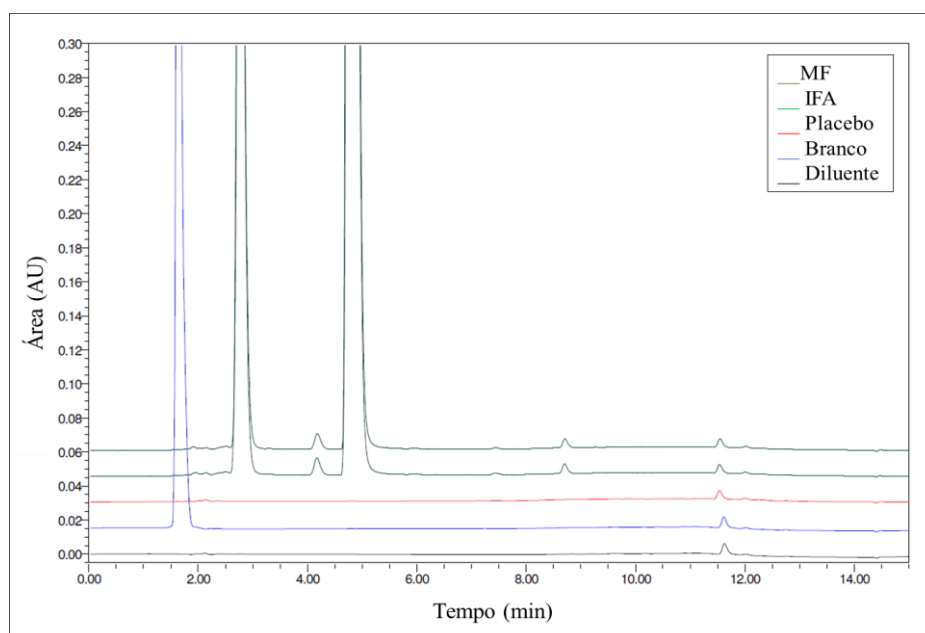
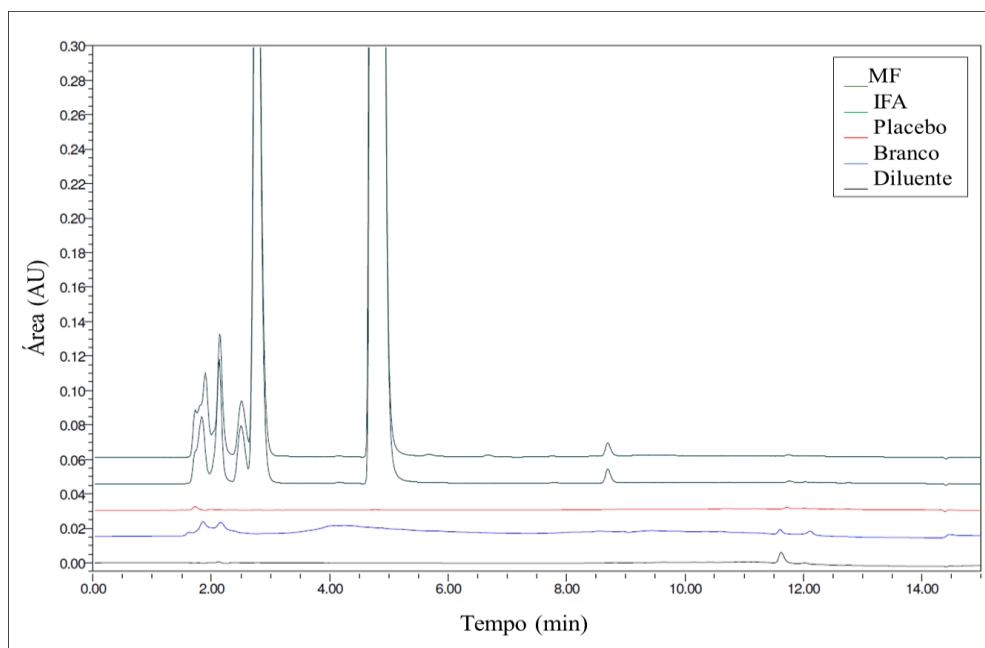


Figura 28 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados obtidos para diluente (em preto), agente degradante (branco, em azul), placebo (em vermelho), insumo farmacêutico ativo (IFA, em verde) e mistura binária (MF, em roxo), na condição crítica de estresse básico (NaOH 0,1 M), sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.



Em ambas, diferente do observado nas outras condições de estresse e apesar de valores muito próximos, não se obtiveram balanços de massas desejáveis, entre 95,0-105,0%. Normalmente, quando o balanço de massas é inferior a 95%, especula-se que foram formados produtos de degradação voláteis, insolúveis no diluente, sem cromóforo, com absorção relativa menor que o fármaco ou que não fiquem retidos na coluna, eluindo no volume morto. Nas condições, observa-se produto de degradação predominante, de RRT~ 0,578, em níveis superiores a 5%. Especula-se, pelos resultados encontrados, que o produto de degradação seja formado a partir da hidrólise da acetazolamida. Nos compêndios oficiais, relata-se entre as impurezas conhecidas, a desacetil acetazolamida, produzida por reação de desacetilação do grupo amida, na estrutura do fármaco. Uma reação de desacetilação pode ser catalisada por hidrólise e por isso, é plausível assumir que o pico de RRT~ 0,578 seja a substância mencionada, mesmo porque o grupo funcional amida é o mais lábil na estrutura do fármaco para reações hidrolíticas. Na monografia da Farmacopeia Americana, orienta-se a usar fator de resposta relativa de 0,48 nos cálculos desta impureza. Se o mesmo fator fosse aplicado nos nossos

cálculos, os teores desse produto de degradação mais que duplicariam e balanços de massas bastante próximos a 100% seriam obtidos. Outros fatores de resposta relativos, que poderiam corrigir o balanço de massas, são mencionados na monografia, mas a correlação entre as impurezas conhecidas reportadas e os picos encontrados no estudo de degradação é menos lógica.

Entretanto, decidiu-se por não aplicar o fator de resposta relativa pois, na monografia, o RRT para a desacetil acetazolamida é 0,45, diferente do 0,58 encontrados no método desenvolvido. Como não se pode afirmar com certeza que os tempos de retenção relativos diferentes sejam explicados pelas modificações na composição da fase móvel e nem se, nas novas condições, este fator de resposta se manteria. Por isso, estudos posteriores, empregando espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e outros, serão propostos para identificar estruturalmente este e outros produtos de degradação. Em seguida, os produtos de degradação mais relevantes serão isolados e fator de resposta relativo, no método desenvolvido, será determinado para cada um.

3.3.2 Estudo de estabilidade acelerada

Depois de desenvolvidos e validados, os métodos foram aplicados no estudo de estabilidade acelerado, para quantificação do fármaco e produtos de degradação reais formados no insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreos expostos a 40 °C e 75% UR por seis meses. Na **Figura 29** e na **Figura 30** estão sobrepostos os cromatogramas e cromatogramas ampliados obtidos para placebo, insumo farmacêutico ativo, implantes intravítreos e implantes intravítreos brancos no estudo de estabilidade, nos intervalos estipulados no estudo. Na **Tabela 30**, estão sumarizados os resultados para doseamento de fármaco e produtos de degradação encontrados no IFA e produto, nos intervalos estipulados.

Figura 29 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos para implante intravítreo branco (em preto), insumo farmacêutico ativo depois de 3 e 6 meses (IFA, em azul e vermelho, respectivamente) e implantes intravítreos contendo acetazolamida depois de 3 e 6 meses (em verde e em roxo, respectivamente), durante estudo de estabilidade acelerada, sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.

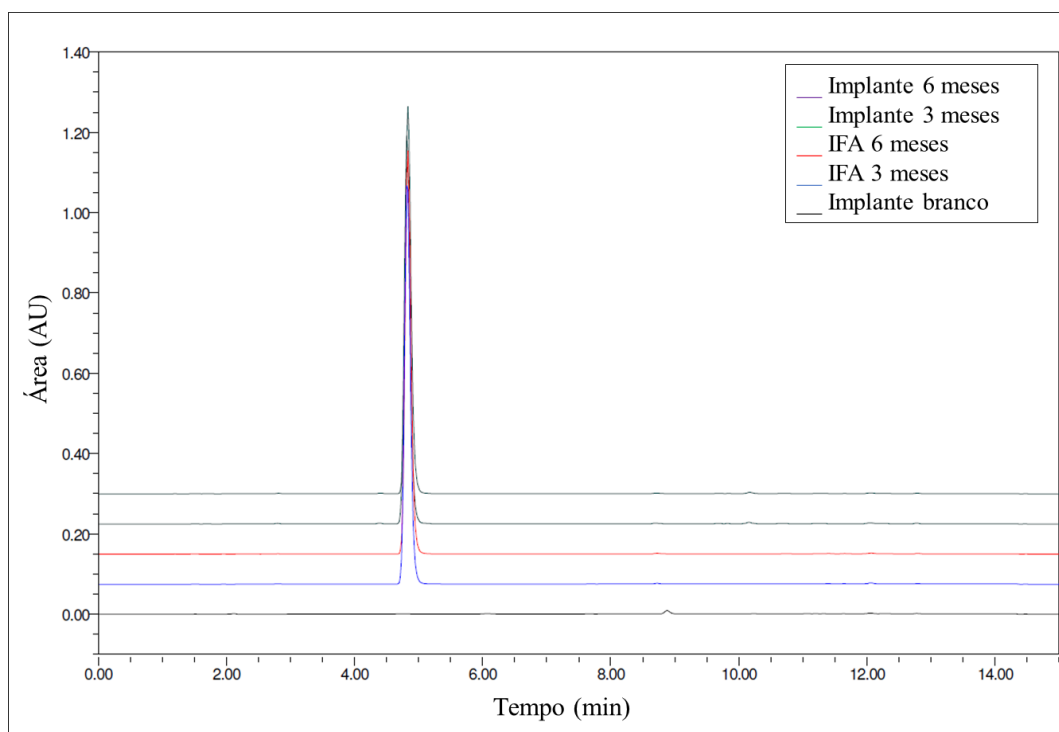


Figura 30 – Sobreposição dos cromatogramas ampliados obtidos para implante intravítreo branco (em preto), insumo farmacêutico ativo depois de 3 e 6 meses (IFA, em azul e vermelho, respectivamente) e implantes intravítreos contendo acetazolamida depois de 3 e 6 meses (em verde e em roxo, respectivamente), durante estudo de estabilidade acelerada, sob eluição em gradiente de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% v/v, em vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção por ultravioleta a 265 nm, no método de substâncias relacionadas, com evidência de decaimento na resposta do ativo e formação de produtos de degradação.

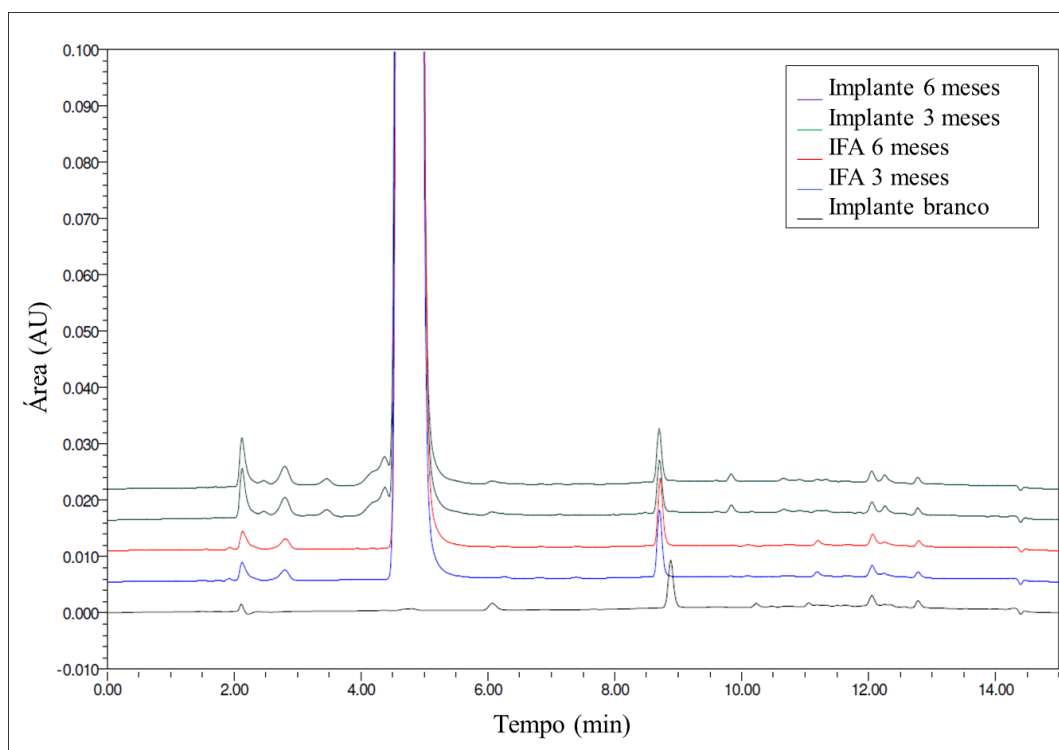


Tabela 30 – Sumário dos resultados obtidos para teor e produtos de degradação para insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreo no estudo de estabilidade acelerada

Fármaco e produtos de degradação	Controle	Insumo farmacêutico ativo		Implante intravítreo		Origem
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	
Acetazolamida	100,0000	98,7112	98,8433	98,4734	98,1458	Ativo
RRT~ 0,402	-	0,0021	0,0020	-	-	PD
RRT~ 0,446	-	0,0358	0,0372	0,0759	0,0802	PD
RRT~ 0,516	-	-	-	0,0031	0,0028	PD
RRT~ 0,578	0,0113	0,0261	0,0270	0,0428	0,0440	IS + PD
RRT~ 0,871	-	-	-	0,0284	0,0265	PD
RRT~ 1,303	-	0,0021	0,0022	-	-	PD
RRT~ 1,238	-	-	-	0,0076	0,0085	PD
RRT~ 1,551	-	0,0019	0,0020	0,0010	0,0010	PD
RRT~ 1,820	0,0844	0,0874	0,0884	0,0690	0,0722	IS
RRT~ 2,109	-	0,0021	0,0019	0,0091	0,0077	PD
RRT~ 2,234	-	0,0057	0,0057	0,0034	0,0041	PD
RRT~ 2,278	-	-	-	0,0008	0,0011	PD
RRT~ 2,437	-	0,0019	0,0020	0,0011	0,0012	PD
RRT~ 2,462	NA	NA	NA	NA	NA	Diluyente
RRT~ 2,518	NA	NA	NA	NA	NA	Diluyente
RRT~ 2,659	NA	NA	NA	NA	NA	Diluyente
Teor (%)	100,0000	98,7112	98,8433	98,4734	98,1458	-
Decaimento (%)	0,0000	1,2888	1,1567	1,5266	1,8542	-
Impurezas totais (%)	0,0975	0,1651	0,1684	0,2701	0,2493	-
Balanço de massas (%)	100,0975	98,8763	99,0117	98,7435	98,3951	-

IS: impureza de síntese — NA: presente, mas não quantificado – PD: produto de degradação – RRT: tempo de retenção relativo

Tanto o insumo farmacêutico ativo quanto os implantes intravítreos contendo acetazolamida foram estáveis no estudo de estabilidade acelerada, durante os seis meses, uma vez que o teor do fármaco se manteve dentro das especificações de 98,0-102,0% para o IFA e entre 90,0-110,0% para o produto final e que foram cumpridos os critérios estabelecidos para impurezas desconhecidas, pois nenhuma impureza individual superou 0,1% e a soma de impurezas foi inferior a 1,0%, especificações preconizadas nos compêndios oficiais para o IFA e adotadas neste estudo.

Não houve diferença significativa entre resultados encontrados para 3 ou 6 meses de estudo, mas em contraste com o que se verificou durante estudo de compatibilidade fármaco-excipientes, observou-se maior formação de produtos de degradação, qualitativa e quantitativamente (entre 50-65% maior), nos implantes intravítreos que no IFA. A diferença no teor deve-se não só ao maior número de produtos observados, mas ao fato de que as recuperações dos produtos $RRT \sim 0,446$ e $RTT \sim 0,578$, dois dos produtos de degradação mais relevantes e com maior concentração, foram duas vezes maior nos implantes intravítreos que no IFA. Conclui-se, por isso, que os implantes intravítreos poderiam ser comercializados com prazo de validade de, pelo menos, 2 anos.

As duas impurezas foram encontradas no estudo de degradação forçada. O produto de $RRT \sim 0,578$ é uma impureza de síntese e produto de degradação mais importante, que foi reportado na amostra controle, mas encontrado em maiores quantidades nas amostras degradadas do estudo de degradação, especialmente nas condições de hidrólise por pH. O produto de $RRT \sim 0,446$ foi reportado apenas para a mistura física, na condição de hidrólise alcalina. Portanto, é lógico admitir que esses produtos decorram do efeito hidrolítico da umidade sobre o fármaco, provavelmente intensificado na temperatura mais elevada utilizada durante o estudo. No geral, o perfil de degradação real foi coerente com o perfil de degradação potencial proposto no estudo de degradação, uma vez que a maioria dos produtos de degradação encontrados haviam sido reportados anteriormente, exceto pelos produtos de $RRT \sim 2,054$, $RRT \sim 2,278$ e $RRT \sim 2,364$ encontrados no implante intravítreo e $RRT \sim 2,107$ encontrado no IFA. Todos estes produtos, no entanto, foram reportados em quantidades inferiores a 0,01%.

Deve-se discutir que o estudo de estabilidade acelerado não foi realizado apropriadamente, uma vez que não foi realizado com o produto em sua embalagem primária, indisponível, mas em embalagem simulada, muito mais permeável. Desse modo, espera-se que, quando armazenada em sua embalagem primária ou dispositivo para inserção, a estabilidade seria

aumentada. Estes resultados devem orientar, portanto, o desenvolvimento de uma embalagem primária impermeável, para prevenir a penetração de umidade no interior do medicamento, que parece ser o fator mais importante para degradação do fármaco. Este cuidado deve ser recomendado nas condições de armazenamento informadas no rótulo e bula do produto, que deve conter precauções de armazenamento no que se refere a outras condições, como temperatura que, mesmo aparentemente não sendo fonte de instabilidade direta para o fármaco, pode fomentar os efeitos deletérios da umidade e ainda modificar o aspecto e propriedades físico-químicas do implante intravítreo, se superar sua Tg.

3.4 Controle de qualidade físico-químico dos implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida

3.4.1 Determinação de peso médio

Estão apresentados na **Tabela 31** os pesos registrados para 20 unidades dos implantes intravítreos, como preconizado no método geral da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). Encontrou-se peso médio de $1,27 \pm 0,05$ mg para os implantes intravítreos.

Tabela 31 – Determinação de peso dos implantes intravítreos

Unidade	Peso (mg)	Variação (%)	Unidade	Peso (mg)	Variação (%)
1	1,24	-2,05	11	1,34	5,85
2	1,33	5,06	12	1,31	3,48
3	1,22	-3,63	13	1,17	-7,58
4	1,18	-6,79	14	1,20	-5,21
5	1,30	2,69	15	1,25	-1,26
6	1,29	1,90	16	1,28	1,11
7	1,29	1,90	17	1,30	2,69
8	1,27	0,32	18	1,32	4,27
9	1,23	-2,84	19	1,33	5,06
10	1,19	-6,00	20	1,28	1,11
Média	-	-	-	-	1,27
DPR (%)	-	-	-	-	4,19

DPR: desvio padrão relativo – mg: miligrama

Todas as unidades apresentaram variação em relação ao peso médio entre $\pm 10,0\%$ e o DPR foi menor que $5,0\%$. Depois de definido o peso médio, unidades produzidas que variaram mais que $\pm 10,0\%$ do peso médio foram descartadas para os ensaios de controle de qualidade e estudos *in vivo* posteriores, mas o percentual de unidades fora da especificação foi inferior a $10,0\%$.

3.4.2 Determinação de comprimento, diâmetro e volume e área superficial

Tamanho, área superficial e volume dos implantes intravítreos foram determinados com paquímetro digital e pelas equações para área superficial e volume de cilindros, formato observado para os dispositivos por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 32**. Os implantes intravítreos apresentaram dimensões próximas aos valores padronizados durante sua produção, com comprimento médio de $5,00 \pm 0,02$ mm e espessura média de $0,44 \pm 0,01$ mm, suficientemente pequena para ser inserido nos olhos por trocarte transescleral. A área superficial e volume médios foram de, respectivamente, $7,34 \pm 0,18$ mm² e $0,79 \pm 0,04$ mm³. Encontrou-se DPR nos ensaios inferior a $5,0\%$ e nenhuma unidade apresentou variação superior a $\pm 10,0\%$.

Tabela 32 – Determinação de comprimento, espessura, área e volume dos implantes intravítreos

Unidade	Ensaio				
	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Espessura (mm)	Área (mm ²)	Volume (mm ³)
1	1,24	4,98	0,44	7,19	0,76
2	1,33	5,01	0,45	7,40	0,80
3	1,22	5,00	0,44	7,22	0,76
4	1,18	5,02	0,45	7,41	0,80
5	1,30	4,97	0,45	7,34	0,79
6	1,29	4,99	0,47	7,71	0,87
7	1,29	4,97	0,44	7,17	0,76
8	1,27	5,01	0,44	7,23	0,76
9	1,23	5,02	0,45	7,41	0,80
10	1,19	5,04	0,45	7,44	0,80
11	1,34	4,95	0,44	7,15	0,75
12	1,31	5,01	0,44	7,23	0,76
13	1,17	5,01	0,46	7,57	0,83
14	1,20	5,00	0,45	7,39	0,80
15	1,25	5,02	0,46	7,59	0,83
16	1,28	4,99	0,44	7,20	0,76
17	1,30	4,98	0,43	7,02	0,72
18	1,32	5,02	0,46	7,59	0,83
19	1,33	5,00	0,45	7,39	0,80
20	1,28	5,01	0,44	7,23	0,76
Média	1,27	5,00	0,45	7,34	0,79
DPR (%)	4,19	0,44	2,16	2,44	4,52

DPR: desvio padrão relativo – mg: miligrama – mm: milímetro

3.4.3 Desenvolvimento de método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência e espectrometria de massas sequencial para quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, implantes intravítreos e fluidos biológicos

Visto que se objetivava quantificar o fármaco em estudo farmacocinético, em amostras oculares de natureza complexa, nas quais a concentração do fármaco pode estar em níveis muito baixos, decidiu-se usar cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas sequencial no desenvolvimento, por sua maior seletividade e detectabilidade.

No desenvolvimento do método, não foi possível adquirir um padrão interno isotópico, em virtude do seu custo. Por isso, outros fármacos de estrutura química relacionada, grande

disponibilidade com pureza requerida e custo acessível, foram avaliados, como a sulfonamida sulfadiazina ou o inibidor da anidrase carbônica dorzolamida. Diversos estudos propuseram o uso de sulfadiazina como padrão interno para o fármaco, mas estudos preliminares durante o desenvolvimento mostraram que a dorzolamida seria uma alternativa mais viável, por razões distintas.

Primeiramente, não se encontrou resolução entre sulfadiazina e analito durante as corridas realizadas, mas sim para a dorzolamida, que se separou muito mais facilmente do analito. Esse comportamento se justifica porque, como se observa na **Tabela 33**, a sulfadiazina possui estrutura, massa molar e propriedades físico-químicas muito similares ao analito, como coeficiente de partição, constante de dissociação ácida e solubilidade em meio aquoso, enquanto a dorzolamida, mesmo sendo do mesmo grupo, possui apenas coeficiente de partição e dissociação parecidos, mas difere consideravelmente quanto ao massa molar, estrutura e outras propriedades físico-químicas, com solubilidade cerca de 15 vezes superior. No geral, resolução entre analito e padrão interno não é parâmetro exigido para métodos por espectrometria de massas, como no método proposto por Li *et al.* (2014), em que se percebe coeluição entre acetazolamida e sulfadiazina. Contudo, a separação contribui para um método ainda mais seletivo e foi, portanto, considerada desejável.

Tabela 33 – Propriedades físico-químicas de analito e padrões internos

Propriedade físico-química	Acetazolamida	Sulfadiazina	Dorzolamida
Massa molar (g/mol)	222,3	250,3	324,4
Coeficiente de partição (log P)	-0,26	-0,20	-0,12
Constante de dissociação ácida (pka)	7,20	6,85	6,88
Solubilidade em H ₂ O (mg/mL)	0,98	< 1,0	14,00

Trotzmuller *et al.* (2010) discutiram ser recomendável o uso de padrões internos de massa molar superior a 300 Da, para que se reduza a interferência ou background químico durante a quantificação por massas. Esse foi outro fator ponderado na escolha pela dorzolamida, único fármaco que cumpria esse requisito. Deve-se mencionar ainda que o fármaco ionizou-se mais facilmente nos modos positivo e negativos que as sulfonamidas e que era conveniente desenvolver único método que pudesse ser, posteriormente, validado para quantificar dorzolamida nos implantes intravítreos e fluidos biológicos oculares, fármaco utilizado em

trabalhos paralelos pelo grupo de pesquisa. Decidiu-se, pelos motivos discutidos, utilizar a dorzolamida como padrão interno.

Seletividade, expressa pela quantidade de interferentes presentes, e detectabilidade, mensurada pela intensidade do sinal para analito e padrão interno, orientaram uma otimização criteriosa dos parâmetros espectrométricos. Diferente do consenso e do que argumentam De Vijlder *et al.* (2017), o modo negativo foi equiparável no quesito detectabilidade ao positivo, geralmente priorizado para quantificar fármacos por ser mais sensível. A divergência se justifica pela estrutura química de analito e padrão interno, fracamente ácidos, que favorece sua ionização no mecanismo de desprotonação regido no modo negativo. Outro critério favorável foi que ensaios no modo negativo demonstraram-se muito mais seletivos, menos suscetíveis a interferências, uma vez que um número limitado de substâncias químicas ioniza-se nesse cenário, como discutido por Gioumouxouzis *et al.* (2015).

Posteriormente, perfis de fragmentação do íon precursor de analito (m/z 221) e padrão interno (m/z 323) foram obtidos, em diferentes níveis de energia de colisão (20-40 V). Os espectros de massas obtidos pós-fragmentação são demonstrados na **Figura 31** e na **Figura 32**. Dois fragmentos mais intensos e mais estáveis para cada analito foram escolhidos, conforme **Tabela 34**, mantendo-se o fragmento de maior intensidade para quantificação e o fragmento secundário para confirmação. Preferencialmente, o uso de fragmentos com razão m/z menor que 100 Da, mais vulneráveis a interferências químicas, deve ser evitado, mas os outros íons produto encontrados para o analito foram muito pouco intensos ou muito instáveis, comprometendo a detectabilidade do método desenvolvido. Os resultados encontram-se em consonância com estudo de Li e *et al.* (2014), o único trabalho no qual o fármaco foi monitorado no modo negativo, nas mesmas transições.

Figura 31 – Espectro de massas para o fármaco acetazolamida obtido em modo de aquisição negativo depois de fragmentação do íon precursor de razão massa-carga (m/z) 221.

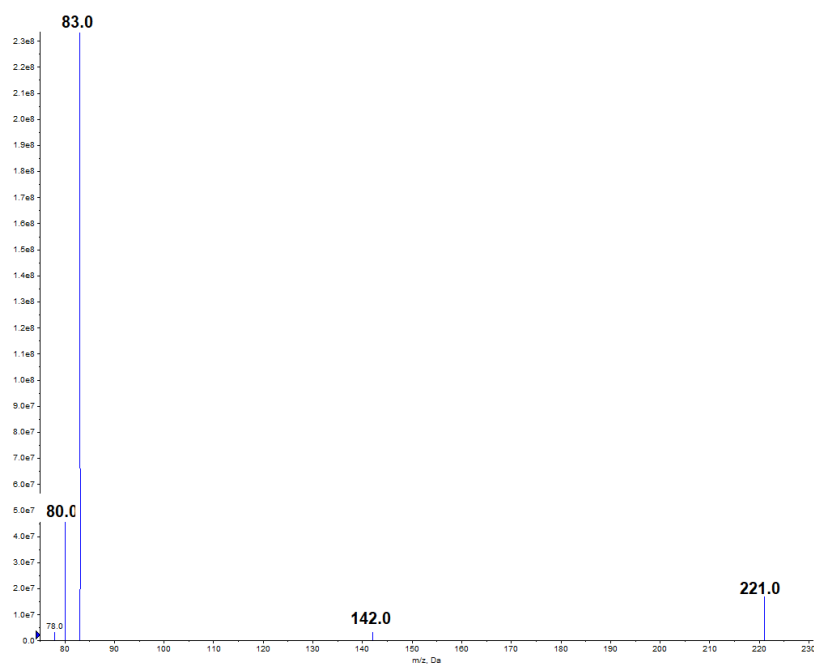


Figura 32 – Espectro de massas para o padrão interno dorzolamida obtido em modo de aquisição negativo depois de fragmentação do íon precursor de razão massa-carga (m/z) 323.

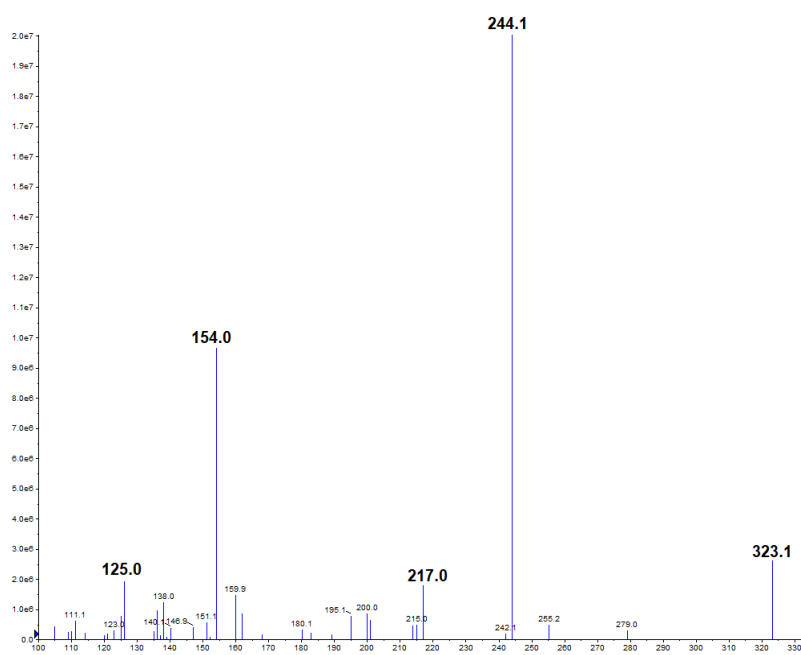
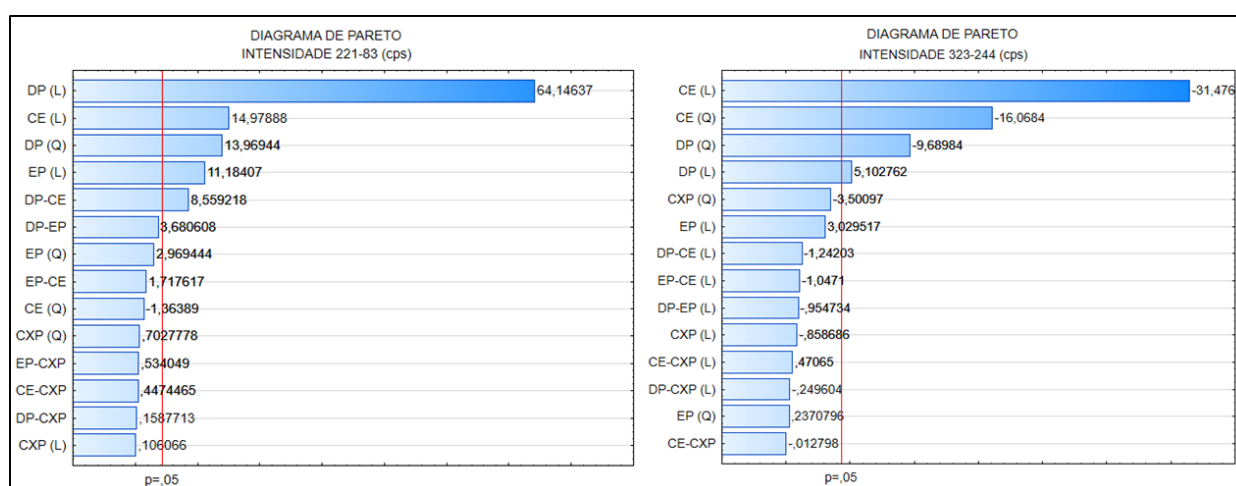


Tabela 34 – Transições de massa de quantificação e confirmação para analito e padrão interno

Fármaco	Transição	
	Quantificação (m/z)	Confirmação (m/z)
Acetazolamida	221 → 83	221 → 80
Dorzolamida	323 → 244	323 → 154

Depois, os parâmetros de ionização e fragmentação, como potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP) foram otimizados por planejamento experimental, monitorando-se não só a influência individual dos parâmetros na intensidade, mas prováveis interações entre dois ou mais fatores. Na **Figura 33**, apresenta-se diagrama de Pareto que, concomitantemente com ANOVA (p -valor < 0,05), mostram quais parâmetros exercem influência significativa sobre as intensidades das transições de quantificação de analito e padrão interno.

Figura 33 – Diagramas de Pareto obtidos por planejamento de composto central (CCD) durante avaliação da influência dos parâmetros de ionização e fragmentação potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE), potencial de saída da célula de entrada (CXP) e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o fármaco acetazolamida (parte esquerda) e para o padrão interno dorzolamida (parte direita), com evidência de parâmetros críticos a nível de significância de 0,05.



Tanto o potencial de desagregação quanto a energia de colisão foram significativos para analito e padrão interno, enquanto potencial de entrada foi significativo apenas para analito e potencial da célula de entrada não exerceu influência para nenhum. Para o analito, a interação

entre DP e CE foi significativa, resultado que reforça a necessidade de procedimento multivariado de otimização. O DP, o mais influente, é parâmetro crítico na determinação de analitos e deve ser estritamente controlado, porque é responsável por prevenir ou pelo menos minimizar a formação dos *clusters*, aglomerados formados entre moléculas da fase móvel não evaporadas e íons precursores. Por isso, deve ser suficientemente grande para fornecer aos íons precursores energia necessária para se desagregar dos *clusters* e permitir sua passagem no primeiro quadrupolo. Entretanto, se for desnecessariamente grande, poderia induzir uma fragmentação antes do momento certo, repercutindo negativamente na detectabilidade e linearidade da resposta.

No caso da CE, energia fornecida para o precursor ser direcionado para a célula de colisão, para fragmentação, deve-se definir nível suficiente para que a fragmentação ocorra, mas que não cause fragmentação secundária dos íons produto. Caso seu valor seja muito baixo ou muito elevado, o método sofreria perda de detectabilidade. Para o padrão interno, observou-se que maiores CE favorecem a formação do fragmento de razão m/z 154, mais difícil de ser formado, enquanto CE mais brandos intensificam a formação do fragmento de razão m/z 244, mais facilmente produzido. O EP, em contrapartida, refere-se ao potencial aplicado para guiar os íons precursores ao primeiro quadrupolo e, no geral, possui menos influência que outros parâmetros na resposta.

Com os dados obtidos no planejamento experimental, foram propostos modelos matemáticos, com resíduos normais e independentes, erro puro e falta de ajuste não significativos e excelente correlação entre resultados experimentais e previstos, que foram utilizados para se obter superfícies de resposta, separadamente, para analito e padrão interno, dispostas na **Figura 34** e na **Figura 35**, respectivamente.

Pela inspeção visual das superfícies de resposta, percebeu-se que, para o analito, quanto menos negativos os valores de DP, EP e CE, maior a intensidade do sinal, independentemente do CXP, que pouco influenciou na resposta. Para o padrão interno, as maiores intensidades do sinal foram adquiridas quando DP e CE foram mantidos próximos ao ponto central, enquanto EP e CXP pouco influenciaram na resposta. Juntamente com a ferramenta preditiva disponível no *software*, a avaliação das superfícies de resposta permitiu determinar condições ótimas para parâmetros de ionização e fragmentação dos dois fármacos, sumarizadas na **Tabela 35**. O modelo mostrou grande poder preditivo, uma vez que respostas experimentais foram compreendidas entre 87-90% das respostas preditas e o procedimento multivariado

incrementou a detectabilidade do método em 22 e 46% para analito e padrão interno, respectivamente, quando comparado aos resultados obtidos nos parâmetros determinados univariadamente pelo *software*, muito provavelmente por causa de interações significativas.

Tabela 35 – Parâmetros espectrométricos otimizados por planejamentos experimentais para analito e padrão interno

Parâmetro	Analito	Padrão interno
Potencial de desagregação (V)	-100	-140
Potencial de entrada (V)	-2	-2
Energia de colisão (V)	-20	-35
Potencial da célula de saída (V)	-4	-14
Gás de colisão (psi)	10	10
Gás contracorrente (psi)	10	10
Voltagem do capilar (V)	-3500	-3500
Temperatura (°C)	650	650
Gás de nebulização (psi)	50	50
Gás de secagem (psi)	40	40

V: volts

Figura 34 – Superfícies de resposta obtidas por planejamento de composto central (CCD) durante avaliação da influência dos parâmetros de ionização e fragmentação potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE), potencial de saída da célula de entrada (CXP) e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o fármaco acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83), para definição de condições ótimas de análise.

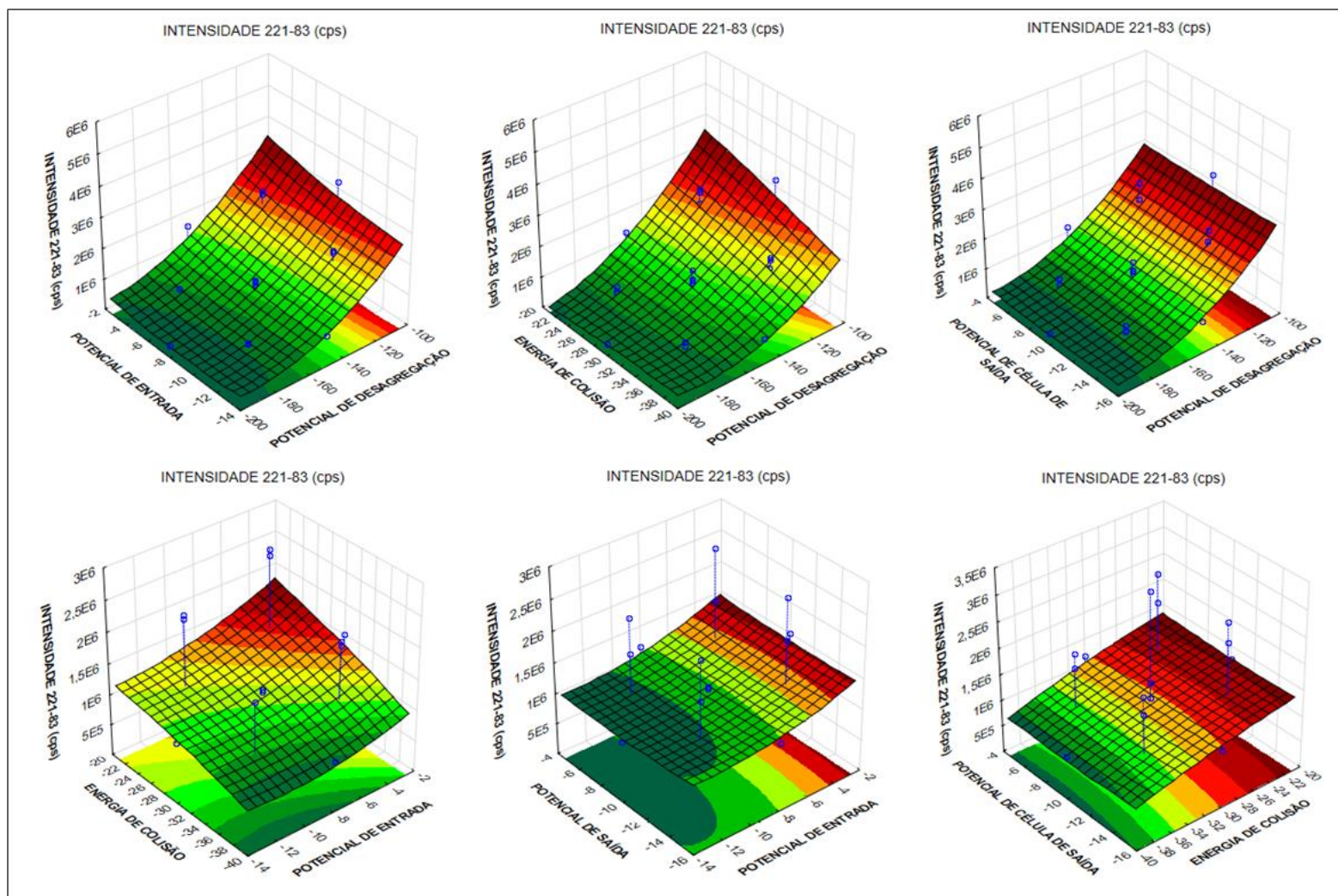
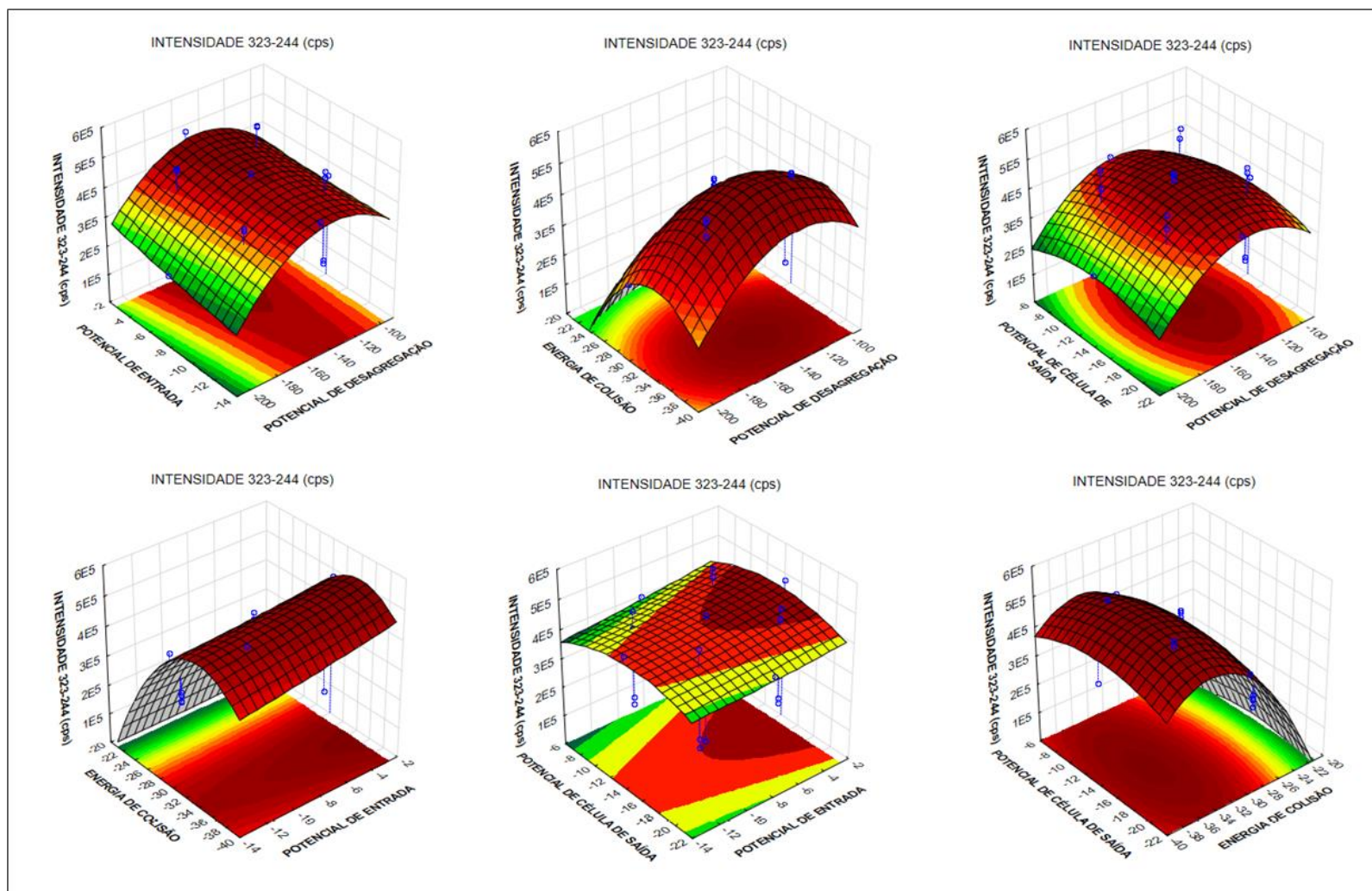


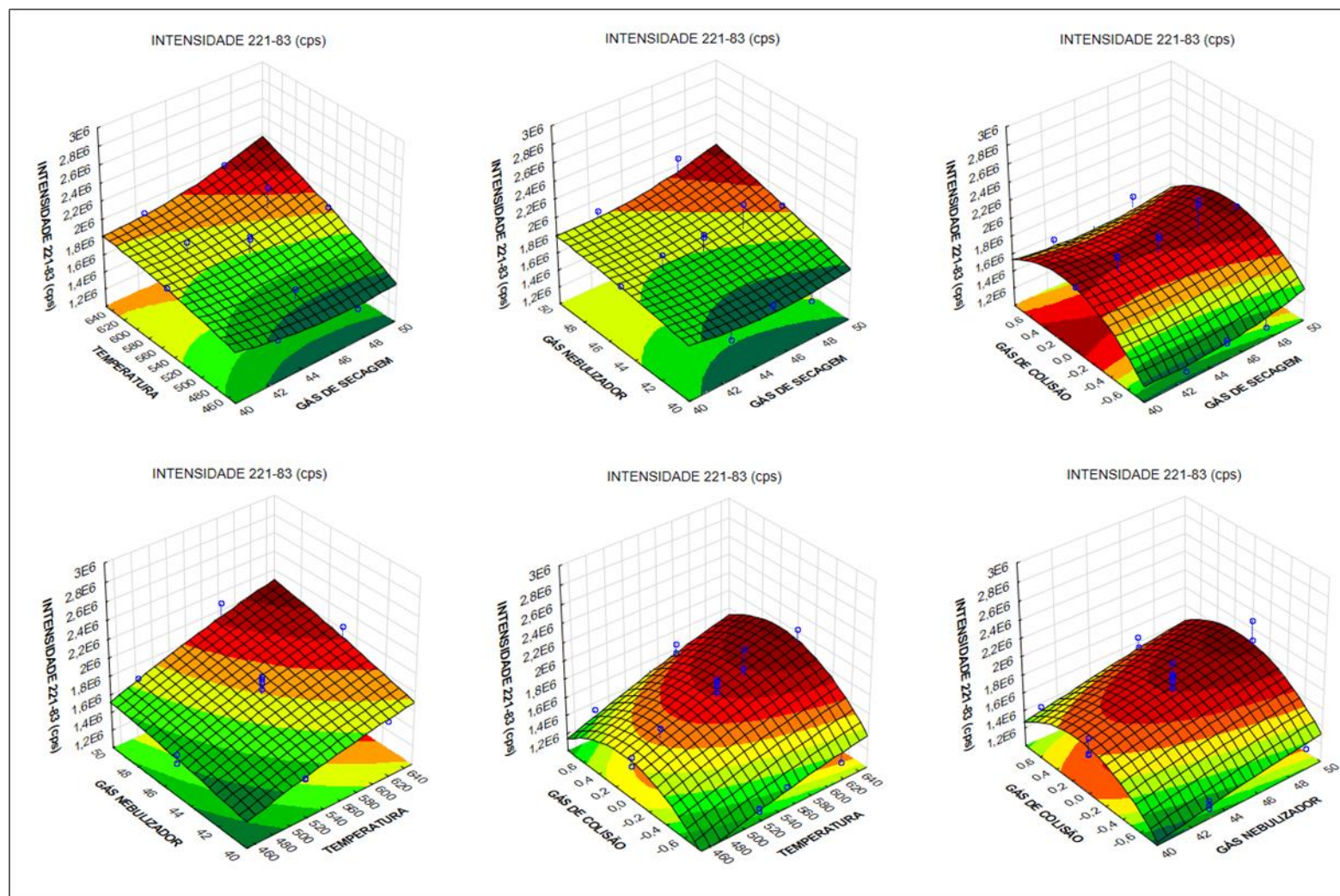
Figura 35 – Superfícies de resposta obtidas por planejamento de composto central (CCD) durante avaliação da influência dos parâmetros de ionização e fragmentação potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE), potencial de saída da célula de entrada (CXP) e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o para o padrão interno dorzolamida (razão massa-carga m/z 323-244), para definição de condições ótimas de análise.



Estudos prévios mostraram que, dentre os parâmetros da fonte de ionização *electrospray*, voltagem do capilar e pressão do gás contracorrente não foram significativos e, portanto, foram fixados nos níveis pré-determinados pelo equipamento. Diferentemente do usual, o gás contracorrente foi mantido no seu nível intermediário. Normalmente, recomenda-se que o parâmetro, responsável por repelir gotas dos solventes e outros interferentes não-ionizados para minimizar o risco de contaminação, deve ser mantido nos maiores níveis, mas foi observado que, em 15 psi, o gás reduziu notadamente a detectabilidade do método e, por isso, foi necessário utilizar os níveis intermediários.

Todos os outros parâmetros significativos para a resposta ($p\text{-valor} < 0,05$), como gás de colisão (CID), temperatura, gás de secagem (GS1) e gás de nebulização (GS2), foram investigados por planejamento experimental Doehlert, a partir do qual se construiu um modelo matemático, com erro puro e falta de ajuste não significativos, resíduos normais e independentes e suficiente grau de correlação entre resultados previstos e experimentais, usado para estimar superfícies de resposta, apresentadas na **Figura 36**. Inspeção visual das superfícies de respostas evidenciou que maiores resultados para a intensidade da transição m/z 221→83 do analito foram encontrados para maiores níveis de GS1, GS2 e temperatura e para níveis intermediários de CID, próximos ao ponto central, o que foi confirmado pela ferramenta preditiva do *software*. Os parâmetros ótimos estão descritos na **Tabela 35**, apresentada anteriormente e repercutiram em aumento de cerca de 25% na resposta, com 87% de poder preditivo.

Figura 36 – superfícies de resposta obtidas por planejamento Doehlert durante avaliação da influência dos parâmetros da fonte electropray gás de secagem, gás nebulizador, gás de colisão e temperatura e suas interações secundárias, na intensidade da transição de massa de quantificação para o fármaco acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83), para definição de condições ótimas de análise.



Depois de definidos os parâmetros espectrométricos, focou-se na separação cromatográfica. Para fase estacionária, o desenvolvimento foi iniciado com coluna octadecilsilano (C18), conforme proposto na maioria dos métodos disponíveis para a acetazolamida. Entretanto, o gradiente exploratório demonstrou que analito e padrão interno ficavam fracamente retidos na coluna, com eluição próxima ao volume morto. Este comportamento se manteve para colunas C18 de outros lotes e marcas, colunas C18 contendo partículas de núcleo fundido e outras fases estacionárias também apolares, como C8 e fenil, que não foram, portanto, empregadas no decorrer do desenvolvimento do método. A ineficiência destas fases estacionárias na separação cromatográfica dos analitos justifica-se porque tanto fármaco quanto padrão interno apresentam $\log P$ menores que 0 e, portanto, são pouco lipossolúveis, interagindo muito fracamente com grupos apolares.

Visando superar esse problema, os métodos já descritos na literatura que empregaram fases estacionárias apolares usaram fase móvel com pouco poder eluotrópico, composta por nove partes ou mais de fase aquosa, nas quais o analito ficava suficientemente retido. Essa alternativa não foi, no entanto, aplicável para o presente método, uma vez que uma proporção excessiva de fase aquosa na composição da fase móvel é extremamente prejudicial para métodos espectrométricos com ionização por *electrospray*, porque a fase aquosa evapora com mais dificuldade do que solventes orgânicos e suprime a ionização do analito e padrão interno, reduzindo sua detectabilidade. Narapusetti *et al.* (2015) foram os únicos a desenvolver um método com fase móvel composta majoritariamente por fase orgânica (70% de acetonitrila), mas nos cromatogramas fornecidos pelos autores, percebe-se que a acetazolamida eluiu em menos de um minuto, evidenciando uma retenção insuficiente na coluna cromatográfica utilizada, segundo boas práticas em cromatografia (SNYDER *et al.*, 2009).

Testou-se, posteriormente, a fase estacionária cianopropil, que possui uma polaridade intermediária, em fase reversa. Diferentemente do que se observou anteriormente, na coluna ciano notou-se enorme diferença na retenção de analito, que era pobremente retido, com eluição próxima ao volume morto, e padrão interno, extensivamente retido, com eluição apenas depois de 10-15 minutos, mesmo em maiores proporções de fase orgânica. A retenção do analito era adequada somente para proporções superiores a 85% de fase aquosa, que não só eram incompatíveis com a espectrometria de massas, como produziam picos do padrão interno com ombros, caudas ou inteiramente repartidos, mesmo quando se aumentava gradativamente a proporção de fase orgânica. Concluiu-se, portanto, que o modo em fase

reversa não seria adequado para o desenvolvimento do método, partindo-se para experimentos com cromatografia de interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic-interaction liquid chromatography*), geralmente recomendada para analitos mais polares e fracamente retidos e na qual a separação cromatográfica se processa em fase móvel composta predominantemente por solvente orgânico, com proporções de fase aquosa entre 5-20%, o que faria com que analito e padrão interno se ionizassem com mais facilidade por *electrospray*.

Diferentes fases estacionárias mais polares, como sílica-gel, troca catiônica e zwitteriônica foram avaliadas, mas não apresentaram bons resultados, porque não conseguiram separar os dois fármacos com a resolução necessária. Todavia, o uso da coluna cianopropil no modo HILIC mostrou-se muito eficiente, permitindo resolução superior a 1,5 para analito e padrão interno, em corridas curtas, menores que 10 minutos, sob eluição em modo isocrático, cumprindo os critérios de adequabilidade do sistema de picos simétricos, finos e com boa relação sinal ruído. Os resultados favoráveis podem ser justificados porque, por sua polaridade intermediária, uma coluna ciano no modo HILIC mistura mecanismos de partição e adsorção no processo de separação. Desse modo, a coluna cianopropil, de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 3,5 micrômetros, foi selecionada como fase estacionária. Para o doseamento, apenas o método de Chinta *et al.* (2021) propôs o uso de coluna ciano, de mesmas dimensões, mas partículas menores.

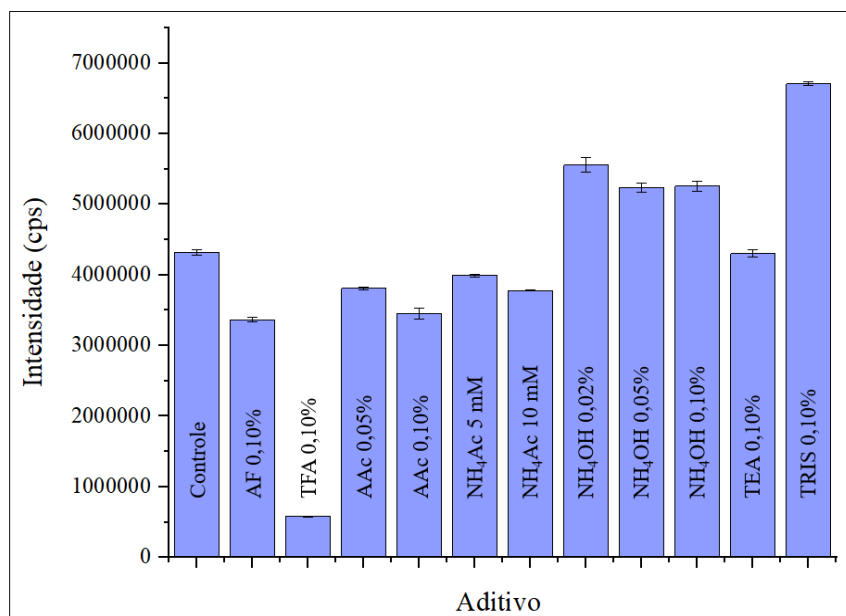
No estudo da composição da fase móvel, inúmeros solventes e aditivos foram avaliados. Entre os solventes orgânicos, a investigação mostrou que o metanol causava notável interferência química nas análises, em virtude da presença de interferente de mesma razão m/z e perfil de fragmentação semelhante ao analito. Desse modo, nas corridas com metanol, observava-se uma linha de base com mais ruído, que afetava negativamente parâmetros de detectabilidade, como razão sinal e ruído e limite de quantificação. Este efeito é previsível, uma vez que, como discutiram Trotsmuller *et al.* (2010), a faixa de razão m/z compreendida entre 30 e 300 Da mostra-se especialmente suscetível a interferências quando se utiliza ionização por *electrospray* no modo negativo. A hipótese foi confirmada pela varredura do metanol puro, grau cromatográfico, de diferentes marcas, nos modo *full scan*, monitoramento seletivo de íons e íon produto, que apresentaram interferentes de razão m/z 221 que fragmentavam nas razões m/z 83 e 80, como a acetazolamida. Além disso, é importante ressaltar que não foram utilizados solventes com grau espectrométrico, indisponíveis no laboratório em virtude do seu alto custo, o que pode justificar a interferência química observada.

Estes autores e Lentz e Houk (2007) afirmaram que o inevitável *background* químico observado deve-se à presença de contaminantes ou impurezas encontradas no solvente, provenientes do processo de produção, aos aditivos, materiais de tubulação e outras partes integrantes dos equipamentos, como o polímero poliéter-éter-cetona, vidrarias e outros utensílios de natureza polimérica, de contaminantes na fonte de ionização ou nos gases utilizados ou ainda de agregados estáveis entre solventes, contaminantes e aditivos, formados por agregação ou solvatação e pode ser minimizado por ajustes nos parâmetros espectrométricos e pelo uso de solventes e reagentes mais puros, o que não foi suficiente para o metanol.

O metanol apresentou ainda um poder eluotrópico muito maior que a acetonitrila para analito e padrão interno no modo HILIC, causando pouca retenção, ausência de resolução e deformação dos picos, com grande fator de cauda ou divididos. Nem mesmo o uso de menores percentuais de metanol, em misturas com acetonitrila, foi capaz de reduzir o impacto negativo do metanol. Em contrapartida, não foram encontrados picos interferentes com razão m/z do analito ou padrão interno quando se utilizou acetonitrila, que foi eficaz na separação dos picos com resolução e simetria. Deve-se, novamente, mencionar outras vantagens da acetonitrila, como menores pressões operacionais e menor toxicidade. Decidiu-se, portanto, utilizar apenas acetonitrila como solvente orgânico nas etapas seguintes do desenvolvimento analítico.

Durante pesquisa bibliográfica, pode-se perceber que o uso de aditivos para controle do pH na fase móvel foi imprescindível e muito comum para o fármaco acetazolamida. Esse comportamento pode ser explicado porque o fármaco é um ácido fraco, que possui duas constantes de dissociação e, por isso, dependendo do pH da fase móvel e diluente, pode coexistir em quatro microespécies diferentes, com propriedades físico-químicas, inclusive polaridade, distintas, algo que poderia interferir na qualidade da separação cromatográfica. No caso particular do analito, esse cenário muito mais desafiador ocorre para pH entre 5,5 e 7,5, que deve ser evitado. Considerando-se a faixa de pH compatível com a coluna cianopropil, entre 2-8, seria necessário manter o pH inferior a 5,5 ou próximo a 8. Todavia, o uso de aditivo deve ser avaliado não apenas na parte cromatográfica, uma vez que muitos aditivos podem interferir na ionização dos fármacos. Por isso, para se conseguir perfil cromatográfico mais satisfatório e mais reprodutível, o efeito de diversos aditivos, necessariamente voláteis, na intensidade das respostas do analito foi monitorado em modo MRM e encontram-se ilustrados na **Figura 37**.

Figura 37 – Efeito dos aditivos modificadores de pH ácido fórmico (AF 0,1% v/v), ácido trifluoroacético (TFA, 0,1 % v/v), ácido acético (AAc 0,05% v/v e 0,1% v/v), acetato de amônio (5 e 10 mmol/L), hidróxido de amônio (0,02% v/v, 0,05% v/v e 0,1% v/v), trietilamina (TEA, 0,1% v/v) e tris-hidroximetilaminoetano (TRIS, 10 mmol/L) na intensidade do sinal de transição de massa de quantificação da acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83)



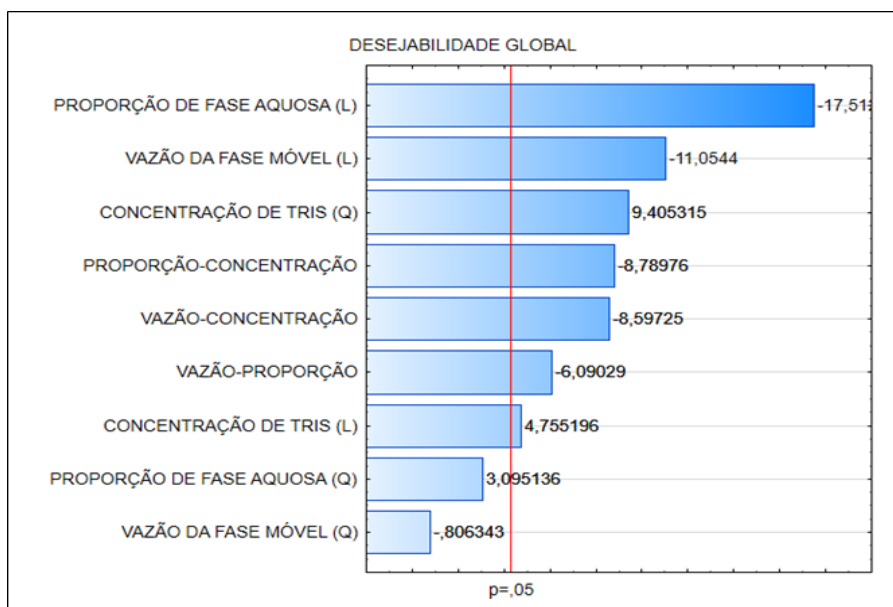
No geral, os métodos disponíveis mantiveram o pH da fase móvel mais ácido, capaz de manter o analito e padrão interno quase que exclusivamente na forma não-ionizada. Entretanto, notório efeito supressor foi observado para os aditivos ácidos propostos, mesmo com o ácido fórmico, utilizado como modificador de pH no outro método por espectrometria de massas no modo negativo, desenvolvido por Narapusetti *et al.* (2014). Esse efeito era esperado, pois, por sua capacidade em doar prótons e maior acidez, interferem no mecanismo de ionização no modo negativo e ionizam-se mais rapidamente e mais facilmente que analito e padrão interno. Previsivelmente, o efeito supressor foi maior quanto menor era a constante de dissociação do ácido e quanto maior era sua concentração. Para o ácido fórmico e ácido acético, o efeito supressor ocorre parcialmente pela formação dos adutos formiato e acetato, comuns no modo negativo, que não foram monitorados no estudo. Para o ácido trifluoroacético, parte do efeito atribui-se ao seu funcionamento como pareador iônico, que promove instabilidade no *spray*. Por isso, para assegurar que um método com maior detectabilidade fosse desenvolvido, os aditivos ácidos foram contraindicados.

Efeito supressor pouco menor e não significativo foi reportado para o sal acetato de amônio, que, nas concentrações usadas, origina tampões de pH levemente acidificado, próximo a 5. Este sal interfere mais brandamente na ionização do analito e padrão interno, muito mais pela formação mais pronunciada de aduto que por sua capacidade de doar prótons, mas mostrou-se pouco solúvel em acetonitrila experimentalmente, um fator operacional que limitou o seu uso. Por raciocínio oposto, o uso de aditivos alcalinos no modo negativo deveria contribuir para ionização dos fármacos, exercendo efeito indutor. Todos os resultados obtidos corroboram com essa afirmativa, uma vez que as intensidades encontradas foram maiores do que para condição controle, sem aditivo nenhum. Exceção deve ser feita para a trietilamina, para a qual se nota efeito supressor, por originar adutos e por ser pareador iônico.

Desempenhos positivos na resposta foram demonstrados para tris-hidroximetil-aminoetano e hidróxido de amônio, que exibiram efeito indutor significativo para analito e ainda mais pronunciado para padrão interno. Entre eles, decidiu-se empregar o primeiro aditivo na composição de fase móvel, pois o seu efeito indutor foi moderadamente maior e porque, nas concentrações utilizadas, resultava em misturas com pH dentro dos limites recomendados pelo fornecedor da coluna, enquanto misturas com o hidróxido de amônio eventualmente apresentavam pH que superava 8. Deve-se destacar que em pH maior ou igual a 7,5, o fármaco apresenta-se predominantemente em única microespécie, como desejado, mas na forma duplamente ionizada.

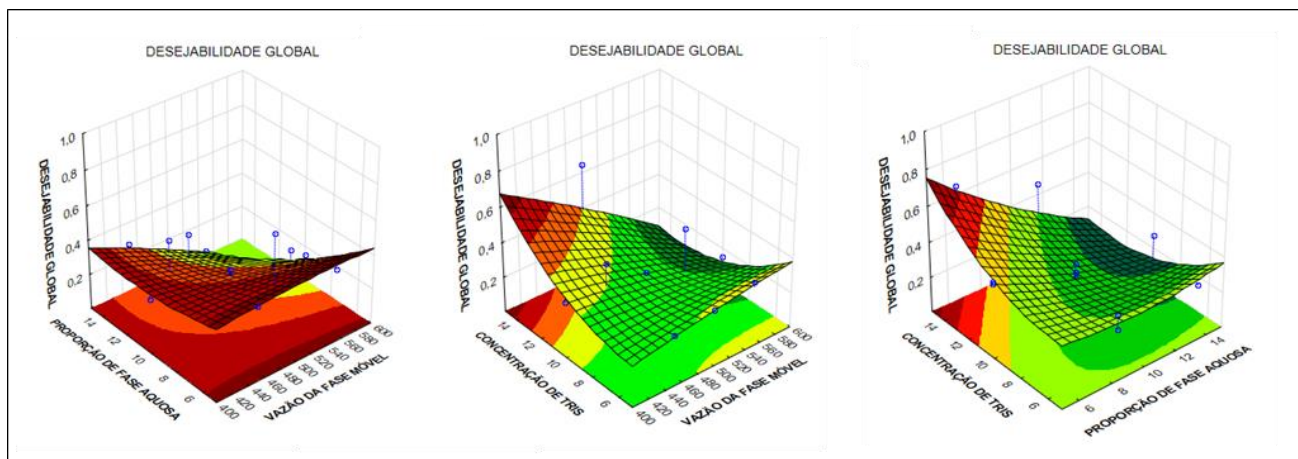
Em seguida, ajustes na composição da fase móvel e outros parâmetros foram realizados por planejamento experimental, monitorando-se o efeito das variáveis na razão sinal:ruído, medida indireta da detectabilidade do método, fator de retenção e resolução, que foram combinadas em uma única resposta por desejabilidade, mais a assimetria, analisada individualmente. Por uma limitação operacional, não foi possível incluir a temperatura do forno da coluna no planejamento, adotando-se temperatura ambiente (21 °C) nas análises. O diagrama de Pareto apresentado na **Figura 38** e ANOVA permitiram concluir que todos os parâmetros foram significativos, mas que a proporção de fase aquosa foi o fator mais influente, como esperado, uma vez que, no modo HILIC, diferentemente da fase reversa, a fase aquosa possui maior poder eluotrópico, interferindo diretamente no fator de retenção, resposta mais crítica (BUSZEWSKI, NOGA, 2012). Pelo mesmo motivo, a vazão de fase móvel foi o segundo fator mais crítico, enquanto a concentração do aditivo possui menor influência.

Figura 38 – Diagrama de Pareto obtidas por planejamento Doehlert durante avaliação da influência dos parâmetros proporção de fase aquosa, concentração de tris-hidroximetilaminoetano, vazão de fase móvel e suas interações secundárias nos parâmetros cromatográficos combinados utilizando-se ferramenta desejabilidade global, para definição de condições ótimas.



Empregando os dados obtidos, foi proposto e utilizado um modelo estatístico de erro puro e falta de ajuste não significativos, resíduos normais e independentes e extraordinária correlação entre resultados experimentais e previstos para construir superfícies de resposta, presentes na **Figura 39**. A inspeção visual das superfícies de respostas demonstrou que melhores resultados para desejabilidade foram obtidos para pequenos percentuais de fase aquosa, concentrações mais elevadas do aditivo e reduzida vazão de fase móvel. O uso da ferramenta preditiva do *software* determinou, como condições otimizadas, fase móvel composta por mistura de acetonitrila e tris-hidroximetil-aminoetano na concentração de 15 mmol/L, na proporção de 93:7 v/v, na vazão de 0,45 mL/min.

Figura 39 – Superfícies de resposta obtidas por planejamento Doehlert durante avaliação da influência dos parâmetros proporção de fase aquosa, concentração de tris-hidroximetilaminoetano, vazão de fase móvel e suas interações secundárias nos parâmetros cromatográficos combinados utilizando-se ferramenta desejabilidade global, para definição de condições ótimas.



O planejamento experimental, com ferramenta desejabilidade, comprovou-se eficiente na otimização concomitante dos parâmetros cromatográficos, uma vez que, nas condições propostas, produziu-se corridas curtas, de apenas 5 minutos, fatores de retenção adequados para analito e PI, excelente resolução ($> 2,0$) e elevada razão sinal:ruído. Entretanto, os picos não apresentaram simetria desejada, muito provavelmente pela coexistência de microespécies distintamente ionizadas para analito e padrão interno no pH encontrado. Desse modo, ajustes finos na composição da fase móvel foram propostos visando picos mais simétricos, utilizando-se os dados adquiridos durante o planejamento experimental para a assimetria como resposta.

De forma similar aos outros parâmetros, a proporção de fase aquosa foi o parâmetro mais significativo para a assimetria. Entretanto, uma vez que variações na variável impactariam negativamente nas outras respostas, pois o fator foi o mais crítico para desejabilidade, fator de capacidade, resolução e razão sinal:ruído, decidiu-se manter a proporção fixada e modificar outros fatores, de forma gradual. Em um primeiro momento, viu-se que concentrações menores do aditivo reduziram a assimetria dos picos e, por isso, concentrações gradativamente menores foram avaliadas. Quando a concentração foi reduzida para 12 mmol/L, observou-se ajuste no pH da fase móvel que repercutiu em uma sutil melhora na resposta, sem prejudicar as outras. Todavia, diminuições progressivas na concentração agregaram pouco ou nenhum benefício na assimetria, mas interferiram acentuadamente na

razão sinal:ruído e na detectabilidade do método e, por isso, foram desconsideradas, fixando-se a concentração em 12 mmol/L. Para compensar, um aumento sutil na vazão foi testado, de 0,45 para 0,48 mL/min, pois os resultados do planejamento mostraram que quanto maior a vazão, menor a assimetria, o que é previsível, uma vez que quanto menos retido o analito for, mais simétrico será seu pico. O uso de fase móvel como diluente, durante preparo das amostras, contribuiu positivamente para a assimetria. Os parâmetros cromatográficos finais estão descritos na **Tabela 36**.

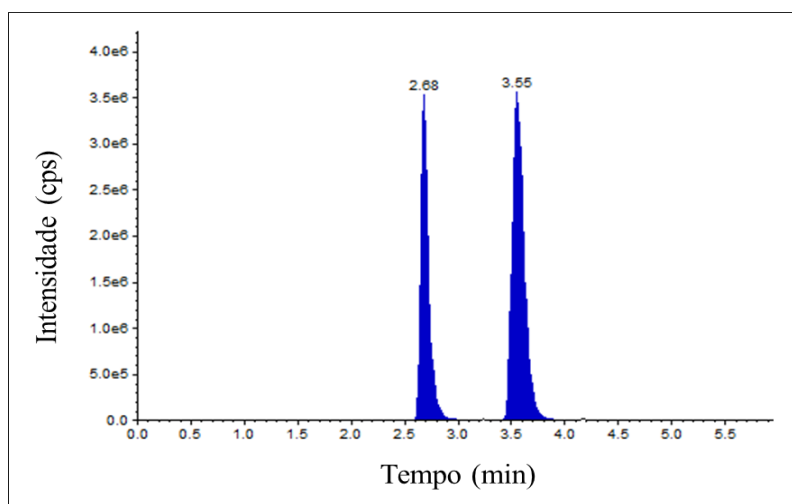
Tabela 36 – Condições cromatográficas para métodos indicativos de estabilidade para doseamento e substâncias relacionadas

Parâmetro	Condição
Coluna cromatográfica	Zorbax-CN 150 x 4,6 mm, 3,5 µm
Fase móvel	Acetonitrila e tris-hidroxil-aminoetano 12 mmol/L, 93:7 v/v
Eluição	Isocrática
Temperatura	21 °C
Vazão de fase móvel	0,48 mL/min
Volume de injeção	5 µL
Tempo de corrida	5 minutos

CN: cianopropil

Um cromatograma, desenvolvido para solução de analito e padrão interno a 50 ng/mL, nas condições cromatográficas finais, está apresentado na **Figura 40**. Os resultados encontrados para fator de retenção ($>0,5$), resolução ($>2,0$), razão sinal:ruído e assimetria ($<1,3$) cumpriram as especificações da legislação vigente e foram considerados satisfatórios. No método desenvolvido, a acetazolamida e dorzolamida apresentaram tempos de retenção de 2,68 e 3,55 minutos, respectivamente. O tempo de corrida foi de apenas 5 minutos. Partiu-se, portanto, para a validação do método.

Figura 40 – Cromatograma obtido para o fármaco acetazolamida e para o padrão interno dorzolamida, nas condições ótimas finais, determinadas por planejamento experimental Doehlert e ferramenta desejabilidade, depois de ajustes finos, utilizando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), sob eluição isocrática de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e tris-hidroximetilaminoetano a 12 mM, na proporção de 93:7 v/v, em vazão de 0,48 mL/min e temperatura de 21 °C, com detecção por espectrometria de massas em modo de aquisição negativo, com evidência de resolução entre fármaco e padrão interno.

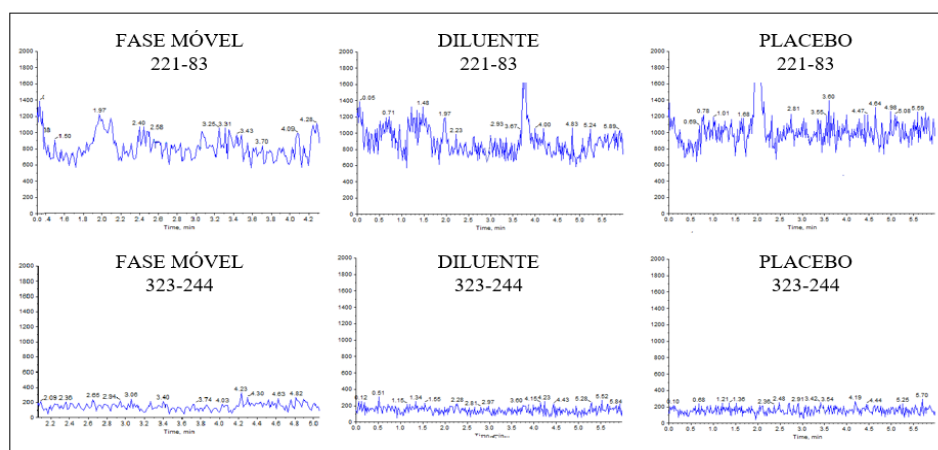


3.4.4 Validação do método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência e espectrometria de massas sequencial para quantificação de acetazolamida em insumo farmacêutico ativo, implantes intravítreos e fluidos biológicos

3.4.4.1 Seletividade

Para a avaliação da seletividade foi realizada inspeção visual dos cromatogramas obtidos para diluente, placebo (PLGA 75:25) e fase móvel, apresentados na **Figura 41**. Como pode-se perceber o método foi seletivo, pois foi observada ausência de picos interferentes nos tempos de retenção referentes ao analito e padrão interno. Avaliou-se ainda se a presença de interferentes que poderiam induzir ou suprimir a ionização de analito e/ou PI. Todavia, comprovou-se que nenhum interferente exerceu influência nas áreas dos picos de analito e padrão interno ou na razão entre as áreas, por ANOVA. Espectros de massas para os picos do analito e padrão interno confirmaram a pureza espectral dos picos.

Figura 41 – Sobreposição de cromatogramas obtidos para fase móvel, diluente e placebo, nas condições ótimas finais, determinadas por planejamento experimental Doehlert e ferramenta desejabilidade, depois de ajustes finos, utilizando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), em coluna ciano (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m), sob eluição isocrática de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e tris-hidroximetilaminoetano a 12 mM, na proporção de 93:7 v/v, em vazão de 0,48 mL/min e temperatura de 21 °C, com detecção por espectrometria de massas em modo de aquisição negativo, com evidência de resolução entre fármaco e padrão interno, para avaliação da seletividade do método.



3.4.4.2 Linearidade

O primeiro passo na avaliação da linearidade e intervalo foi a investigação do cumprimento dos pressupostos para uso do modelo de regressão linear por MMOQ, dispostos na **Tabela 37**. Todos os pressupostos requeridos para regressão linear foram devidamente cumpridos, uma vez que, nesses testes, espera-se *p*-valor maior que 0,05, adotando-se nível de significância de 5%, para que não se encontre evidências para rejeitar a hipótese nula. Confirmou-se que os resíduos para todas as curvas foram independentes, homocedásticos e normais e não foram identificados valores extremos. Da mesma forma, na avaliação da significância do intercepto por ANOVA, valores de *p* menores que 0,05 encontrados nas seis curvas confirmam que não se rejeita a hipótese nula que o intercepto não difere estatisticamente de zero, como desejado.

Na significância da regressão, por ANOVA, o valor de *p* deve ser superior a 0,05, para demonstrar que o coeficiente angular ou inclinação é estatisticamente diferente de 0, provando que variações na concentração do fármaco causam variações proporcionais na resposta razão de áreas, o que foi observado para as curvas, sem exceção. Não foi observada falta de ajuste, nem desvio da linearidade significativos. Todos os resultados obtidos por ANOVA

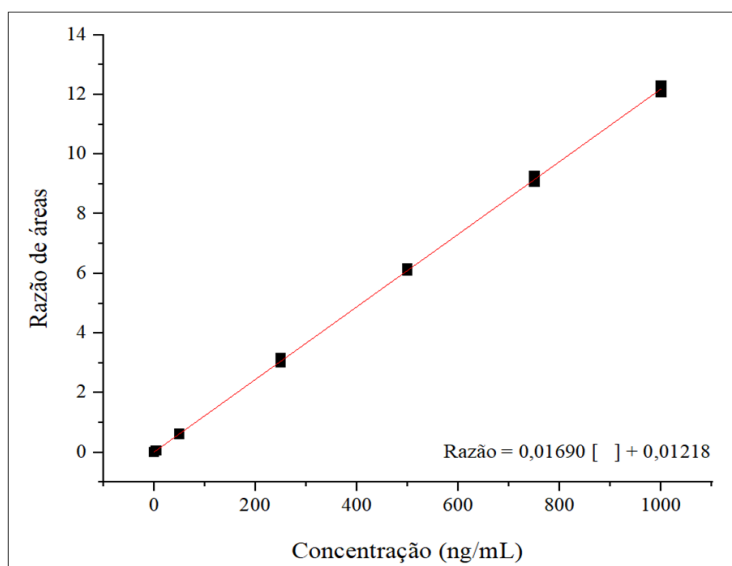
demonstram que o modelo de regressão linear provou-se apropriado e, por isso, foi possível fazer estimativa dos parâmetros de regressão, equação da reta e coeficientes de correlação, que foram superiores a 0,99, requisito final exigido pela RDC nº. 166/2017 e guias de validação internacionais para comprovação da linearidade. Portanto, o método foi linear, no intervalo entre 0,5 e 1000 ng/mL, o que confirma que o método possui excelente detectabilidade e potencial para ser utilizado para determinação do fármaco em fluidos biológicos.

As curvas foram comparadas estatisticamente, por ANOVA, no nível de significância de 5%, referente aos coeficientes angulares e aos coeficientes lineares. Uma vez que, do ponto de vista estatístico, não houve diferença significativa entre interceptos e inclinações, as curvas foram combinadas em uma só, para construção de uma única curva que representasse o conjunto de dados. Esta curva única foi plotada como razão das áreas em função da concentração do fármaco, como apresentado na **Figura 42**. Estimou-se, por fim, a equação da reta, que foi utilizada para quantificar o fármaco nos ensaios de eficiência de incorporação, doseamento e uniformidade de doses unitárias por uniformidade de conteúdo.

Tabela 37 – Parâmetros para avaliação da linearidade

Parâmetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Normalidade dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,07 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,27 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,06 > 0,05$
Homocedasticidade dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,18 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,12 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,62 > 0,05$
Independência dos resíduos	$p\text{-valor} = 0,47 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,07 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,06 > 0,05$
Valores extremos ou <i>outliers</i>	0 pontos	0 pontos	0 pontos
Significância da regressão	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$	$p\text{-valor} = 0,00 < 0,05$
Significância do intercepto	$p\text{-valor} = 0,41 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,39 > 0,05$	$p\text{-valor} = 0,08 > 0,05$
Desvio da linearidade	Não significativo	Não significativo	Não significativo
Coefficiente angular \pm desvio padrão	$0,01224 \pm 0,00003$	$0,01218 \pm 0,00001$	$0,01211 \pm 0,00003$
Coefficiente linear \pm desvio padrão	$0,01340 \pm 0,01600$	$0,00620 \pm 0,00700$	$0,03110 \pm 0,01670$
Coefficiente de correlação (r)	$0,9999 > 0,99$	$1,0000 > 0,99$	$0,9999 > 0,99$
Coefficiente de determinação (r^2)	$0,9999 > 0,99$	$1,0000 > 0,99$	$0,9999 > 0,99$
Equação da reta	$y = 0,01224x + 0,01340$	$y = 0,01218x + 0,00620$	$y = 0,01211x + 0,03110$

Figura 42 – Curva analítica e equação da reta obtidas durante avaliação de linearidade para método de teor de acetazolamida, no intervalo de concentração de 0,5 a 1000 ng/mL.



3.4.4.3 Precisão

O método teve sua precisão avaliada em 2 diferentes níveis, repetibilidade e precisão intermediária. Dados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária estão dispostos na **Tabela 38**. O método provou-se preciso nos dois níveis avaliados de precisão, uma vez que os valores de DPR obtidos no estudo, intradia e interdias, foram muito inferiores aos valores de 11,0%, para as concentrações de 500 e 1000 ng/mL, ou 30,0%, para a concentração de 0,5 ng/mL, como preconizado pela AOAC.

Tabela 38 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária

Concentração (ng/mL)	Recuperação (%)	
	Dia 1, analista 1	Dia 2, analista 2
0,5	98,43	99,22
0,5	99,07	99,80
0,5	99,81	101,14
500	99,87	101,29
500	100,38	98,65
500	98,03	98,40
1000	98,72	99,25
1000	99,13	99,34
1000	100,44	98,99
Média	99,32	99,56
DPR (%) intradia	0,86	1,02
DPR (%) interdias	-	0,93

3.4.4.4 Exatidão

Dados obtidos na avaliação da exatidão estão dispostos na **Tabela 39**. Percebe-se que o método é exato para a finalidade proposta, uma vez que se encontrou recuperação média de 100,17%, com variação entre 98,70-101,94% e DPR igual a 1,18%, entre níveis, variando entre 0,74-1,64% dentro de um único nível. Estes resultados estão dentro das especificações definidas pela AOAC, que admitem recuperações entre 80,0-110,0% e DPR inferior a 11,0% para as duas maiores concentrações ou recuperações entre 40-120% e DPR de 30,0% para a menor concentração.

Tabela 39 – Recuperações e desvio padrão relativos para avaliação da exatidão

Concentração			
Concentração (ng/mL)	Téorica (µg/mL)	Estimada (µg/mL)	Recuperação (%)
0,5	0,5016	0,4951	98,70
0,5	0,5016	0,5007	99,82
0,5	0,5016	0,5113	101,94
500	501,6000	500,3460	99,75
500	501,6000	507,6694	101,21
500	501,6000	503,0045	100,28
1000	1003,2000	1018,5490	101,53
1000	1003,2000	1000,6920	99,75
1000	1003,2000	989,0549	98,59
Média	-	-	100,17
DPR (%)	-	-	1,18

3.4.4.5 Robustez

Na avaliação da robustez, avaliou-se a influência dos fatores na recuperação do analito, na concentração de 500 ng/mL, utilizando-se os mesmos critérios preconizados pela AOAC para precisão e exatidão. Os resultados foram sumarizados na **Tabela 40**. Todos os resultados foram analisados estatisticamente, pelo diagrama de Pareto e por ANOVA, o que confirmou que o método foi robusto, uma vez que as especificações foram cumpridas no intervalo avaliado no delineamento, com recuperações entre 96,66-101,42% e desvio padrão relativo de apenas 1,40%. Desse modo, concluiu-se que pequenas variações nas condições cromatográficas exerceriam influência sutil ou nula na qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos. Como demonstrado na **Figura 43**, apenas proporção da fase aquosa e concentração do aditivo influenciaram significativamente (p -valor < 0,05) na resposta e, por isso, devem ser rigorosamente controlados. Todos os outros parâmetros e interações foram insignificantes, do ponto de vista estatístico, a 5% ($p > 0,05$), incluindo marca de acetonitrila e lote da coluna, que praticamente não exerceram nenhuma influência sobre a resposta.

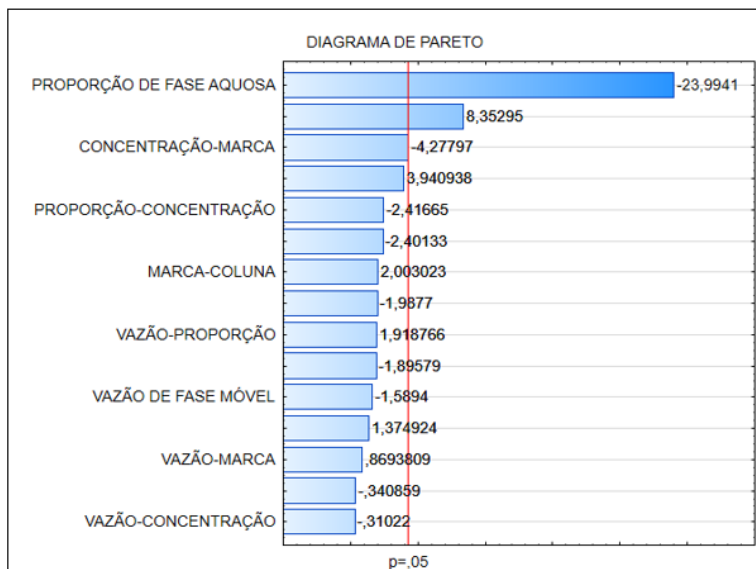
No geral, aumentos na proporção de fase aquosa contribuem para diminuição na resposta, muito provavelmente por dificultarem a ionização de analito e padrão interno na fonte *electrospray*. Em contrapartida, quanto maior a concentração de tris-hidroximetil-aminoetano, maiores foram as recuperações, pois o aditivo demonstrou, no desenvolvimento analítico,

possuir efeito indutor para fármaco e padrão interno. Os resultados obtidos durante o desenvolvimento corroboram com os resultados encontrados aqui, ressaltando a necessidade de que se controle precisamente a proporção de fase aquosa e concentração do aditivo. Além disso, fica evidente que, quando uma otimização multivariada é realizada durante o desenvolvimento, robustez e qualidade são inseridas no método e não somente testadas no final.

Tabela 40 – Resultados da avaliação da robustez

Recuperação				
Experimento	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média
1	99,35	99,72	99,69	99,59
2	99,01	98,84	98,78	98,88
3	97,48	96,98	97,12	97,19
4	97,14	97,18	96,75	97,02
5	100,57	100,64	101,20	100,80
6	101,42	100,82	100,34	100,86
7	98,67	98,05	98,42	98,38
8	97,92	98,23	98,25	98,13
9	99,31	99,28	99,85	99,48
10	100,03	99,95	99,81	99,93
11	96,78	97,30	97,51	97,20
12	97,03	97,11	97,08	97,07
13	101,10	101,25	100,98	101,11
14	100,28	99,79	99,29	99,79
15	96,66	96,93	97,21	96,93
16	98,02	97,47	97,37	97,62
17	99,56	99,34	99,27	99,39
18	99,22	99,38	99,70	99,43
19	99,45	100,11	99,80	99,79

Figura 43 – Diagrama de Pareto obtido para os parâmetros proporção de fase aquosa, concentração de tris-hidroximetilaminoetano, vazão de fase móvel, marca de coluna cromatográfica e suas interações secundárias, durante avaliação da robustez, com evidência de parâmetros críticos na resposta intensidade do sinal de transição de massa para o fármaco acetazolamida (razão massa-carga m/z 221-83).



3.4.4.6 Limites de detecção e quantificação

Limites de detecção e quantificação foram estimados pelos parâmetros de regressão da curva linear. Foram obtidos os valores de 0,03 ng/mL e 0,17 ng/mL, respectivamente, menores que a menor concentração da curva no método desenvolvido. Soluções do fármaco foram preparadas nestas concentrações e, para o limite de quantificação, precisão e exatidão foram determinadas. O método conseguiu detectar e/ou quantificar o fármaco nas concentrações propostas, com razão sinal:ruído maior que 10 para o limite de quantificação, com precisão (DPR = 3,87%) e exatidão (recuperação = 98,80%). Com isso, confirma-se que o analito pode ser quantificado exata e precisamente no LQ definido pela razão sinal:ruído.

3.4.5 Avaliação do método desenvolvido

O método atendeu aos requisitos para validação e foi o primeiro método desenvolvido e validado para quantificação de acetazolamida, com dorzolamida como padrão interno, em

insumo farmacêutico ativo e implantes intravítreos. Ademais, mostrou-se com detectabilidade suficiente para uso em estudos de liberação *in vivo* e farmacocinética. Contudo, o método deve ser validado para a finalidade proposta, conforme RDC n°. 27/2012, para avaliar ocorrência de efeito matriz. Deve-se considerar ainda o desenvolvimento de método de preparo de amostras, principalmente para humor vítreo e outras matrizes oculares, que possuem composição muito complexa.

Em comparação com os métodos disponíveis, o método desenvolvido apresentou detectabilidade maior, com limite de quantificação pelo menos quatro vezes inferior ao reportado por Hampson *et al.* (2016) e cerca de 25 vezes menor que o reportado por Narapusetti *et al.* (2015), únicos a empregar espectrometria de massas para o fármaco, ou duas vezes menor que o desenvolvido por Ichikawa *et al.* (1998), por ultravioleta, muito em virtude da extensa e minuciosa otimização realizada no desenvolvimento. O método foi linear em intervalo muito mais abrangente, permitindo uso para múltiplas finalidades, analíticas ou bioanalíticas, e cumpre preceitos de boas práticas em cromatografia, com fármaco e analito possuindo fator de retenção $> 0,5$, o que não se observa nos outros métodos, quando o analito elui próximo do volume morto. Mesmo assim, o tempo de corrida foi curto, apenas 5 minutos, comparável aos reportados, permitindo análises muito rápidas na rotina.

O desenvolvimento foi mais racional, não empírico, o que permitiu que condições mais apropriadas fossem obtidas com número menor de experimentos e com menor gasto de solventes, reagentes e consumíveis. O emprego de planejamentos experimentais no desenvolvimento analítico é uma ferramenta de qualidade recomendada para se obter métodos mais robustos, que se alinham com os preceitos do *Quality by design*, que estabelecem que a qualidade deve ser inserida durante o desenvolvimento farmacêutico e não apenas mensurada no final do processo produtivo. Estas práticas foram propostas ineditamente no guia ICH Q8 (R2), mas o foco permaneceu, por muitos anos, no desenvolvimento farmacotécnico (YU *et al.*, 2014). Contudo, o interesse no desenvolvimento analítico aumentou consideravelmente na última década, em que muitos métodos publicados foram desenvolvidos utilizando-se ferramentas de análise de risco, estratégias de controle e planejamentos experimentais diversos, o que fez com que fosse introduzido o conceito de *Analytical quality by design* (BEG *et al.*, 2021; VERCH *et al.*, 2022).

Em abril de 2022, o ICH disponibilizou para consulta pública, que estará aberta até julho do mesmo ano, o guia ICH Q14, que trata especificamente do desenvolvimento analítico, que

descreve abordagens científicas baseadas em risco para desenvolver e manter métodos analíticos adequados para uso na rotina da indústria farmacêutica (ICH, 2022). O guia sugere o emprego de planejamentos experimentais e outras ferramentas quimiométricas no desenvolvimento para melhor compreensão do processo e dos efeitos dos fatores nos parâmetros cromatográficos, que permitiria determinar uma região operável dentro dos parâmetros analíticos, nas quais resultados dentro das especificações podem ser obtidos. Desse modo, outros objetivos podem ser atingidos, como mais facilidade na transferência de métodos analíticos, maior flexibilidade regulatória antes e pós-registro e melhoria contínua ao longo do ciclo de vida do produto farmacêutico e método analítico. No mesmo âmbito, a Farmacopeia Americana publicou novo capítulo geral <1220> em novembro do ano passado e oficial desde maio, que orienta o uso de ferramentas de *Quality by design* no desenvolvimento e validação analítica (UNITED STATES, 2021). Neste cenário, o método proposto foi desenvolvido seguindo uma tendência regulatória global.

3.4.6 Determinação da eficiência de incorporação, teor e uniformidade de doses unitárias

O método desenvolvido e validado foi aplicado para determinar a eficiência de incorporação, doseamento e uniformidade de doses unitárias, por uniformidade de conteúdo, do fármaco nos implantes intravítreos. Os resultados para eficiência de incorporação do fármaco no sistema polimérico são apresentados na **Tabela 41**.

Tabela 41 – Determinação da eficiência de incorporação do fármaco

Unidade	Eficiência (%)	Teor ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1	92,74	231,85
2	92,69	231,73
3	88,95	222,37
4	93,43	233,58
5	92,55	231,38
6	93,95	234,89
7	89,84	224,59
8	93,47	233,67
9	90,99	227,48
10	92,56	231,41
Média	92,12	230,30
DPR (%)	1,79	1,79

μg : microgramas – mg : miligrama

Em média, o procedimento de preparo foi suficiente para incorporar 92,12% do fármaco adicionado na mistura, variando entre 89,84-93,95%, o que faz com que a proporção de fármaco nos implantes intravítreos seja, na verdade, aproximadamente 23% m/m, não mais 25% m/m. Embora o resultado seja apenas informativo, pode ser considerado confiável uma vez que o DPR no estudo foi 1,79%, menor que os 5,0% definidos internamente como especificação. Desses resultados, estimou-se a dose dos implantes intravítreos, expressa como a quantidade em μg do fármaco por mg do produto final, encontrando-se dose de $230,30 \pm 4,13 \mu\text{g}/\text{g}$. Portanto, padronizou-se 230 $\mu\text{g}/\text{g}$ como dose declarada do fármaco.

Não estão disponíveis muitos estudos que avaliaram a capacidade de incorporação de fármacos em implantes contendo ácido polilático-co-glicólico na formulação. O único estudo foi proposto por Bisht *et al.* (2017), que desenvolveram um sistema híbrido incorporando nanopartículas de PLGA em implantes intravítreos luz-responsivos *in situ* para administração intraocular de peptídeos, reportando eficiência de incorporação entre 34,3-55,3% na etapa de produção de nanopartículas, muito menores que os encontrados no presente estudo. Trabalhos com outras formas farmacêuticas de ácido polilático-co-glicólico para administração intravítrea, como nanopartículas e micropartículas, reportaram eficiências de incorporação menores ou muito variáveis, como Song *et al.* (2008) para nanopartículas contendo quercetina, em que menos de 35% do fármaco foi incorporado. Estudos propostos por Sun *et al.* (2015) e Maturavongsadit *et al.* (2021), entre outros, conseguiram resultados mais satisfatórios, superiores a 85%, mas para fármacos mais lipofílicos.

A incorporação em sistemas de liberação preparados a partir de ácido polilático-co-glicólico é mais desafiadora e reconhecidamente um grande problema para fármacos hidrofílicos como a acetazolamida, uma vez que o ácido polilático-co-glicólico possui natureza hidrofóbica. Kashi *et al.* (2012) discutiram esse problema durante o desenvolvimento de nanopartículas de minociclina para tratamento de infecções bacterianas,. Deve-se ressaltar que uma baixa e muitas vezes ineficiente incorporação de acetazolamida foi um dos empecilhos mais comumente reportados para o fracasso no desenvolvimento de formulações oculares para o fármaco, como discutido anteriormente. Por isso, considerou-se muito eficaz o procedimento de síntese proposto, porque foi capaz de sobrepujar a pouca afinidade entre fármaco e excipiente e produzir implantes intravítreos com dose maior e excelente aproveitamento, sem muito desperdício.

No doseamento, encontrou-se teor de 101,62% ou 233,72 µg/mg, dentro das especificações, que estabelecem como aceitáveis limites entre 90,0-110,0% do valor rotulado ou 207,0-253,0 µg/mg. Nenhuma amostra superou, individualmente, as especificações preconizadas, como disposto na **Tabela 42**. O desvio padrão relativo encontrado foi de 3,02%, menor que os 5,0% admitidos, indicando que não houve grande dispersão entre os resultados. Portanto, os implantes intravítreos cumpriram os critérios para o ensaio de doseamento.

Tabela 42 – Ensaio de doseamento dos implantes intravítreos

Unidade	Teor (%)	Teor (µg/mg)
1	100,12	230,27
2	100,84	231,94
3	97,69	224,68
4	104,91	241,29
5	104,53	240,42
Média	101,62	233,72
DPR (%)	3,02	3,02

µg: microgramas – mg: miligrama

A uniformidade de doses unitárias foi avaliada por uniformidade de conteúdo, como definido para outras formas farmacêuticas na Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Todos os resultados são apresentados na **Tabela 43**. No ensaio, o teor médio encontrado foi de 99,03%, equivalente a 227,77 µg/mg. Todos os resultados individuais variaram entre 95,27-104,75%,

de modo que nenhuma unidade superou os critérios farmacopeicos definidos de $\pm 20,0\%$. Uma vez que o valor de aceitação calculado foi menor que 15,0, admite-se que os implantes intravítreos atenderam aos requisitos e demonstraram uniformidade de conteúdo. Desse modo, mesmo manual, o procedimento de preparo se mostrou capaz de incorporar eficaz e uniformemente o fármaco nos dispositivos intravítreos.

Tabela 43 – Ensaio de uniformidade de doses unitárias dos implantes intravítreos

Unidade	Teor (%)
1	97,19
2	98,13
3	100,91
4	99,25
5	97,88
6	104,75
7	95,27
8	103,03
9	96,20
10	97,67
Média	99,03
Desvio padrão	3,02
<i>T</i>	100,0
<i>M</i>	99,03
<i>k</i>	2,4 (n = 10)
Valor de aceitação	7,25

k: constante de aceitabilidade – *M*: valor referência

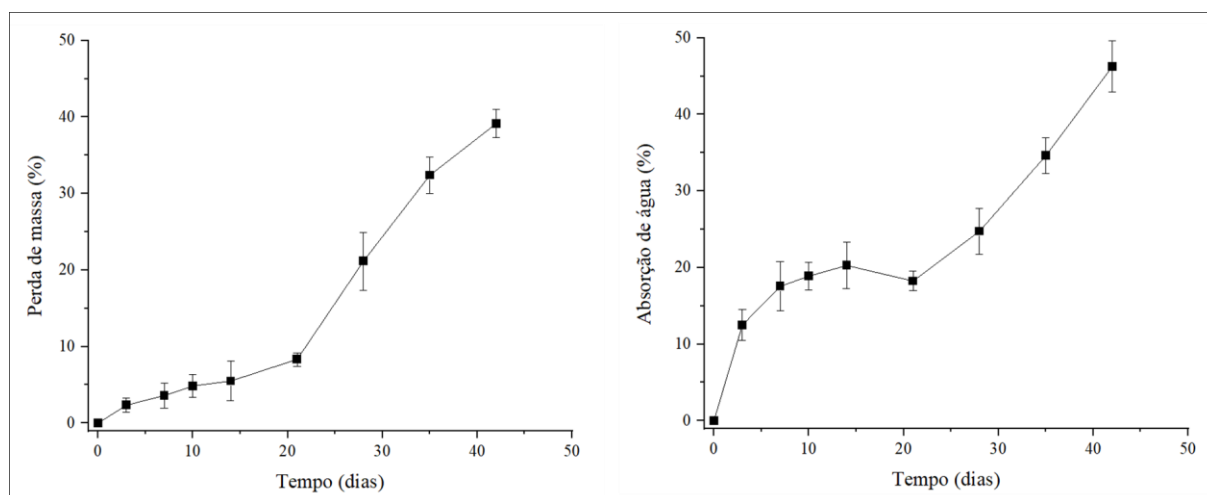
n: número amostral – *T*: média dos limites especificados

3.4.7 Perda de massa *in vitro* e absorção de água

Na **Figura 44**, são apresentados os dados de alteração de massa nos implantes intravítreos contendo acetazolamida, demonstrada pela perda de massa percentual e pela absorção de água durante 42 dias. Nas duas primeiras semanas, o ensaio foi monitorado em intervalos de tempo menores, de 3-4 dias, que foi estendido para uma avaliação semanal depois de 14 dias. Como se observa no gráfico, ocorreu perda de cerca de 40% em massa nos implantes no período, um pouco superior aos resultados reportados por nosso grupo de pesquisa, por Solano *et al.*

(2014), para implantes intravítreos, preparados conforme mesmo protocolo, contendo o antitumoral etoposídeo, em que a perda de massa, em 42 dias, não superou 30%. A diferença encontrada pode ser explicada por duas razões. Primeiramente, os estudos de perda de massa foram conduzidos nas mesmas condições, em 15 mL de tampão fosfato-salina. Contudo, os implantes produzidos pelos autores eram maiores em dimensões e peso que o desenvolvido neste trabalho, com peso de 2,26 mg (78% maior), comprimento de 6,34 mm (27% maior) e espessura de 0,62 mm (38% maior). Desse modo, espera-se que o impacto do efeito hidrolítico em dispositivos menores e menos pesados fosse moderadamente maior. Deve-se ressaltar ainda que o etoposídeo é um fármaco mais lipofílico, menos solúvel no meio, de modo que se difunde mais lentamente dos implantes. Uma vez que parte importante da perda de massa se justifica pela liberação do fármaco, a diferença na solubilidade e difusão reflete marcadamente na perda de massa do sistema.

Figura 44 – Avaliação do perfil de perda de massa (parte esquerda) e absorção de água (parte direita) pelos implantes intravítreos contendo acetazolamida, durante 42 dias.



Todavia, a perda de massa não ocorre de forma constante. Nos 21 primeiros dias, observa-se perda pouco significativa de 8,33%, em velocidade muito menor que no segundo estágio, nos últimos 21 dias, quando a massa se reduz em 30,82% adicionais. Desta vez, os resultados foram coincidentes aos encontrados por Solano *et al.* (2014) e pode ser justificado pelo mecanismo de degradação do ácido polilático-co-glicólico. A fase preliminar da degradação é marcada pela absorção de água pelo polímero, seguida pela hidrólise das ligações éster presentes na sua estrutura (LEE *et al.*, 2010; SEQUEIRA *et al.*, 2018). Esta afirmativa foi

corroborada pelos resultados obtidos no ensaio de absorção de água. Makadia e Siegel (2011) discutiram, no entanto, que esse processo de quebra aleatória da rede polimérica resulta apenas na diminuição da massa molar, mas não se observa perda considerável de massa no sistema nos primeiros dias.

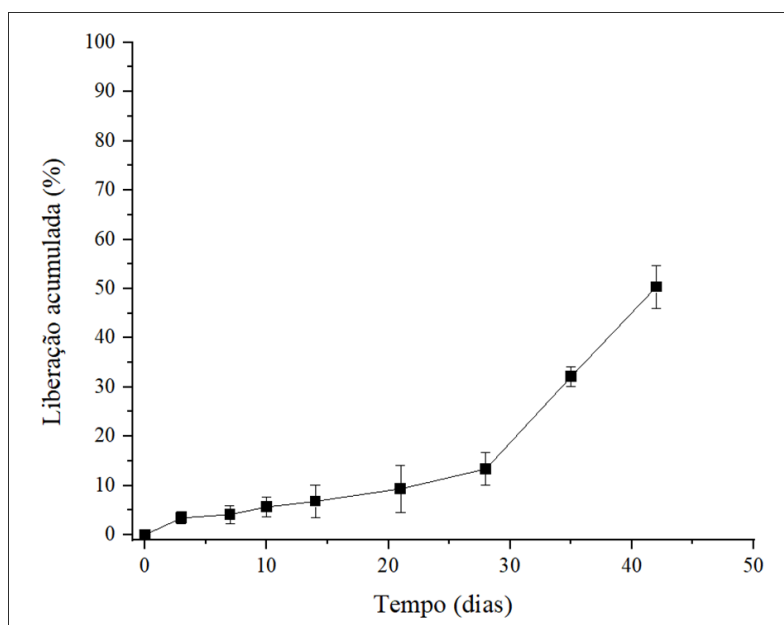
No segundo estágio, são produzidos produtos de degradação de menor massa molar que, mais hidrossolúveis, difundem-se no meio de incubação (KUNOU *et al.*, 1995; DUQUE *et al.*, 2018). O processo provoca erosão da matriz polimérica e formação de poros, favorecendo a penetração de água no interior dos implantes poliméricos, condizente com os resultados observados para absorção de água. Com o intumescimento, os poros vão aumentando gradualmente de tamanho, uma vez que as reações de hidrólise e erosão ocorrem de modo contínuo e são catalisados pelos próprios produtos de degradação formados, monômeros ácidos, que diminuem o pH no meio. Suplementarmente, a degradação da matriz e a criação dos poros propiciam caminhos preferenciais que facilitam a liberação do fármaco dos implantes intravítreos. Portanto, a maior perda de massa observada no período decorre concomitantemente da redução da massa molar, erosão da matriz polimérica e dissolução dos produtos de degradação e difusão do fármaco (FREDENBERG *et al.*, 2011; MAKADIA, SIEGEL, 2011; SOLANO *et al.*, 2014).

O perfil de absorção de água pelos dispositivos intravítreos foi similar ao observado no estudo de Solano *et al.* (2014). Nos primeiros dias, percebe-se absorção apreciável de água, superior a 10%, que cresce gradativamente até o dia 14, quando mais ou menos se estabiliza. Do vigésimo primeiro ao último dia de estudo, nota-se que a reta que expressa a quantidade de água absorvida torna-se muito mais inclinada, uma vez que, como discutido anteriormente, a penetração de água no interior dos implantes foi favorecida pelos poros formados pela erosão do ácido polilático-co-glicólico. Decorrido o intervalo de 42 dias, o ganho em massa ocorrido em virtude da absorção de água foi de aproximadamente 46%.

3.4.8 Estudo de liberação *in vitro*

Dados de liberação da acetazolamida a partir dos implantes intravítreos foram utilizados para construção de curva de perfil de liberação acumulada, disposta na **Figura 45**.

Figura 45 – Avaliação do perfil de liberação acumulada, em percentual, do fármaco acetazolamida em tampão fosfato-salina (PBS) a 37 °C, a partir dos implantes intravítreos contendo acetazolamida, durante 42 dias, com evidência de liberação em perfil bifásico, sem burst inicial.



É notável, pela análise gráfica, que os implantes apresentaram perfil bifásico de liberação, ocorrendo em duas fases distintas, em consonância com os resultados de perda de massa e absorção de água. Na primeira fase ou fase de latência, nos primeiros 28 dias, o fármaco difunde-se vagarosamente a partir da matriz polimérica, com liberação de somente 9,36% da dose declarada, em ritmo aproximado de 0,33% ou 0,77 µg de fármaco liberado por dia. Se o comportamento se reproduzir *in vivo*, seriam obtidas concentrações máximas aproximadas de acetazolamida entre 150-200 ng/mL, faixa muito superior ao limite de quantificação do método desenvolvido para posterior uso em estudo farmacocinético, o que confirma a adequabilidade do método.

O processo é mais lento porque, durante os primeiros dias, não ocorre penetração marcante de água na matriz, dificultando a dissolução e difusão do fármaco (MAKADIA, SIEGEL, 2011; STEWART *et al.*, 2011). Portanto, a liberação do fármaco ocorre exclusivamente por sua difusão a partir dos implantes, antes da erosão, processo dependente do seu coeficiente de difusão, sua solubilidade inerente e saturação no meio de incubação e do gradiente de concentração (LEE *et al.*, 2010; BOIMVASER *et al.*, 2016). Visto que o perfil foi avaliado em condições de esgotamento ou *sink*, com volume quatro vezes superior ao necessário para

se obter solução saturada do fármaco, conclui-se que os principais fatores limitantes no caso seriam o coeficiente de difusão e o gradiente de concentração.

Posteriormente, na segunda etapa, entre os dias 28 e 42, mais 41,01% da dose foram liberados no meio de incubação, de forma mais ou menos constante, de modo que, por dia, foram liberados aproximadamente 2,93% ou 6,74 $\mu\text{g}/\text{mg}$, quantidade quase 10 vezes maior que nos primeiros dias. Nesse ritmo, seriam obtidas concentrações entre 1,35 e 1,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acetazolamida nos olhos, considerando volume de humor vítreo entre 4-5 mL e preterindo efeitos de drenagem ocular e metabolismo. O aumento na velocidade de liberação do fármaco se justifica pela clivagem hidrolítica do polímero e difusão da acetazolamida favorecida pelo aumento da porosidade, como discutido anteriormente.

O comportamento do ácido polilático-co-glicólico em implantes intravítreos é muito bem estudado e elucidado em estudos científicos (COSSÉ *et al.*, 2017; STEWART *et al.*, 2018; DUQUE *et al.*, 2018). Admite-se que esse tipo de sistema de liberação, diferentemente do observado, possuiria cinética de liberação em perfil trifásico, no qual se incluiria uma etapa prévia, marcada pela difusão do fármaco não-incorporado, mas aderido na superfície dos dispositivos que, por isso, se solubilizariam mais rápida e facilmente para o meio externo (FIALHO *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2011). O resultado seria um aumento repentino na concentração do fármaco ou *burst*. A ausência de *burst* de liberação considerável nos primeiros dias no presente trabalho indica que, nas condições propostas para o preparo, a acetazolamida foi eficientemente incorporada na matriz polimérica. Este resultado corrobora os resultados descritos anteriormente na caracterização físico-química por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva, que apontaram para distribuição homogênea do fármaco nos implantes e presença de poucos cristais na superfície. Também ratificam os resultados encontrados no estudo de difração de raios X, uma vez que, pelo método do ângulo rasante ou filme fino, não foi detectada acetazolamida em quantidade apreciável na superfície dos implantes.

Embora menos comum, o perfil bifásico foi obtido por outros estudos com implantes intravítreos de ácido polilático-co-glicólico, como reportado por Solano *et al.* (2014), Toledo *et al.* (2018) e Costa *et al.* (2018). O perfil de liberação em duas fases é benéfico porque impede uma liberação imediata do fármaco, que poderia ocasionar pico de concentração potencialmente tóxico, sem contar que assegura cinética de liberação mais sustentada e prolongada, como desejável para tratamento de maior conveniência de doenças crônicas,

como o glaucoma. Este perfil é compatível com o que sugere o ensaio de microscopia de varredura eletrônica, em maior magnitude, em que se encontrou organização das cadeias poliméricas em multicamadas, característica de sistemas de liberação matriciais, ideais para liberação sustentada.

Durante os 42 dias do estudo, metade do fármaco foi liberado dos implantes intravítreos, resultados semelhantes aos descritos em estudos de liberação *in vitro* e/ou *in vivo* disponíveis. No final, percebe-se tendência para estabilidade na liberação ou platô, observado em sistemas de liberação similares.

4 CONCLUSÃO

Implantes intravítreos biocompatíveis e biodegradáveis de ácido polilático-co-glicólico contendo acetazolamida foram convenientemente produzidos por moldagem a quente. Os dispositivos apresentaram-se na forma de bastões cilíndricos, de cor branca e superfície lisa e uniforme, com diâmetro de $5,00 \pm 0,02$ mm, espessura de $0,45 \pm 0,01$ mm e peso médio de $1,27 \pm 0,05$ mg. No processo de preparo, cerca de 92% do fármaco adicionado foi incorporado na matriz polimérica, produzindo dispositivos com dose de 230 $\mu\text{g/g}$, com teor e uniformidade de doses unitárias adequados.

Um método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta foi desenvolvido e validado para determinação do teor de acetazolamida e teor de impurezas no insumo farmacêutico ativo e nos implantes intravítreos. O método foi seletivo, linear, preciso, exato e robusto nas faixas de 80-120 $\mu\text{g/mL}$ (método para doseamento de acetazolamida) e 0,4-1,2 $\mu\text{g/mL}$ (método para doseamento de impurezas), em menor tempo de corrida que outros métodos descritos na literatura. O método foi aplicado em estudo de estabilidade acelerada, que comprovou a estabilidade dos dispositivos intravítreos por, no mínimo, 24 meses. Desenvolveu-se e validou-se outro método, por cromatografia de interação hidrofílica com detecção por espectrometria de massas, para quantificação do fármaco, que foi seletivo, linear, preciso, exato e robusto na faixa de 0,5-1000 ng/mL. Ademais, apresentou maior detectabilidade e menor tempo de corrida em relação a outros métodos disponíveis, sendo aplicável em estudos farmacocinéticos.

Estudo de degradação forçada demonstrou que o fármaco é estável quando submetido a diferentes condições de estresse, degradando-se somente nas condições de hidrólise ácida e alcalina. Esse estudo permitiu concluir que houve compatibilidade fármaco-excipiente, resultado que foi corroborado por outros métodos de caracterização físico-química, como calorimetria exploratória, termogravimetria, difração de raio x, espectrofotometria no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura associada com espectroscopia por energia dispersiva de raios X.

Estes ensaios provaram ainda que fármaco e excipiente são estáveis em temperaturas de até 230 °C, que a acetazolamida se amorfiza durante a síntese, favorecendo sua incorporação e distribuição homogênea na matriz, com parcela pouco significativa aderida na superfície. Por

isso, os dispositivos demonstraram perfil de liberação bifásico do fármaco, sem *burst* inicial, com liberação sustentada de cerca de 50% da dose em 42 dias, característico de sistemas matriciais e com perfil ideal para tratamento eficaz, seguro e prolongado do glaucoma.

CAPÍTULO 2**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E BIOLÓGICA DOS IMPLANTES
INTRAVÍTREOS CONTENDO ACETAZOLAMIDA**

1 MATERIAIS

1.1 Insumos farmacêuticos e medicamentos

- Acetazolamida insumo farmacêutico ativo (Amphora, Brasil)
- Carmelose sódica 5 mg/mL (Genom, Brasil)
- Cloridrato de cetamina 100 mg/mL (CEVA, Brasil)
- Cloridrato de proximetacaína 5 mg/mL (Alcon, Brasil)
- Cloridrato de tetracaína 10 mg/mL + fenilefrina 1 mg/mL (Allergan, Brasil)
- Cloridrato de xilazina 20 mg/mL (CEVA, Brasil)
- Tiopental sódico (Cristália, Brasil)
- Tobramicina 3 mg/mL + dexametasona 1 mg/mL (Novartis, Brasil)
- Tropicamida 10 mg/mL (Alcon, Brasil)

1.2 Reagentes biológicos

- Células do epitélio pigmentar da retina da linhagem ARPE-19 (BCRJ, Brasil)
- Coelho albinos machos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça New Zealand (Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, Brasil)
- Ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil)

1.3 Solventes e reagentes

- Ácido acético glacial grau analítico (Hexis Científica, Brasil)
- Álcool etílico absoluto grau analítico (Êxodo Científica, Brasil)
- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich, EUA)
- Carboximetilcelulose sódica (Êxodo Científica, Brasil)
- Cloreto de potássio grau analítico (CRQ Química, Brasil)
- Cloreto de sódio 0,9% estéril (Equiplex, Brasil)
- Cloreto de sódio grau analítico (Synth, Brasil)
- Dimetilsulfóxido grau analítico (Synth, Brasil)
- Dióxido de carbono gás (Air Liquide, Brasil)
- Formalina tamponada 10% m/v (Êxodo Científica, Brasil)

- Fosfato de sódio dibásico grau analítico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Fosfato de sódio monobásico grau analítico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Hipoclorito de sódio (Êxodo Científica, Brasil)
- Meio de cultura caldo caseína-soja (KASVI, Brasil)
- Meio de cultura DMEM-F12 com soro fetal bovino (Gibco, EUA)
- Meio de cultura fluido tioglicolato (KASVI, Brasil)
- Parafina grau analítico (Synth, Brasil)
- Tripsina 0,025% (Nova Biotecnologia, Brasil)
- Xilol grau analítico (Dinâmica, Brasil)

1.4 Vidrarias, consumíveis e correlatos

- Agulhas ultrafinas de 30 gauge (Becton Dickinson, EUA)
- Agulhas de 21 gauge (Becton Dickinson, EUA)
- Algodão estéril
- Balões volumétricos de 1-2000 mL
- Barras de agitação magnéticas
- Bastões de vidro
- Béqueres de 10-2000 mL
- Caixa de MDF equipada com lâmpadas de diodo emissor de luz (LED)
- Cassetes histológicos
- Contensores de acrílico para ratos
- Espátulas
- Frascos de penicilina
- Gaze estéril
- Kit de filtração à vácuo
- Lâminas de bisturi
- Micropipetas de 10-1000 µL modelo Labmate Soft (HTL Lab Solutions, Polônia)
- Micropipeta multicanal (KASVI, Brasil)
- Microplaca de poliestireno cultivo celular de 96 poços
- Minitubos de 1,5-2 mL (Eppendorf do Brasil, Brasil)
- Papel alumínio
- Parafilme
- Pinças

- Pipetas de Pasteur
- Pipetas volumétricas estéreis de 1-10 mL
- Ponteiras descartáveis estéreis para micropipetas de 200-1000 μL
- Provetas de 1-1000 mL
- Seringas de 1-5 mL
- Tesouras
- Trocarte transescleral
- Tubos de ensaio de 20 mL
- Tubos Falcon de 15-50 mL
- Unidade filtrante de 0,22 μm de porosidade

1.5 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento modelo TMA20CF (Thelga, Brasil)
- Agitador orbital do tipo vórtex modelo AV-2 82328 (Gehaka, Brasil)
- Balança analítica modelo AEG455M, com precisão de 0,05 mg (Shimadzu, Japão)
- Balança analítica modelo AUW2200, precisão de 0,001 mg (Shimadzu, Japão)
- Balança analítica modelo BP221D, precisão de 0,01 mg (Satorius, Alemanha)
- Balança semianalítica modelo AE20 (Mettler Toledo, EUA)
- Banho ultrassônico modelo Bransonic 220 (Branson Ultrasonics, EUA)
- Capela de fluxo laminar
- Centrífuga modelo Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher, EUA)
- *Clearview Optical Imaging System* (Optibrand, EUA)
- Dessecador
- Eletrodos do tipo agulha modelo ERG Jet (Fabrinal SA, Suíça)
- Eletrodos do tipo lente de contato modelo ERG Jet (Fabrinal SA, Suíça)
- Estereomicroscópio Motic, equipado com câmera Motic Cam® (Motic, China)
- Estufa modelo B180 (Nabertherm Inc., Estados Unidos)
- Fotoestimulador de diodo emissor de luz (LED) modelo ColorDome® Ganzfield, equipado com *software* Espion E3 (Diagnosys LLC, EUA)
- Freezer modelo REVCO, temperatura de -80 °C (Thermo Scientific, Estados Unidos)
- Lâmpada de diodo emissor de luz (LED) cor branca
- Lâmpada de fenda modelo SL 15 (Kowa, Japão)
- Leitor de microplacas modelo ELISA VERSAmax (Molecular Devices, EUA)

- Leitor de microplacas modelo ELx800 (Biotek, EUA)
- Microscópio ótico modelo Axio Imager M2, equipado com câmera modelo AxioCam e *software* Zen (Carl Zeiss, Alemanha)
- Potenciômetro modelo 827 pH Lab (Metrohm, Suíça)
- Oftalmoscópio binocular indireto modelo Omega 500 (Heine Optotechnik, Alemanha)
- Oftalmoscópio modelo Spectralis HRA+OCT, equipado com *software* Spectralis OCT (Heidelberg Engineering, Alemanha)
- Refrigerador, temperatura de 4 °C (Consul, Brasil)
- Refrigerador modelo GRC-4PV, temperatura de 2 °C (Gelopar, Brasil)
- Tonômetro veterinário modelo Tono-Pen Vet (Reichert Technologies, EUA)
- Ultrapurificador de água modelo Millipore Direct Q3 (Merck, Alemanha)

2 MÉTODOS

Os experimentos para caracterização microbiológica e estudos *in vivo* foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia e no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, ambos na Universidade Federal de Minas Gerais, na Fundação de Ensino de Contagem, na Fundação Ezequiel Dias e no Centro de Diagnóstico Veterinário Celulavet. Todos os experimentos animais foram conduzidos em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob os protocolos 238/2016 e 04/2020 e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, sob protocolo 027/2021.

2.1 Teste de esterilidade dos implantes intravítreos contendo acetazolamida

Depois de produzidos, os implantes intravítreos foram transferidos para minitubos de 1,5 mL hermeticamente fechados e foram esterilizados por irradiação gama, com dose de 15 kGy. Na avaliação do controle de qualidade microbiológico dos implantes intravítreos, o ensaio de esterilidade, que visa verificar a ausência de micro-organismos viáveis, foi executado conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira 6ª edição.

De acordo com método geral farmacopeico, para produtos oftálmicos apresentados em embalagem de dose única, para lotes com menos de 100 unidades, como é o caso do lote produzido neste trabalho, o número mínimo de unidades a serem testadas deve corresponder a 10% do número de unidades produzidas ou 4 unidades, o que for maior. Os implantes foram transferidos, sob condições assépticas, para tubos de ensaio contendo caldo caseína-soja ou meio fluido tioglicolato e incubados, respectivamente, nas temperaturas de 35 °C e 25 °C, em estufa, por 14 dias. O crescimento microbiano foi avaliado durante todo o período e controles negativo e positivos foram monitorados para assegurar a confiabilidade dos resultados.

2.2 Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do fármaco acetazolamida

2.2.1 Avaliação da toxicidade *in vitro* da acetazolamida por ensaio de viabilidade celular ou ensaio de citotoxicidade por incorporação de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Na investigação da toxicidade *in vitro* da acetazolamida, foram utilizadas células humanas do epitélio pigmentar da retina (ARPE-19), conforme estabelecido por Dunn *et al.* (1996). As células ARPE-19 foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12, enriquecido com soro bovino fetal (SBF) a 10% m/v, mantidas a 37 °C, em estufa, sob atmosfera umidificada de ar e dióxido de carbono a 5%, na proporção 95:5 v/v. Eventual efeito citotóxico do fármaco foi avaliado pela determinação indireta da viabilidade celular em ensaio colorimétrico proposto por Mosmann (1983), no qual o brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil]tetrazólio (MTT), sal hidrossolúvel de cor amarela, é convertido, por clivagem promovida pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, em 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan ou formazan. O formazan é uma substância de cor azul marcante, que produz cristais insolúveis em meio aquoso, proporcionalmente ao número de células viáveis no estudo. Estes cristais são posteriormente solubilizados em dimetilsulfóxido, para mensuração da densidade óptica, por espectrofotometria, no comprimento de onda de 570 nm.

O fármaco foi estudado nas concentrações de 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,02 e 0,04 mmol/L, que foram preparadas por sua dissolução em mistura de cloreto de sódio 0,9% m/v estéril e dimetilsulfóxido, na proporção de 99:1 v/v. O dimetilsulfóxido foi adicionado para garantir a solubilização da acetazolamida nas maiores concentrações. No preparo do reagente MTT, foram pesados 500 mg do sal, que foram dissolvidos em 100 mL de tampão fosfato-salina estéril e filtrados por filtro de seringa de 0,22 µm. Desta solução, diluiu-se volumetricamente 1 mL em 9 mL de meio de cultura DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino, em reservatório estéril.

No procedimento, realizado em condições assépticas, células ARPE-19 foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços, na concentração de 10000 células/poço, utilizando micropipeta multicanal, adicionadas de 0,1 mL do meio de cultura e incubadas por 24 horas nas condições descritas anteriormente. Em seguida, o meio de cultura foi cuidadosamente removido com micropipeta multicanal, sem permitir contato entre ponteiros e superfície em

que as células estão aderidas e os poços foram lavados com 0,1 mL de tampão fosfato-salina estéril para remover o excesso de soro fetal bovino. Depois, adicionou-se 0,1 mL do fármaco em meio de cultura suplementado aos poços, nas concentrações propostas, e incubou-se a microplaca por mais 24 horas. Após esse período, as soluções de acetazolamida foram removidas cuidadosamente, com micropipeta multicanal, os poços foram lavados com 0,1 mL de tampão fosfato-salina estéril e foram adicionados 0,1 mL do reagente MTT nos poços, com incubação por 3 horas. A microplaca foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido com micropipeta multicanal, os cristais de formazan formados foram solubilizados com 0,05 mL de dimetilsulfóxido e procedeu-se à leitura em leitor de microplacas, determinando-se a sobrevivência ou viabilidade celular pela razão percentual das absorvâncias encontradas para tratamento e controle de vida. Depois de selecionadas as doses maiores que não foram consideradas tóxicas, o ensaio foi repetido monitorando-se a viabilidade celular por 24, 48 e 72 horas.

O meio de cultura DMEM-F12 foi utilizado como branco, meio de cultura DMEM-19 enriquecido com células ARPE-19 foi utilizado como controle de vida, o dimetilsulfóxido foi utilizado como controle de morte e o meio de cultura adicionado de dimetilsulfóxido na proporção 99:1 foi utilizado como controle de solvente. Controles e concentrações do fármaco foram estudados em 9 replicatas, enquanto para o branco foram realizadas 8 determinações. Os resultados foram expressos como viabilidade celular, em percentual, comparativamente ao controle contendo meio de cultura mais células ARPE-19, como média \pm desvio padrão. Depois, foram analisados por ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey, no *software* Prism 5.0 (GraphPad, EUA), no nível de significância de 0,05% (p -valor $<$ 0,05).

2.2.2 Avaliação da toxicidade *in vitro* da acetazolamida por eletrorretinografia de campo total

Para avaliação da toxicidade *in vivo* em ratos utilizou-se eletrorretinografia (ERG), o único ensaio capaz de avaliar o estado funcional da retina. O teste de eletrorretinografia consiste na aplicação de estímulos luminosos, avaliando-se as respostas escotópica (resposta dos bastonetes), escotópica máxima (resposta máxima de cones e bastonetes), fotópica (resposta dos cones a *flash* único) e *flicker* (resposta dos cones a estímulos repetidos), além de registros de potenciais oscilatórios, quando submetidos a fotoestimulador de diodo emissor de luz

(LED), controlado por *software* que permite o monitoramento da frequência e duração dos estímulos nos eletrodos em lentes de contato.

O procedimento foi realizado com ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar, com 6-8 semanas de idade e peso entre 200-250 g, adquiridos e mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos animais foram acondicionados em caixas, posicionadas em estantes, em sala com ar filtrado, condições de temperatura controlada de 27 °C, sob ciclos de claro/escuro de 12 horas e alimentação e água *ad libitum*. Todos os animais (n = 9) foram randomicamente divididos nos grupos I, II e III, contendo n = 3 por grupo, nos quais foram administrados doses diferentes do fármaco, conforme descrito na **Tabela 44**.

Tabela 44 – Delineamento experimental para avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida por eletrorretinografia em ratos Wistar

Grupo	Amostra	Dose (mmol/L)	Dose (µg/mL)
I	3	0,01	2,22
II	3	0,02	4,44
III	3	0,04	8,88

O fármaco foi utilizado na forma de suspensão em gel de carboximetilcelulose a 0,5% m/v em cloreto de sódio 0,9% m/v estéril, agitadas em vórtex por 30 segundos imediatamente antes da administração. Foram administrados volume de 5 µL, por injeção intravítrea, com seringa de insulina e agulha de 30 gauge, a 2 mm do limbo, no olho esquerdo de cada animal, enquanto igual volume de gel de carboximetilcelulose 0,5% em salina estéril, sem fármaco, foi administrado contralateralmente, no olho direito, para controle. O procedimento foi executado com auxílio de microscópio, para melhor visualização da agulha na cavidade intravítrea. Esperou-se cerca de 30 s para remover a agulha, para evitar vazamentos. Os animais foram anestesiados anteriormente, para administração intravítrea e eletrorretinografia, com cloridrato de cetamina 90 mg/kg e cloridrato de xilazina 10 mg/kg, por via intraperitoneal, e cloridrato de proximetacaína 5 mg/mL, por instilação.

Os registros eletrorretinográficos foram realizados conforme orientado no protocolo estabelecido pelo Comitê de Padronização e Calibração da *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV) e pelo Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa

Oftálmica e Visão da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO) (ODOM *et al.*, 2016; ROBSON *et al.*, 2018), com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 238/2016, Anexo I). Durante o estudo, a avaliação clínica foi realizada por profissional veterinário. Tonometria e oftalmoscopia foram utilizados para monitorar a segurança da administração intravítrea do fármaco.

As respostas foram adquiridas nos dois olhos simultaneamente utilizando eletrodos bipolares do tipo lente de contato posicionados sobre a córnea, eletrodos do tipo agulha fixados subcutaneamente na pele perto da região frontal, no canto lateral de ambos os olhos, utilizados como referência, e eletrodo-terra fixado subcutaneamente no dorso do animal, próximo da cauda. A impedância do eletrodo foi verificada antes e depois de cada medição e foi inferior a 5 k Ω a 25 Hz. Quinze minutos antes do exame, foi instilada tropicamida 10 mg/mL para midríase. Os olhos dos animais foram constantemente lubrificados por instilação de carmelose sódica 5 mg/mL.

Os exames escotópicos foram realizados com *flashes* de luz branca (6500 K), de duração de 4 ms, em 11 *steps*, com aumento da intensidade luminosa, com *flashes* de intensidade luminosa de 0,01 cd.s/m², com 30 segundos de intervalo, para avaliar a função de bastonetes, *flashes* de intensidade luminosa de 3,0 cd.s/m², com 30 segundos de intervalo, para avaliar a função de bastonetes e cones e resposta escotópica máxima, e *flashes* de intensidade luminosa de 10 cd.s/m², com 30 segundos de intervalo. O potencial oscilatório (PO) foi obtido pela resposta do *flash* de 3 cd.s/m², por meio de transformada de Fourier rápida, com filtragem de 60-300 Hz. Estimou-se o valor absoluto da área sob a curva para todos os potenciais oscilatórios, entre os tempos implícitos das ondas *a* e *b*.

Exames fotópicos foram realizados depois de adaptação do animal à luz de fundo de 3,0 cd.s/m² por 10 minutos, por estímulos com *flashes* de intensidade luminosa de 3,0 cd.s/m² e duração de 4 ms, seguidas por sinal *flicker* de 30 Hz, de mesma intensidade luminosa e duração. Todas as respostas foram amplificadas, com filtragem de 0,3-300 Hz, depois de média de 5-40 medições individuais por *step*, de acordo com a razão sinal:ruído.

Todos os animais foram submetidos ao exame eletrorretinográfico em 1, 7 e 15 dias após a administração intravítrea do fármaco. Antes dos registros eletrorretinográficos, os animais foram mantidos em uma sala escura por 24 horas, para adaptação ao escuro. Durante o ensaio, foram acomodados no interior de uma gaiola de Faraday, sob suporte de isopor, para manter a adaptação ao escuro e minimizar interferências externas de campo elétrico, para registro

eletrofisiológico mais fidedigno. O procedimento foi realizado sob fraca intensidade de luz vermelha.

Sinais amplificados obtidos simultaneamente para olho esquerdo e direito foram processados pelo *software* Espion E³ e eletrorretinogramas foram adquiridos. Os resultados encontrados para amplitude e tempo implícito das ondas *a* e *b* foram comparados com os valores médios obtidos para os grupos antes da administração intravítrea. A razão da amplitude das ondas *a* e *b* (razão *b/a*) foi estimada como indicador da integridade funcional da retina externa e interna, como recomendado por diversos autores, como Lawwill *et al.* (1972), Evans *et al.* (1993), Manna *et al.* (2016) e Paiva *et al.* (2021).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* Prism 5.0 (GraphPad, EUA). As diferenças nos parâmetros eletrorretinográficos entre os grupos, durante o período do estudo, foram testadas para distribuição normal usando-se teste de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos, a comparação múltipla foi realizada por ANOVA de uma via, com pós-teste de Bonferroni, enquanto a comparação única foi investigada por teste t. Dados não-paramétricos, foram avaliados por Kruskal-Wallis, com pós-teste de Nemenyi, para comparação múltipla, enquanto a comparação única foi realizada por teste de Mann-Whitney. Para todos os testes, o nível de significância de 0,05.

2.3 Avaliação do efeito neuroprotetor do fármaco acetazolamida por eletrorretinografia de campo total

Um possível efeito neuroprotetor da acetazolamida foi avaliado, por eletrorretinografia. Todos os ensaios foram conduzidos exatamente nas mesmas condições, conforme descrito na avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco, mas para apenas uma única dose do fármaco, de 0,02 mmol/L ou 4,44 µg/mL, por via intravítrea, em suspensão de carboximetilcelulose a 0,5% m/v em salina estéril, nos olhos direitos de 5 animais (n = 5), enquanto os olhos esquerdos foram mantidos como controle.

Depois da administração, os animais foram expostos a procedimento de degeneração forçada da retina por exposição excessiva à luz, com iluminância de 40000 lux, segundo modelo experimental desenvolvido no grupo de pesquisa, em resultados ainda não publicados. Para procedimento, os animais foram acondicionados no interior de contêntores de acrílico e

colocados, aos pares, em caixa de MDF, equipada com lâmpadas de diodo emissor de luz (LED) na cor branca, posicionadas nas quatro paredes e na porção superior, com espelhos posicionados na porção inferior para refletir a luz incidente. Os olhos foram previamente instilados com tropicamida 5 mg/mL, para efeito midriático. Fixou-se tempo de exposição em 2 horas, por 8 dias consecutivos. Imediatamente depois do término do experimento de degeneração, os animais foram novamente mantidos sob condições de escuro, por 24 horas. Exames eletroretinográficos foram efetuados em 1, 7 e 14 dias após o experimento, como descrito anteriormente, comparando-se a degeneração induzida por luz nos olhos tratados e controle.

2.4 Avaliação da toxicidade *in vivo* dos implantes intravítreos contendo acetazolamida

Na investigação da toxicidade *in vivo* dos implantes intravítreos, foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos machos, da raça New Zealand, com 2-3 meses de idade e peso de 2,0-2,5 kg, adquiridos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (Igarapé, Brasil) e acondicionados aos pares em gaiolas, na sala de manutenção de coelhos no Biotério de Experimentação Animal da Fundação Ezequiel Dias, mantidos entre 16-22 °C, com trocas de ar completa e ciclos de claro-escuro de 12 horas, com alimentação e água *ad libitum*, acompanhados por profissional veterinário. Todos os animais foram mantidos em quarentena por 14 dias e submetidos periodicamente a exame parasitológico de fezes.

Os estudos *in vivo* foram conduzidos em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO), com aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Fundação Ezequiel Dias (protocolo 027/2021, Anexo III).

Os coelhos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos, contendo quatro animais cada ($n = 32$), sendo que dois grupos receberam uma injeção intravítrea de solução de acetazolamida 0,02 mmol/L em salina estéril, avaliados por (I) 3 dias e (II) 7 dias, e seis grupos receberam administração intravítrea de implante contendo acetazolamida no olho direito e implante branco no olho esquerdo, utilizado como controle, durante os seguintes tempos (III) 7 dias, (IV) 14 dias, (V) 21 dias, (VI) 28 dias, (VII) 35 dias e (VIII) 42 dias. O delineamento experimental proposto é detalhado na **Tabela 45**. O número amostral foi estimado conforme

preconizado por Charan e Kantharia (2013) e com base em outros estudos do grupo de pesquisa, como Solano *et al.* (2016), Paiva *et al.* (2019) e Vieira *et al.* (2020), estabelecendo como variável biológica de maior instabilidade a distribuição do fármaco no segmento posterior do olho.

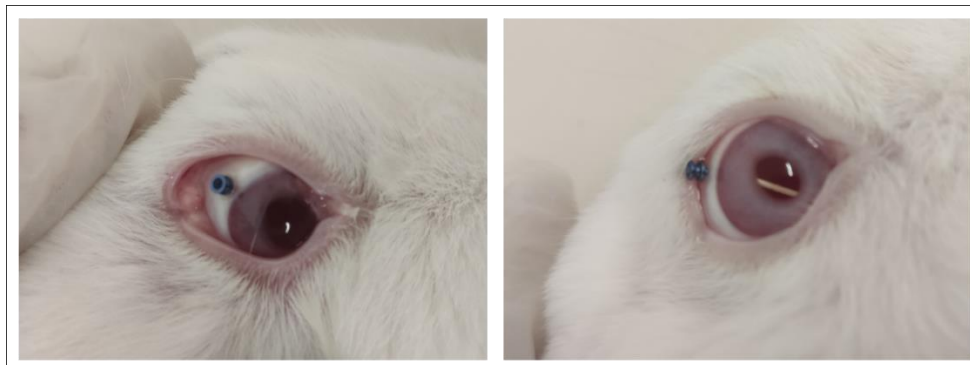
Tabela 45 – Delineamento experimental para avaliação da toxicidade *in vivo* dos implantes intravítreos em coelhos

Grupo	Tratamento	Exposição (dias)	Coelhos
I	Injeção intravítrea	3	7, 17, 21, 24
II	Injeção intravítrea	7	2, 12, 27, 30
III	Implante intravítreo	7	3, 15, 20, 28
IV	Implante intravítreo	14	6, 13, 25, 32
V	Implante intravítreo	21	8, 19, 22, 31
VI	Implante intravítreo	28	1, 4, 11, 23
VII	Implante intravítreo	35	9, 10, 16, 26
VIII	Implante intravítreo	42	5, 14, 18, 29

2.4.1 Administração intravítrea de implantes ou injeções na cavidade vítrea dos olhos de coelhos

Para inserção dos implantes intravítreos contendo acetazolamida ou brancos, os animais foram previamente anestesiados por injeção de 30 mg/kg de cloridrato de cetamina e 4 mg/kg de cloridrato de xilazina, via intramuscular. Posteriormente, os olhos dos animais foram anestesiados por instilação tópica de cloridrato de proximetacaína 5 mg/mL. Os implantes intravítreos foram inseridos por um trocar de 25 gauge. Uma cânula transescleral, que foi colocada através da *pars plana* do olho direito dos animais, no quadrante subtemporal superior, foi utilizada para inserção, conforme apresentado na **Figura 46**. O olho esquerdo foi mantido como controle. Não foi observado sangramento nos olhos que receberam o implante. Para prevenir infecções bacterianas e inflamação, os olhos dos animais foram instilados no pós-operatório, diariamente, com tobramicina 3 mg/mL + dexametasona 1 mg/mL, por uma semana. O mesmo procedimento foi adotado para administração de injeções intravítreas do fármaco, mas foram administrados 5 µL da solução na concentração de 0,02 mmol/L pela *pars plana*, com agulha de insulina de 32 gauge e seringa.

Figura 46 – Esquema demonstrativo de procedimento de aplicação de trocarte transescleral (parte esquerda) seguida por inserção dos implantes intravítreos contendo acetazolamida na cavidade intravítrea através do trocarte transescleral (parte direita), em coelhos albinos da raça New Zealand.



2.4.2 Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada por oftalmologista veterinário, antes, durante e semanalmente após inserção dos implantes intravítreos, por inspeção ocular, oftalmoscopia binocular indireta, biomicroscopia com lâmpada de fenda e fotografia de fundo de olho. Foram observados se sinais clínicos como edema corneano, hiperemia ou secreção conjuntival, hipópio, catarata, opacidade vítrea ou descolamento da retina surgiam durante o experimento.

2.4.3 Tonometria de aplanção de Goldmann

A pressão intraocular foi monitorada utilizando tonômetro veterinário portátil em ambos os olhos dos coelhos, antes e uma vez por semana depois da administração dos implantes intravítreos ou injeções intravítreas, durante toda a experimentação. Previamente, os coelhos foram imobilizados e os olhos foram anestesiados por instilação ocular de cloridrato de proximetacaína a 5 mg/mL. Para reduzir variações, foram realizadas medições em triplicata por olho, sempre na mesma faixa de horário, entre 14:00 e 15:00. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e plotados graficamente para avaliar não somente a toxicidade dos sistemas, mas seu efeito hipotensor em coelhos normotensos. A mudança na pressão intraocular foi estimada pela subtração dos valores obtidos em cada medição pelos

valores encontrados antes da administração intravítrea. Os resultados foram comparados estatisticamente pelo teste t, adotando-se $p\text{-valor} < 0,05$.

2.4.4 Tomografia de coerência óptica de domínio espectral

A toxicidade *in vivo* dos implantes e injeções intravítreas foi avaliada por tomografia de coerência óptica de domínio espectral de alta resolução, exame de diagnóstico por imagem não-invasivo, padrão-ouro para avaliação do segmento posterior dos olhos, que mensura a reflectância de luz infravermelho próximo de banda larga pela retina. O equipamento usado permitiu não só obter imagens transversais da retina, como medir sua espessura e de suas camadas e obter imagens de fundo de olho por *laser* de varredura confocal.

Depois dos intervalos pré-definidos para cada grupo, os coelhos foram anestesiados por via intramuscular, como descrito no procedimento de inserção dos implantes. Posteriormente, administrou-se tropicamida na concentração de 10 mg/mL por instilação para midríase e carmelose sódica a 5 mg/mL para lubrificação, procedimentos recomendados para melhorar a nitidez e qualidade das imagens produzidas. Os coelhos foram confortavelmente posicionados em suporte, de modo que seus olhos estivessem próximos o suficiente das lentes do equipamento, com as pupilas centralizadas. Os parâmetros para aquisição padronizados pelo fabricante foram mantidos, com pequenos ajustes finos sendo realizados na iluminação e ângulo de incidência quando necessário para melhor visualização. Diversos modos de varredura foram utilizados para aquisição.

Todas as avaliações foram realizadas com lentes apropriadas para o segmento posterior e, para reduzir a variabilidade, padronizou-se que as imagens seriam obtidas sempre na mesma posição, um pouco abaixo e à esquerda do disco óptico, que deveria estar visível na imagem de fundo de olho, e com qualidade maior que 10. Depois que imagens da retina e fundo de olho foram obtidas, mediu-se, pelo *software*, a espessura das camadas da retina e sua espessura total.

Os resultados obtidos para os olhos tratados foram comparados entre si e com os olhos contralaterais, utilizados como controle, verificando-se se haviam alterações visíveis e características na estrutura da retina ou modificações na espessura das camadas. Os resultados foram comparados estatisticamente pelo teste t, adotando-se $p\text{-valor} < 0,05$.

2.4.5 Avaliação histológica

Uma vez que se concluiu a investigação da toxicidade *in vivo* por tomografia de coerência óptica para os grupos, nos intervalos pré-estabelecidos, os animais foram eutanasiados por injeção de sobredose de tiopental (90 mg/kg), por via intravenosa, na veia marginal da orelha esquerda. Posteriormente, os olhos foram enucleados conforme protocolo proposto por Ahn *et al.* (2016) e cerca de 0,2 mL de humor vítreo dos olhos tratados foram coletados, com agulha de insulina e seringa, transferidos para minitubos de 1,5 mL e congelados em ultrafreezer a -80 °C. Os olhos foram transferidos para tubos de Falcon de 50 mL, contendo cerca de 25 mL de solução de Davidson e fechados hermeticamente, para fixação, por 24 horas.

Depois, o fixador foi removido e o processamento foi realizado sequencialmente pela desidratação dos olhos em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanização por xilol e impregnação e emblocamento em parafina fundida a 60 °C. Os blocos foram armazenados a -20 °C até o momento do corte. Lâminas dos olhos tratados e controle foram montadas utilizando-se bálsamo do Canadá e lamínula, com corte sagital de 4 µm, ao redor do nervo óptico, coradas com hematoxilina/eosina e analisadas em microscópio óptico de luz branca, para verificação de sinais de irritação, lesão ou inflamação, como edema, neovascularização, presença de infiltrado inflamatório ou quaisquer outras anormalidades.

Cortes no aumento de 20 vezes foram obtidos e utilizados para medir a espessura das camadas da retina e para contar o número de células ganglionares, em uma região linear de 0,2 mm. Os resultados foram comparados estatisticamente por ANOVA de duas vias, com pós-teste de Bonferroni, adotando-se *p-valor* < 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de esterilidade dos implantes intravítreos contendo acetazolamida

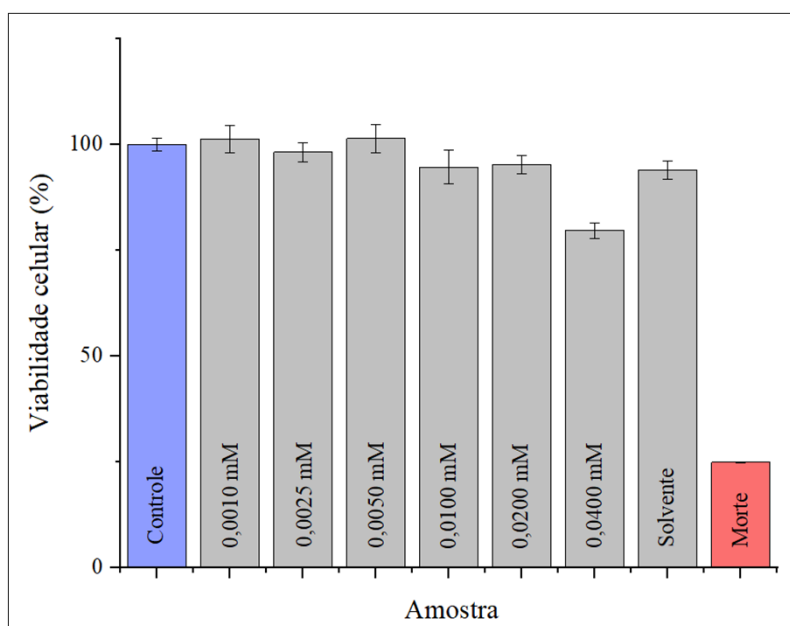
De acordo com o compêndio, o teste é aplicável a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos para saúde que devem ser estéreis, como medicamentos oftálmicos, sendo adequados para revelar a presença de bactérias e fungos. O teste de esterilidade foi realizado pelo método de inoculação direta para avaliar a eficiência do processo de esterilização por irradiação gama. Durante o ensaio de esterilidade, não foi observado crescimento microbiano em nenhum dos tubos de ensaio contendo os meios caldo caseína-soja ou fluido tioglicolato. A validade do teste foi confirmada pela presença de crescimento microbiano no tubo controle positivo e ausência no tubo controle negativo. Portanto, confirmou-se a esterilidade dos implantes intravítreos e a eficiência do procedimento de esterilização por irradiação gama.

3.2 Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do fármaco acetazolamida

3.2.1 Avaliação da toxicidade *in vitro* da acetazolamida por ensaio de viabilidade celular ou ensaio de citotoxicidade por incorporação de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Os resultados de viabilidade celular, expressas como percentual de sobrevivência em comparação com a amostra controle de vida, composta por células e meio de cultura, para o ensaio de citotoxicidade por incorporação do MTT, são apresentados na **Figura 47**, para os controles de vida, solvente e morte e para as seis doses de fármaco avaliadas no estudo preliminar.

Figura 47 – Determinação da sobrevivência e viabilidade celular de células do epitélio pigmentar da retina humana da linhagem ARPE-19 em percentual, durante avaliação da toxicidade in vitro do fármaco acetazolamida nas doses de 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,02 e 0,04 mmol/L por ensaio de citotoxicidade por incorporação do 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

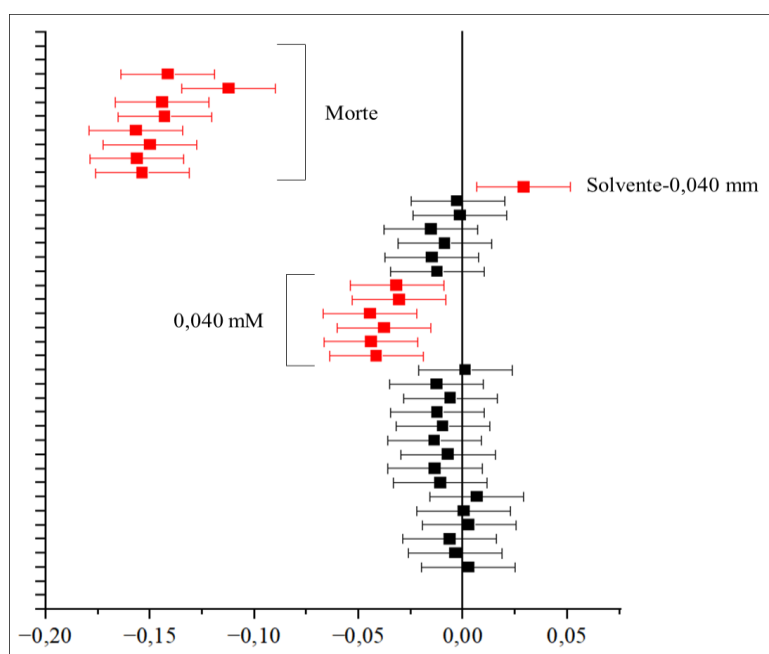


Por ANOVA, com pós-teste de Dunnett, cada grupo foi comparado ao controle, em nível de significância de 5% ($p\text{-valor} < 0,05$), para certificar se havia ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Percebe-se que o teste foi válido, uma vez que o controle de vida não impediu a proliferação celular e que o controle de morte demonstrou viabilidade celular significativamente menor que o controle de vida, confirmando seu efeito citotóxico e capacidade em suprimir o crescimento celular. Todos os grupos foram comparados com o controle de vida e entre si por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey, escolhido por ser o mais adequado para comparações pareadas múltiplas. Por ANOVA, encontrou-se diferença estatística entre os grupos, pois F estimado ($F = 101,8$) foi muito superior ao F crítico e o $p\text{-valor}$ foi inferior a 0,05.

O gráfico para comparação de médias, apresentado na **Figura 48**, mostra que, excetuando-se o controle de morte que desejavelmente deveria diferir dos outros, apenas a maior dose do fármaco (0,04 mmol/L), marcada em vermelho, difere significativamente do controle de vida e das outras doses. O controle de solvente não demonstrou diferença do grupo controle de vida, confirmando ser possível e segura seu uso no estudo. Concluiu-se que apenas a dose de

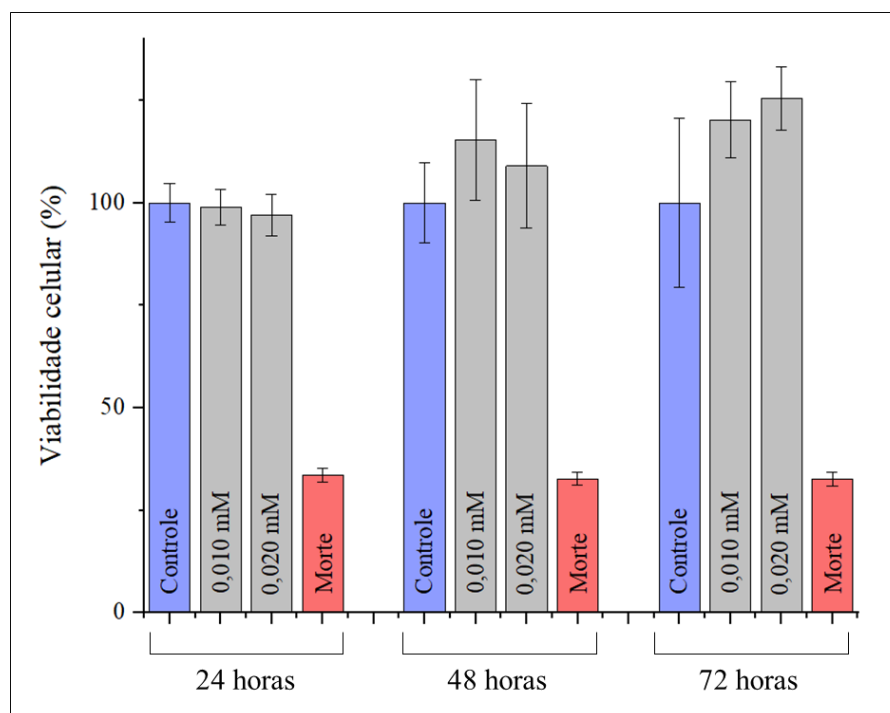
0,040 mmol/L foi citotóxica para células ARPE-19, mas não as doses menores, entre as quais as doses de 0,010 e 0,020 mmol/L.

Figura 48 – Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) de uma via, com pós-teste de Bonferroni, entre as médias de viabilidade celular obtidas durante avaliação da toxicidade in vitro do fármaco acetazolamida nas doses de 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,02 e 0,04 mmol/L por ensaio de citotoxicidade por incorporação do 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), com evidência de ausência de toxicidade para doses inferiores a 0,04 mmol/L.



O estudo foi posteriormente repetido, seguindo o mesmo protocolo, para confirmação da ausência de toxicidade do fármaco nas doses de 0,010 e 0,020 mmol/L. Todavia, para se avaliar um possível efeito citotóxico a longo prazo, as células ARPE-19 foram expostas aos fármacos nas duas concentrações por 24, 48 e 72 horas. A sobrevivência e a viabilidade celular encontradas na nova investigação estão demonstradas na **Figura 49**.

Figura 49 – Determinação da sobrevida e viabilidade celular de células do epitélio pigmentar da retina humana da linhagem ARPE-19 em percentual, durante avaliação da toxicidade *in vitro* do fármaco acetazolamida nas doses de 0,01 e 0,02 mmol/L por ensaio de citotoxicidade por incorporação do 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).



Os resultados obtidos estão em consonância com os reportados na primeira avaliação, comprovando que as doses de 0,010 mmol/L e 0,020 mmol/L não foram citotóxicas para células ARPE-19 em 24 horas, uma vez que não diferiram significativamente do grupo controle (p -valor < 0,05). Toxicidade foi ausente mesmo durante a exposição das células ARPE-19 ao fármaco por períodos maiores, de 2 e 3 dias, pois não se observou diferença estatisticamente significativa entre controle de vida e tratamentos. Por isso, as doses foram consideradas seguras para administração intravítrea do fármaco. É importante destacar que estas doses seguras são maiores que as doses máximas reportadas no estudo de perfil de liberação *in vitro* da acetazolamida a partir dos implantes intravítreos, como descrito no capítulo anterior. Por isso, admite-se que não há risco de que, durante o uso, o implante possa liberar quantidade de fármaco capaz de provocar efeito citotóxico para a retina.

A sobrevida depois de 48 ou 72 horas foi, em média, superior a 100%. Viabilidade celular superior a 100% é algo comum em ensaios de toxicidade utilizando-se linhagens celulares proliferativas, como ARPE-19 e não se associa necessariamente com efeito estimulante do tratamento no crescimento celular, podendo ocorrer geralmente em virtude de flutuações

experimentais randômicas, contaminações ou efeito redutor do fármaco sobre o reagente, fatores que, inclusive, são limitações importantes do seu uso para ensaios de toxicidade *in vitro*, como discutido extensivamente por Karakas *et al.* (2017), Kamiloglu *et al.* (2020) e Ghasemi *et al.* (2021). De fato, observou-se uma variabilidade muito maior e gradativamente crescente nas replicatas obtidas em 48 ou 72 horas de exposição.

Poucos estudos encontram-se disponíveis para investigar os efeitos da acetazolamida em células do epitélio pigmentar da retina. No geral, como discutido na revisão bibliográfica, estudos de novas formulações para administração intraocular do fármaco foram focados mais nos aspectos farmacocinéticos do que nos farmacodinâmicos. Na maioria, sequer foi realizada qualquer avaliação do potencial tóxico do fármaco ou formulações *in vitro* ou *in vivo* ou, quando presente, buscou-se apenas por sinais de irritação ocular.

Mannermaa *et al.* (2010) estudaram células ARPE-19 como modelo para estudos de permeação ocular, em que a acetazolamida foi um dos fármacos testados. Embora discutam que a linhagem celular demonstrou ser um excelente modelo para a finalidade proposta, os autores não reportaram se foram conduzidos previamente estudos para investigar se os fármacos propostos seriam citotóxicos. O único estudo que avaliou a toxicidade do fármaco nas células foi proposto um pouco antes, por Uematsu *et al.* (2006), que se propuseram a verificar se inibidores da anidrase carbônica poderiam ser utilizados satisfatoriamente como agentes para visualização de corpos vítreos, em substituição ao tratamento convencional com o fármaco triancinolona acetonida. No trabalho, os autores reportaram sobrevida maior ou igual a 50% para células ARPE-19 para doses de acetazolamida de até 10 mg/mL.

O resultado grandemente destoa dos encontrados neste estudo, que demonstrou efeito citotóxico para concentrações consideravelmente menores, mais do que 1000 vezes inferior. Todavia, os autores não mencionam os métodos utilizados no seu estudo, incluindo, por exemplo, informações sobre o cultivo celular, período de exposição ou diluente/solvente utilizado para preparo das amostras. Sabe-se que a acetazolamida possui solubilidade limitada em meio aquoso, inferior a 1,0 mg/mL, e que nem mesmo nas concentrações permitidas de dimetilsulfóxido seria possível obter soluções do fármaco na concentração reportada. Por isso, o mais provável é que o fármaco tenha sido administrado na forma de suspensões, que podem limitar a difusão do fármaco e diminuir seu contato com a monocamada celular, reduzindo a precisão e confiabilidade dos resultados de avaliação da toxicidade *in vitro*.

3.2.2 Avaliação da toxicidade *in vitro* da acetazolamida por eletrorretinografia

A avaliação da toxicidade de dispositivos intravítreos para liberação sustentada de fármacos é imprescindível para seu uso seguro. O eletrorretinograma é uma ferramenta não-invasiva frequentemente utilizada em animais, como ratos, camundongos e coelhos, para avaliação do estado funcional e diagnóstico de possíveis alterações na retina, após administração intravítrea de fármacos e medicamentos (HUANG *et al.*, 2015; BOYES *et al.*, 2016). Muitos estudos empregaram eletrorretinograma de campo total para estudo da biocompatibilidade e segurança de implantes intravítreos, para fármacos como ciclosporina, dexametasona, triancinolona, talidomida e sirolimus (ROBINSON *et al.*, 2002; FIALHO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2015; PAIVA *et al.*, 2020).

O procedimento mede a atividade elétrica da retina após exposição a estímulos luminosos de diferentes intensidades e durações, registrando uma onda senoidal bifásica, constituída por dois componentes principais, a onda *a*, deflexão negativa, e a onda *b*, deflexão positiva com origem na camada nuclear interna, nas células bipolares e células de Muller (HUANG *et al.*, 2015; BENCHORIN *et al.*, 2017). De acordo com Rong *et al.* (2014), a onda *a* fisiologicamente ocorre em virtude de hiperpolarização dos cones e bastonetes, decorrente do fechamento de canais de sódio na membrana plasmática, enquanto a onda *b* decorre do fluxo de corrente elétrica nas células de Muller, em resposta a concentrações aumentadas de potássio no ambiente extracelular, um processo dependente das células bipolares presentes na camada nuclear interna.

Ambas são parâmetros importantes para avaliação do status funcional da retina, por meio de elementos temporais, como latência, duração e tempo implícito, ou elementos bioelétricos, como amplitude. Conforme demonstra Gasparin (2013), o padrão das ondas *a* e *b* em ratos é similar ao padrão humano, viabilizando o emprego destes reagentes biológicos para avaliar a toxicidade *in vivo* de fármacos por exames eletrorretinográficos. Muitos outros potenciais oscilatórios observáveis não possuem origem definida, mas é imprescindível observar sua presença ou ausência e morfologia no exame eletrorretinográfico, o que permite obter informações suplementares das funções das camadas da retina (RONG *et al.*, 2014).

O estudo funcional da retina foi realizado por exame eletrorretinográfico, antes e em, 7 e 15 dias depois de administração intravítrea do fármaco, nas condições escotópica, fotópica e *flicker*. O estudo foi realizado para as doses de 0,010 e 0,020 mmol/L, que não foram

citotóxicas conforme avaliação *in vitro*, e com a dose de 0,040 mmol/L, para confirmação *in vivo* da toxicidade encontrada no ensaio supracitado, preparadas na forma de suspensões em gel de carboximetilcelulose. Dados amplificados e processados do exame foram exportados e utilizados para construção de curvas eletroretinográficas nas condições escotópicas, após adaptação ao escuro, e fotópicas, após readaptação à luz. Todas as curvas foram comparadas com curvas obtidas para controle (gel de carboximetilcelulose), visual e estatisticamente. Foram avaliados outros parâmetros, como amplitudes e tempos implícitos das ondas *a* e *b* e razão *a/b*. A investigação foi avaliada separadamente para as condições escotópica e fotópica, como orientado pelo ISCEV.

Na **Figura 50** apresentam-se as curvas eletroretinográficas obtidas, após adaptação ao escuro, nos estímulos luminosos de 0,01 cd.s/m² e 3,0 cd.s/m² (*flash* único), um dia após a administração. O primeiro estímulo permite avaliar a resposta funcional dos bastonetes, advinda de células bipolares, pela onda *b*, enquanto o estímulo mais intenso permite avaliar a resposta máxima padrão combinada para os fotorreceptores cones e bastonetes, marcada por uma onda *a* e por uma onda *b*, decorrente da excitação das células bipolares. As amplitudes das duas ondas *a* e *b* e os tempos implícitos nos diferentes estímulos luminosos em condição escotópica, critério decisivo para estudo da integridade dos fotorreceptores, expressas pela média e desvio padrão, estão sumarizados na **Tabela 46**.

Os gráficos de eletroretinograma para as concentrações de 0,010 e 0,020 mmol/L apresentaram perfis visualmente muito similares aos obtidos para o controle, enquanto para a dose de 0,040 mmol/L percebeu-se visualmente distinção notável entre os perfis para fármaco e controle. Estatisticamente, pelo teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, recomendados para dados não-paramétricos, para *p-valor* < 0,05, a conclusão foi idêntica, ou seja, apenas para a maior dose de fármaco houve diferença significativa comparativamente ao controle. A possibilidade de efeito de toxicidade tardia para a dose de 0,020 mmol/L foi descartada, uma vez que exames eletroretinográficos, apresentados na **Figura 51** para os ratos que receberam a dose, depois de 7 e 15 dias mostraram não haver diferença visual nem estatística das curvas obtidas quando comparadas ao controle, o que confirma que a dose não possui efeito citotóxico para a retina. Em contrapartida, o perfil mostrou-se ainda piorado para exposições mais prolongadas ao fármaco para dose de 0,040 mmol/L, descartando hipótese de que os efeitos citotóxicos poderiam ser apenas transitórios.

Figura 50 –Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópicas de adaptação ao escuro 0,01 cd.s/m² (parte superior) e adaptação ao escuro 3,0 cd.s/m² (parte inferior) obtidas um dia depois de administração intravítrea de doses de 0,01 (parte esquerda, RB1), 0,02 (centro, RB2) e 0,04 mmol/L (parte direita, RB3) no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade in vivo do fármaco acetazolamida.

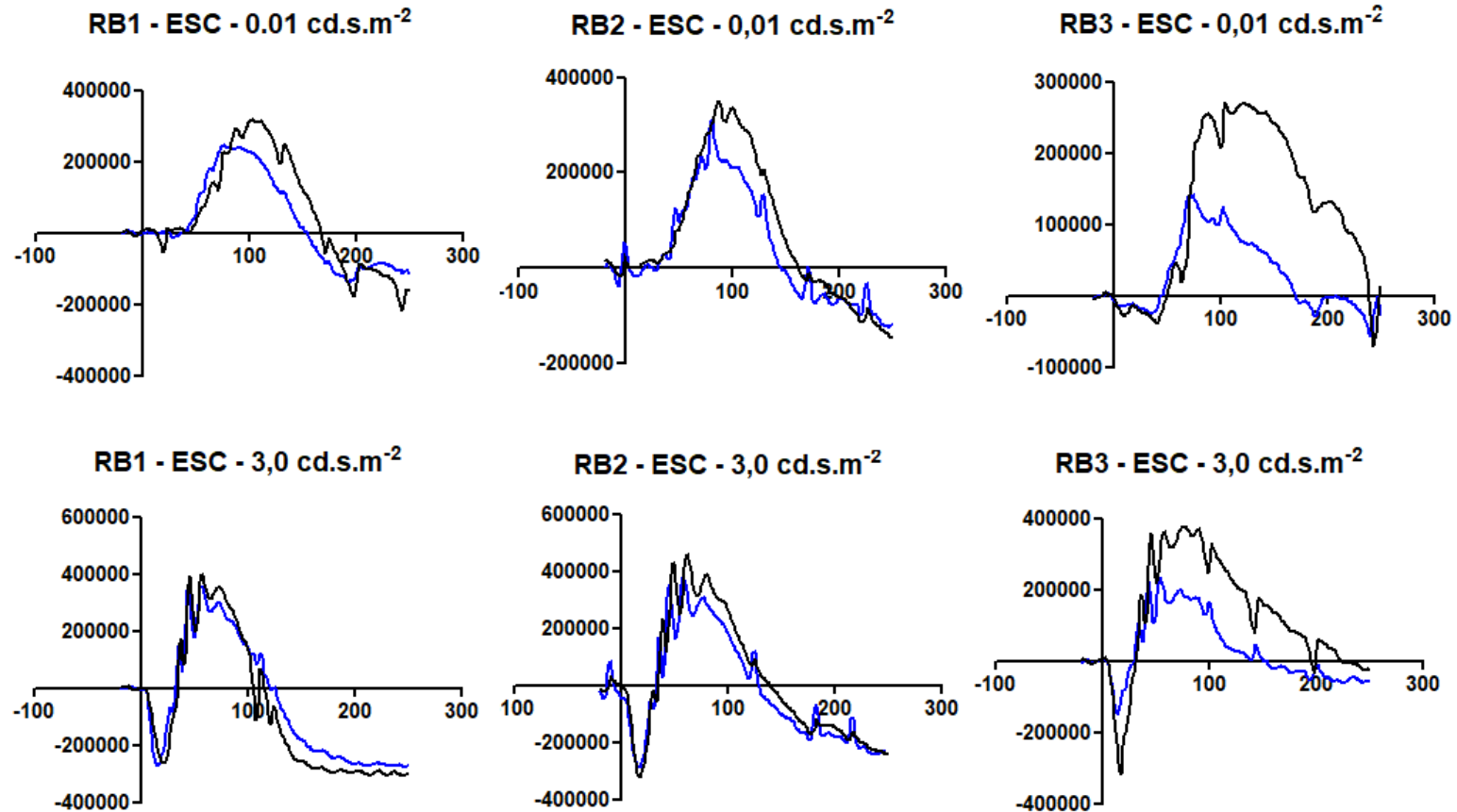
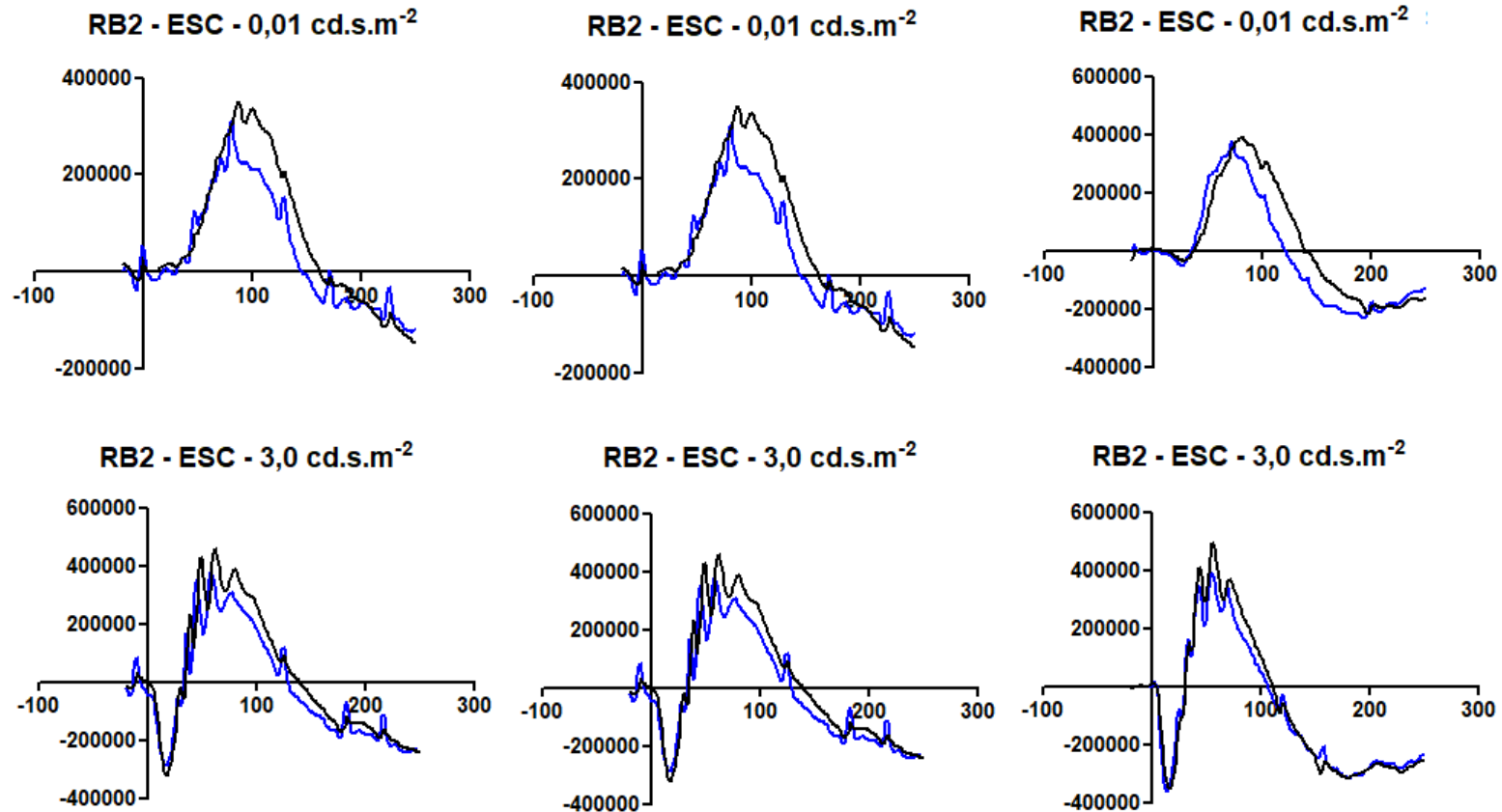


Tabela 46 – Parâmetros para avaliação do estado funcional da retina, para ondas *a* e *b*, antes e 1, 7 e 15 dias após administração de suspensão de acetazolamida em gel de carboximetilcelulose 0,5% m/v, nas doses de 0,010 mmol/L, 0,020 mmol/L e 0,040 mmol/L

Parâmetro	Controle				0,010 mmol/L		
	Pré-injeção	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 1	Dia 7	Dia 15
Amplitude onda <i>a</i> ($\times 10^{-3}$ V)	-281,01 \pm 10,95	-235,43 \pm 13,76 ^a	-269,03 \pm 8,60	-317,40 \pm 20,33	-239,20 \pm 19,24 ^a	-268,57 \pm 6,01	-292,20 \pm 4,81
Tempo implícito onda <i>a</i> (ms)	17,67 \pm 0,58	17,00 \pm 0,00	18,33 \pm 0,58	17,67 \pm 0,58	17,33 \pm 0,58	16,67 \pm 2,08	17,33 \pm 1,15
Amplitude onda <i>b</i> ($\times 10^{-3}$ V)	-692,93 \pm 14,03	-698,07 \pm 16,36	-701,07 \pm 14,12	-691,20 \pm 11,71	-709,80 \pm 8,63	-697,37 \pm 4,00	-689,33 \pm 5,01
Tempo implícito onda <i>b</i> (ms)	56,57 \pm 1,00	56,67 \pm 2,08	57,67 \pm 1,53	56,67 \pm 1,53	54,33 \pm 0,58	54,00 \pm 1,73	56,67 \pm 0,58
Parâmetro	Pré-injeção	0,020 mmol/L			0,040 mmol/L		
		Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 1	Dia 7	Dia 15
Amplitude onda <i>a</i> ($\times 10^{-3}$ V)	-281,01 \pm 10,95	-207,50 \pm 10,50 ^a	-282,20 \pm 14,58	-309,20 \pm 8,93	-192,80 \pm 8,13 ^{ab}	-246,97 \pm 6,73	-348,13 \pm 12,75 ^{ab}
Tempo implícito onda <i>a</i> (ms)	17,67 \pm 0,58	17,33 \pm 0,58	17,67 \pm 1,53	18,00 \pm 1,00	20,00 \pm 1,00	18,33 \pm 1,53	17,00 \pm 1,00
Amplitude onda <i>b</i> ($\times 10^{-3}$ V)	-692,93 \pm 14,03	-677,00 \pm 20,92	-668,00 \pm 14,66	-677,15 \pm 3,89	-609,51 \pm 15,24 ^{ab}	-366,33 \pm 22,71 ^{ab}	-279,43 \pm 9,95 ^{ab}
Tempo implícito onda <i>b</i> (ms)	56,57 \pm 1,00	58,00 \pm 1,00	57,67 \pm 0,58	56,67 \pm 1,53	54,67 \pm 0,58	55,67 \pm 1,53	57,33 \pm 0,58

a: diferença significativa em relação ao grupo pré-injeção – b: diferença significativa em relação ao grupo controle

Figura 51 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópicas de adaptação ao escuro 0,01 cd.s/m² (parte superior) e adaptação ao escuro 3,0 cd.s/m² (parte inferior) obtidas depois de um (parte esquerda), sete (centro) e quinze dias (parte direita) depois de administração intravítrea de doses 0,02 mmol/L no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade in vivo do fármaco acetazolamida.



Todos os parâmetros de amplitude e tempo implícito, para ondas *a* e *b*, foram comparados estatisticamente para os grupos tratados com os resultados encontrados pré-administração e para grupo controle. Não houve diferença significativa nos tempos implícitos para nenhum dos grupos e, no geral, foram inferiores a 20%, portanto pode-se dizer que não há relevância clínica para o resultado encontrado (PETERS *et al.*, 2017). No primeiro dia após a administração, observou-se pequena, mas significativa redução no parâmetro amplitude da onda *a*, variável entre 14,88-31,39%, mesmo para os olhos utilizados como controle. Todavia, as alterações reportadas não foram clinicamente relevantes e possivelmente não causaram dano permanente para a retina, uma vez que foram somente transitórias e os valores se normalizaram depois de 7 e 15 dias. A diminuição deve, portanto, justificar-se pelo efeito negativo do procedimento de injeção intravítrea.

Exceção deve ser feita para grupo que recebeu a dose de 0,040 mmol/L, para o qual persistiram resultados significativamente diferentes, relativos aos grupos pré-injeção e controle, mesmo depois de 15 dias. Contudo, após 15 dias, observou-se, na verdade, aumento na amplitude da onda *a*, de cerca de 23%, que, mesmo incomum, pode decorrer de reações inflamatórias, mudanças que afetem a circulação na retina ou por modulação da camada interna da retina, como discutido por Heckenlively, Tanji e Logani (1994) e Ropstad e Narfstrom (2007). Este grupo ainda foi o único que diferiu estatisticamente dos dois grupos controle na resposta amplitude da onda *b*, cuja resposta foi gradualmente reduzida do primeiro ao último dia do estudo, confirmando o que foi discutido anteriormente sobre deterioração progressiva e tempo-dependente da retina dos animais do grupo expostos ao fármaco. Decréscimos na amplitude da onda *b* são indicativos de morte precoce de bastonetes e lesões na camada interna da retina (PENNESI, WELEBER, 2010), mas o envolvimento das células bipolares, ganglionares e amácrinas foi citada por outros estudos (ROPSTAD, NARFSTROM, 2007).

Nas **Figuras 52 e 53** apresentam-se as curvas eletrorretinográficas obtidas na condição fotópica, após adaptação à luz, nos estímulos luminosos de 3,0 cd.s/m² e *flicker* de 30 Hz, para as concentrações de 0,010, 0,020 e 0,040 mmol/L, no dia seguinte ao que o fármaco foi administrado, ou para a dose de 0,020 mmol/L, uma e duas semanas depois, respectivamente. Uma conclusão parecida pode ser obtida pela inspeção visual e análise estatística dos exames eletrorretinográficos, mas que, aqui, estende-se para a dose mais elevada, de 0,040 mmol/L, em que não se observou diferença significativa, mesmo após 15 dias, quando comparados aos olhos antes da intervenção medicamentosa, principalmente na condição *flicker*.

Figura 52 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições fotópicas de adaptação à luz 3,0 cd.s/m² (parte superior) e adaptação à luz flicker 30 Hz (parte inferior) obtidas um dia de administração intravítrea de doses de 0,01 (parte esquerda, RB1), 0,02 (centro, RB2) e 0,04 mmol/L (parte direita, RB3) no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade in vivo do fármaco acetazolamida.

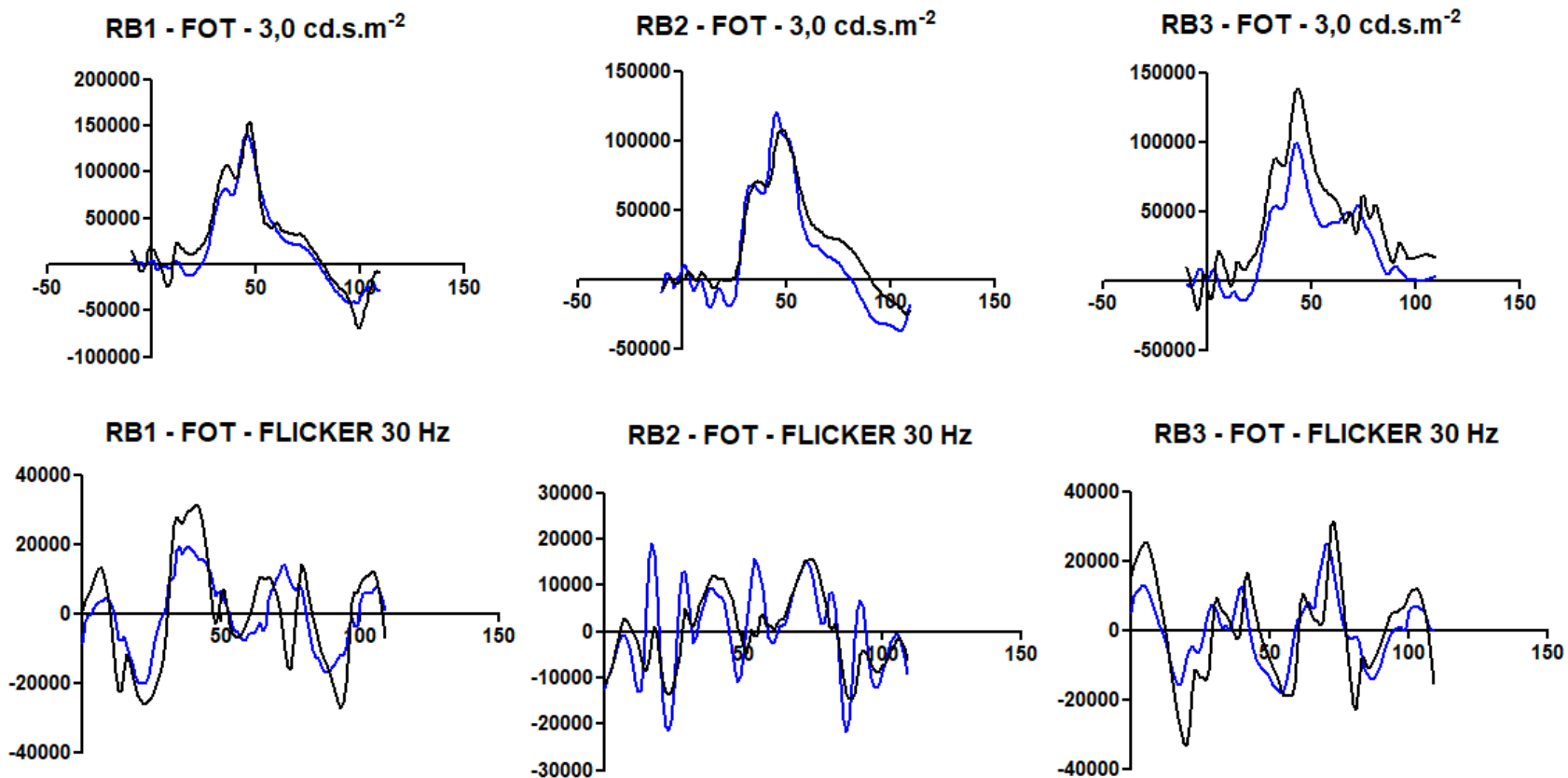
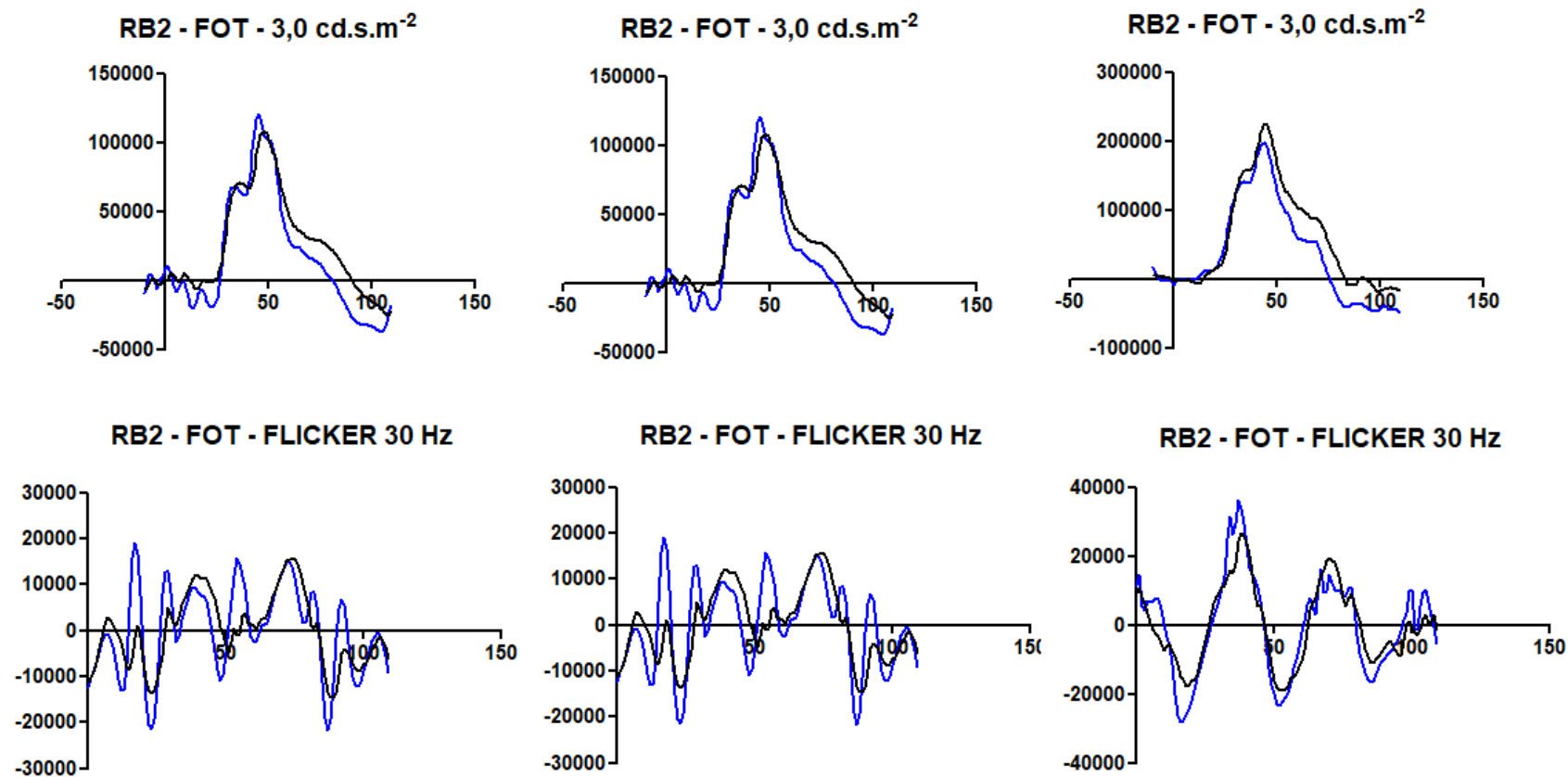


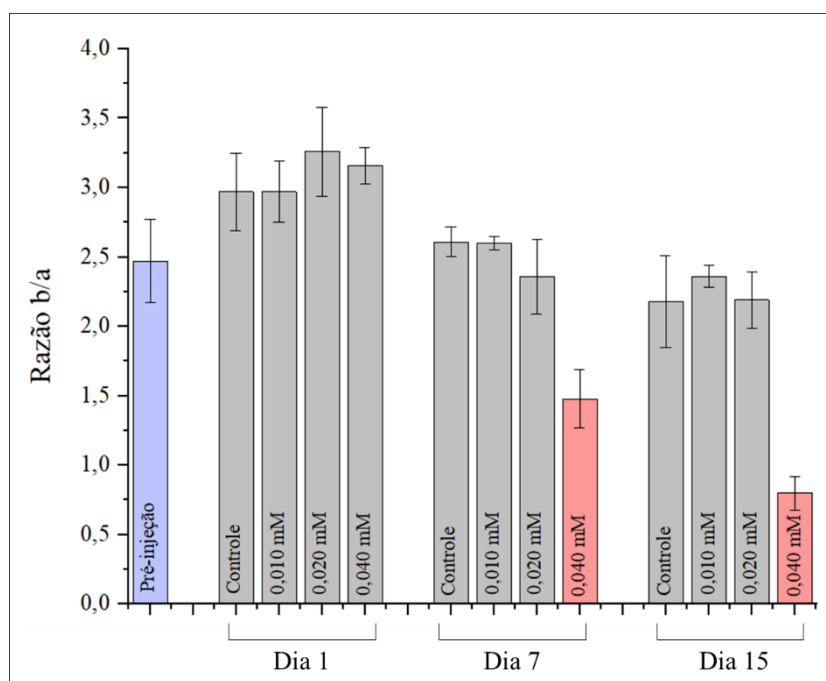
Figura 53 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições fotópicas de adaptação à luz 3,0 cd.s/m² (parte superior) e adaptação à luz flicker 30 Hz (parte inferior) obtidas depois de um (parte esquerda), sete (centro) e quinze dias (parte direita) depois de administração intravítrea de doses 0,02 mmol/L no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de veículo gel de carboximetilcelulose no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação da toxicidade in vivo do fármaco acetazolamida.



A condição fotópica, com um *flash* único de luz branca, permite avaliar prioritariamente o estado funcional dos cones, com uma sutil participação dos bastonetes. O uso do *flicker*, exposição a estímulos luminosos de 30 Hz repetidos, permite, por sua vez, investigação exclusiva do funcionamento dos cones (DAMICO et al., 2012; ODOM et al., 2016). Por isso, propõe-se que o efeito citotóxico observado para a acetazolamida em doses superiores a 0,040 mmol/L relaciona-se majoritariamente a disfunções nos bastonetes e outras células, com menor comprometimento dos cones.

A razão *b/a* é parâmetro importante na avaliação funcional da retina, que reflete a integridade não só dos fotorreceptores, células de Muller e células bipolares, envolvidas nas ondas *a* e *b*, mas ainda a transmissão do sinal entre as células e integridade da retina externa (DAMICO et al., 2012; ODOM et al., 2016). Na **Figura 54**, as razões *b/a* obtidas para as doses do fármaco foram comparadas aos resultados encontrados para o controle, antes da injeção intravítrea e durante os 15 dias do estudo. Não foram observadas alterações significativas durante o período avaliado na razão *b/a* para as duas doses menores nem para a dose de 0,040 mmol/L um dia depois da administração intravítrea, mas diferença consideravelmente significativa foi observada para a maior dose uma e duas semanas depois que o fármaco foi administrado, o que corrobora com a discussão anterior. Desse modo, concluiu-se que doses superiores a 0,040 mmol/L afetaram a integridade das células supracitadas, retina externa e transmissão sináptica.

Figura 54 – Comparação das razões b/a para avaliação do estado funcional da retina por eletroretinografia (ERG), antes e um, sete e quinze dias depois da administração de doses de 0,010 0,020 e 0,040 mmol/L no olho direito de ratos da linhagem Wistar durante avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco acetazolamida.



Todos resultados discutidos na avaliação da toxicidade *in vivo* por eletroretinografia convergiram com os reportados no estudo *in vitro*, permitindo concluir que a acetazolamida é tóxica para a retina apenas na concentração de 0,040 mmol/L e que a toxicidade se manifesta imediatamente, poucas horas após a administração, mas aumenta progressivamente com o avançar dos dias. Entretanto, seu uso é seguro, por via intravítrea, em doses menores ou iguais a 0,020 mmol/L, não provocando efeitos tóxicos por período de, no mínimo, 15 dias.

Até o momento presente, poucos estudos se propuseram a avaliar a toxicidade *in vivo* da acetazolamida por eletroretinografia. Borhani *et al.* (1994) avaliaram a toxicidade de acetazolamida em coelhos, após administração intravítrea e concluíram que doses de até 0,5 mg não causariam efeitos tóxicos para a retina, enquanto doses superiores a 1 mg reduziram a amplitude da onda *b* e causaram danos aos fotorreceptores, confirmados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Também em coelhos, anos depois, Uematsu *et al.* (2006) reportaram que a administração intravítrea de doses de 10 mg/mL não alterou significativamente nem amplitude nem latência das ondas *a* e *b*, não observando nenhuma anormalidade na retina por microscopia óptica. Os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram, no entanto, que doses muito menores, de 0,040 mmol/L, foram

suficientemente tóxicas para a retina, mas em ratos, o que dificulta a comparação dos resultados, que podem não ser reprodutíveis em outro modelo animal

É preciso ressaltar que, após as injeções intravítreas, não se observou alterações específicas, como hemorragia, catarata e descolamento de retina, nos olhos dos animais, por avaliação clínica e oftalmoscopia binocular indireta. Por tonometria de aplanção de Goldmann, não se observou diferença significativa, por ANOVA com pós-teste de Bonferroni, entre os níveis de pressão intraocular nos olhos em que foram administrados fármaco e veículo. Por isso, as doses de 0,010 e 0,020 mmol/L foram escolhidas para estudo posterior de neuroproteção.

3.3 Avaliação do efeito neuroprotetor do fármaco acetazolamida por eletrorretinografia

Estratégias terapêuticas pautadas em potencial efeito neuroprotetor, com objetivo de garantir o bom estado dos fotorreceptores cones e bastonetes, foram desenvolvidas e avaliadas nas últimas décadas, mas falharam em provar inequivocamente eficácia até o presente momento, com resultados normalmente inconclusivos (VASUDEVAN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2016). Recentemente, o Instituto de Visão Europeu, em consenso sobre necessidades não satisfeitas em oftalmologia, estabeleceu como prioridade para 2019-2025 o desenvolvimento de alternativas medicamentosas não-dependentes de redução da pressão intraocular, especialmente focados em neuroproteção (CURSIFIEN *et al.*, 2019).

Diferentes autores propuseram possíveis mecanismos que justificariam efeito neuroprotetor por inibidores da anidrase carbônica, entre os quais se destaca a acetazolamida. Laux e Raichle (1978), Okazawa *et al.* (2001), Reitsamer *et al.* (2009), Topping *et al.* (2009) e Shih e Calkins (2012) revelaram efeito vasodilatador pelo uso de fármacos da classe, enquanto Martínez e Sanchez-Salorio (2009) relataram aumento do suprimento sanguíneo após administração ocular. Harris *et al.* (1999), Ridderstrale e Wistrand (2000), Kniep *et al.* (2006) e Sanchez-Pulgarin *et al.* (2011) discutem ainda que os fármacos modulam o pH do fluido extracelular, que poderia contribuir para a manutenção dos fotorreceptores. Entretanto, nenhum estudo que confirmasse ou refutasse as propostas acima foi publicado.

Desse modo, propôs-se avaliar a capacidade da acetazolamida de produzir efeito neuroprotetor, empregando eletrorretinografia, em ratos da linhagem Wistar. Exames eletrorretinográficos, na condição escotópica, com estímulos luminosos de 0,01 cd.s/m² e 3,0

cd.s/m², foram realizados para quatro animais, após administração intravítrea de 0,020 mmol/L do fármaco e exposição posterior a 40000 lux de iluminância, por 2 horas e por 8 dias consecutivos, utilizando o olho esquerdo como controle, após administração de salina estéril. O quinto animal apresentou problemas durante a injeção intravítrea, desenvolvendo catarata no olho direito, o que impossibilitaria o estudo funcional da retina e foi, portanto, excluído do estudo. As curvas eletrorretinográficas são apresentadas na **Figura 55**.

Durante o estudo, observou-se deterioração significativa do estado funcional da retina provocada pela exposição à luz, verificada pela redução nas amplitudes e aumento nos tempos implícitos ou latência para as ondas *a*, como mostrado na **Tabela 47**. Todavia, inspeção visual das curvas e análise estatística, comprovaram não haver diferença significativa entre os resultados obtidos para acetazolamida e controle, ou seja, a presença do fármaco não conseguiu prevenir nem sequer minimizar esse processo degenerativo. Por isso, os ensaios preliminares realizados indicaram ausência de efeito neuroprotetor para a acetazolamida, uma vez que a degeneração da retina após exposição à luz, para o fármaco, é estatisticamente idêntica ao que ocorre para o controle. Vishwaraj *et al.* (2022) discutiram recentemente que, de fato, a neuroproteção conferida por inibidores da anidrase carbônica está diretamente correlacionada ao seu efeito redutor na pressão intraocular, sem contribuição considerável de nenhum mecanismo secundário.

Figura 55 – Curvas de eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópicas de adaptação ao escuro 0,01 cd.s/m² (parte superior) e adaptação ao escuro 3,0 cd.s/m² (parte inferior) obtidas depois de um (parte esquerda), sete (centro) e quinze dias (parte direita) depois de administração intravítrea de doses 0,02 mmol/L no olho direito (em azul), em comparação com curvas obtidas depois de administração de salina estéril no olho esquerdo (em preto) de ratos da linhagem Wistar, para avaliação de possível efeito neuroprotetor do fármaco acetazolamida.

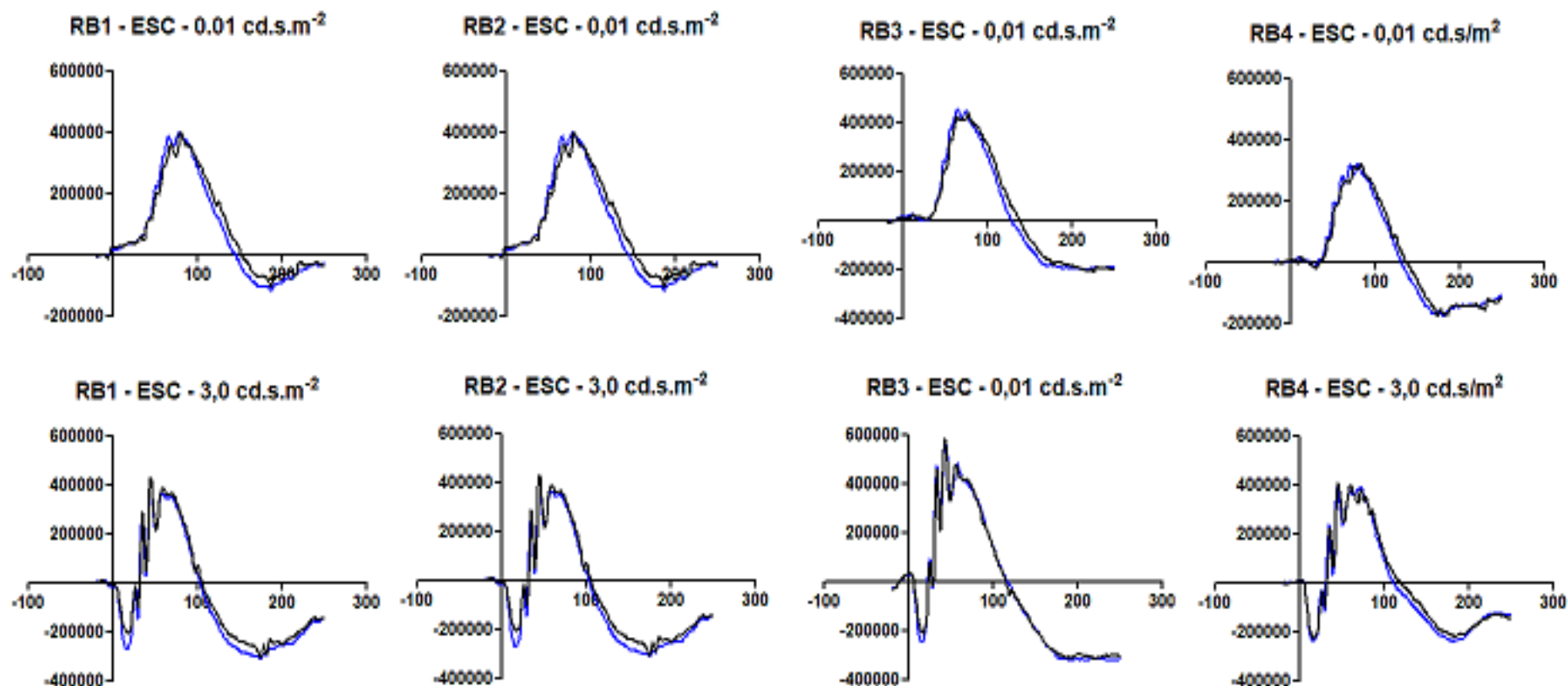


Tabela 47 – Parâmetros para avaliação do efeito neuroprotetor, para ondas *a* e *b*, antes e 5 dias após administração de suspensão de acetazolamida em gel de carboximetilcelulose 0,5% m/v, na dose de 0,020 mmol/L

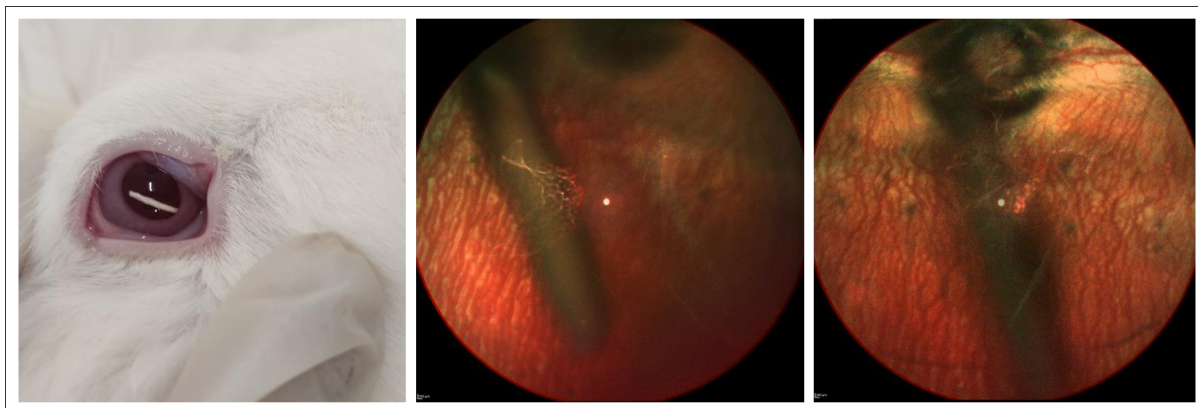
Parâmetro	Controle	Dia 5
Amplitude onda <i>a</i> ($\times 10^{-3}$ V)	345,23 \pm 22,12	346,90 \pm 33,78
Tempo implícito onda <i>a</i> (ms)	79,25 \pm 2,87	77,25 \pm 2,50
Amplitude onda <i>b</i> ($\times 10^{-3}$ V)	-553,50 \pm 28,82	-543,50 \pm 19,59
Tempo implícito onda <i>b</i> (ms)	44,25 \pm 0,96	44,25 \pm 0,96

3.4 Avaliação da toxicidade *in vivo* dos implantes intravítreos contendo acetazolamida

3.4.1 Administração intravítrea de implantes ou injeções na cavidade vítrea dos olhos de coelhos

O procedimento de administração intravítrea, por inserção dos implantes intravítreos ou por injeção intravítrea de solução do fármaco a 0,020 mmol/L foi eficazmente realizado, uma vez que não foram observados sinais de sangramento, catarata ou quaisquer outras anormalidades. A **Figura 56** mostra o implante intravítreo inserido na cavidade intravítrea imediatamente após administrados, na metade (21 dias) e no final do estudo (42 dias), em imagens de fundo de olho. É possível observar o afinamento do dispositivo nos últimos dias de acompanhamento. Durante o estudo, notou-se que os implantes apresentaram pouca ou nenhuma mobilidade, mantendo-se próximos ao local em que foram administrados, o que é imprescindível porque uma movimentação poderia comprometer a visão dos animais.

Figura 56 – Presença do implante intravítreo na cavidade intravítrea dos coelhos albinos da raça New Zealand, em fotografia retirada imediatamente depois da administração (a) e em imagens de fundo de olho obtidas por oftalmoscopia confocal de varredura a laser, depois de 21 dias (b) e 42 dias (c) da inserção dos dispositivos.



Decorrido o período estabelecido para cada grupo, os implantes foram cirurgicamente removidos. Nas primeiras duas semanas de estudo, os dispositivos mantiveram sua morfologia e aparência praticamente intactas, enquanto nas duas semanas posteriores apresentaram-se mais irregulares e maleáveis, com visível intumescimento. No final do estudo, foram removidos implantes, que estavam muito mais finos, curtos, frágeis ou inteiramente fragmentados. Esse perfil é condizente com o encontrado nos ensaios de perda de massa e absorção de água, durante caracterização físico-química dos implantes, o que fornece indícios positivos, de que o comportamento observado para perda de massa e perfil de liberação *in vitro* deve ser reproduzido *in vivo*, no estudo farmacocinético.

3.4.2 Avaliação clínica

Durante a duração do estudo *in vivo*, os coelhos foram monitorados periodicamente por profissional veterinário para acompanhamento clínico. Não houve nenhuma intercorrência ocular que justificasse a exclusão de nenhum animal do estudo, mantendo-se o número amostral. Entretanto, dois coelhos manifestaram sintomas característicos de escabiose, confirmada posteriormente por exame parasitológico, que, pelo ato reflexo de se coçar, refletiram em lesões na pele, orelha e na região periocular. Estes animais foram isolados em gaiolas individuais e devidamente tratados, conforme protocolo interno.

Exames oftalmológicos por inspeção ocular, oftalmoscopia binocular indireta e biomicroscopia com lâmpada de fenda não evidenciaram toxicidade local, uma vez que não foram observadas manifestações clínicas como edema na córnea, secreção conjuntival, hipópio, catarata, opacidade vítrea, hemorragia, neovascularização, atrofia do nervo óptico ou descolamento da retina. Fotografias do fundo de olho dos coelhos, obtidas em oftalmoscópio confocal de varredura a laser para os grupos que receberam injeções intravítreas e grupos nos quais foram inseridos os dispositivos intravítreos, dispostas na **Figura 57** e na **Figura 58**, respectivamente, confirmam a ausência de qualquer sinal de toxicidade.

Figura 57 – Imagens de fundo de olho de coelhos albinos da raça New Zealand obtidas por oftalmoscopia confocal de varredura a laser para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração intravítrea de salina estéril (b) e do fármaco acetazolamida a 0,020 mmol/L depois de três (c) e sete dias (d), para avaliação da toxicidade *in vivo*.

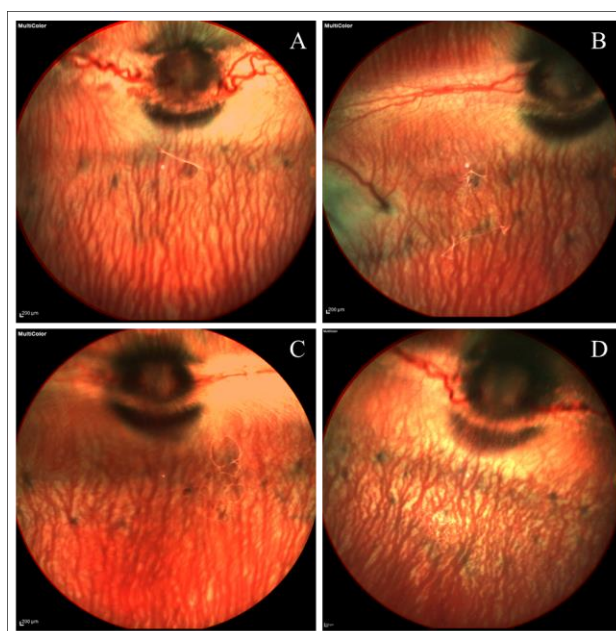
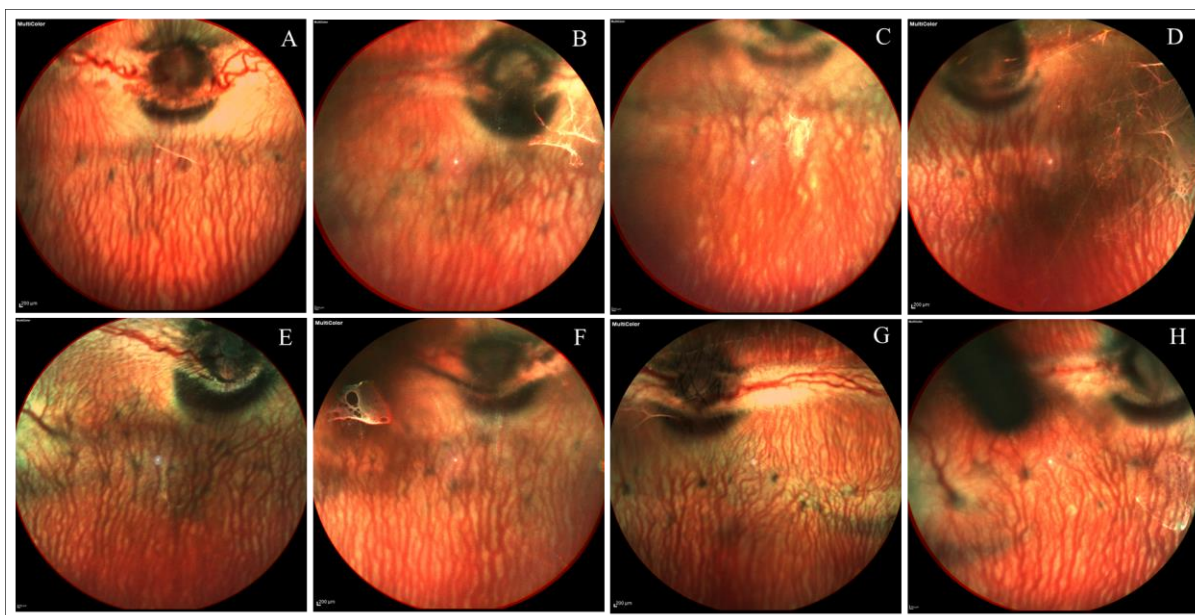


Figura 58 – Imagens de fundo de olho de coelhos albinos da raça New Zealand obtidas por oftalmoscopia confocal de varredura a laser para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração de implante intravítreo branco (b) e de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de sete (c), quatorze (d), vinte e um (e), vinte e oito (f), trinta e cinco (g) e quarenta e dois dias (h), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.



Em poucos coelhos (<15%), viu-se moderada hiperemia palpebral ou discreta hiperemia conjuntival, provavelmente decorrentes do procedimento de administração do fármaco ou dispositivos intravítreos, mas ambas regrediram espontaneamente em menos de duas semanas e não foram mais observadas no decorrer do estudo *in vivo*, sem comprometimento. Os resultados comprovaram ausência de sinais de irritação ocular, adequada tolerabilidade e segurança dos implantes intravítreos desenvolvidos.

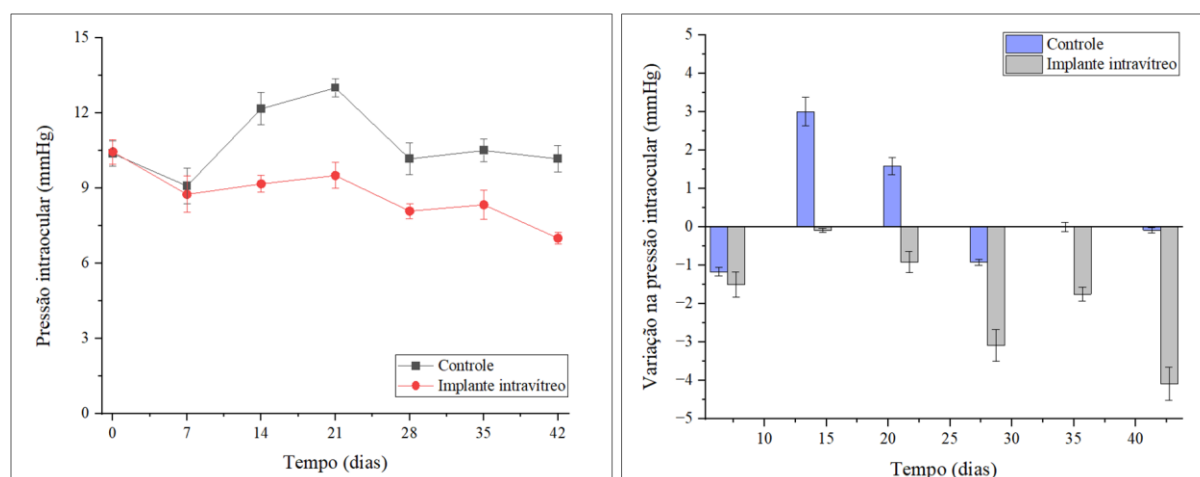
3.4.3 Tonometria de aplanção de Goldmann

A pressão intraocular dos olhos direito e esquerdo dos coelhos foi monitorada antes e semanalmente depois da inserção dos implantes intravítreos, pois, como afirmaram Zou *et al.* (2010) e Paiva *et al.* (2020), o parâmetro é um valioso critério para certificar-se que um medicamento oftálmico é biocompatível e seguro. Ademais, um dos efeitos adversos mais notórios observados com o uso de implantes intravítreos é, justamente, o aumento da pressão

intraocular (DE VRIES, BASSIL, RAMDAS, 2020; PAIVA *et al.*, 2020). Dois gráficos são apresentados na **Figura 59**, em que se notou sutil aumento na pressão intraocular nos olhos usados como controle, nos primeiros 21 dias do estudo *in vivo*, muito possivelmente como resposta ao procedimento cirúrgico, mas posteriormente a pressão retornou aos níveis basais. Por isso, no final do estudo, a pressão intraocular foi de $10,17 \pm 1,34$ mmHg, equiparáveis aos resultados mensurados pré-administração, que foram $10,44 \pm 0,78$ mmHg, com variação de apenas -2,5%, não significativa, mas suficiente para confirmação da biocompatibilidade do ácido polilático-co-glicólico, extensivamente reportada.

Esse perfil não foi observado para os olhos que receberam o dispositivo contendo o fármaco. Nestes, a pressão intraocular foi reduzida gradualmente do primeiro ao último dia do estudo *in vivo*, sendo sempre menor do que o grupo controle. A pressão intraocular reduziu-se de $10,38 \pm 0,71$ mmHg, nível basal, para $7,00 \pm 1,04$ mmHg depois de seis semanas, uma diminuição média de 4,08 mmHg ou 32,5%, que foi estatisticamente significativa.

Figura 59 – Monitoramento da pressão intraocular nos olhos controle e administrados de implante intravítreo contendo acetazolamida durante período de quarenta e dois dias (a) e variação da pressão intraocular relativa aos níveis basais reportados antes do procedimento de inserção de implante intravítreo contendo acetazolamida (b), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida



A interpretação dos resultados permitiu concluir que os implantes intravítreos não foram tóxicos para os coelhos, durante toda a experimentação animal, conclusão compatível com aqueles obtidos para outros dispositivos similares, como os desenvolvidos por Fialho *et al.* (2006), Saliba *et al.* (2012), Souza *et al.* (2014), Almeida *et al.* (2015), Fernandes-Cunha *et*

al. (2017), Toledo *et al.* (2019), Paiva *et al.* (2020) e Vieira *et al.* (2021), para fármacos não utilizados no manejo do glaucoma. A significativa redução na pressão intraocular, clinicamente relevante, em coelhos normotensos, foi considerado um bom indicativo de sua eficácia na terapia anti-glaucoma. Uma vez que a redução encontra-se entre 20-50%, alvo estabelecido no manejo do glaucoma (JONAS *et al.*, 2017; BRASIL *et al.*, 2018), foi clinicamente relevante. Entretanto, estudos posteriores, com modelo animal com glaucoma induzido, devem ser realizados para confirmar se o efeito hipotensor é mantido no contexto para o qual serão futuramente usados.

Kaur, Singh e Kanwar (2000) e posteriormente Palma *et al.* (2009) reportaram resultados similares para redução da pressão intraocular em coelhos normotensos, de 4 mmHg ou 30%. No primeiro estudo foi empregada suspensão *in situ* contendo entre 5-10% m/v de acetazolamida na formulação, enquanto no segundo sistemas multicomponentes mucoadesivos de ciclodextrinas foram usados. Entretanto, o efeito hipotensor foi mantido por menos de quatro horas, uma vez que as formulações não foram capazes de promover liberação prolongada do fármaco. Similarmente, Mazyed e Abdelaziz (2020), empregando transgelossomas formados *in situ*, Verma *et al.* (2013), Singh, Chhabra e Pathak (2014), Morsi *et al.* (2014), Quinteros *et al.* (2016) e Morsi *et al.* (2017), utilizando nanopartículas poliméricas, Mishra e Jain (2014), empregando dendrímeros e Teba, Khalil e Sorogy (2021), fazendo uso de cubossomas, mantiveram pressão intraocular reduzida por cerca de 4-24 horas nos seus estudos, duração inviável para tratamento crônico.

Durações de efeito maiores, entre dias e uma e duas semanas, foram reportadas por Agarwal, Garg e Kaur (2004), Guinedi *et al.* (2005), El-Menshawe (2012) e mais recentemente por Abdelmonem *et al.* (2021) para lipossomas ou niossomas. Dois estudos se destacam nesse âmbito: Hathout *et al.* (2007) e Tártara *et al.* (2012). No primeiro, os autores descreveram lipossomas de fosfatidilcolina e colesterol que apresentaram liberação controlada de acetazolamida, suficiente para manter níveis reduzidos de pressão intraocular, de forma estável, por 3 meses, sem sinais de irritação ocular. Contudo, a segurança da formulação proposta não foi avaliada satisfatoriamente *in vitro* ou *in vivo*. No segundo estudo, coagéis de ácido 6-*o*-lauril-L-ascórbico reduziram a pressão intraocular, com eficiência maior que formulações comerciais de brinzolamida, mas ressaltaram que sua formulação demonstrou irritação leve ou moderada, tempo-dependente.

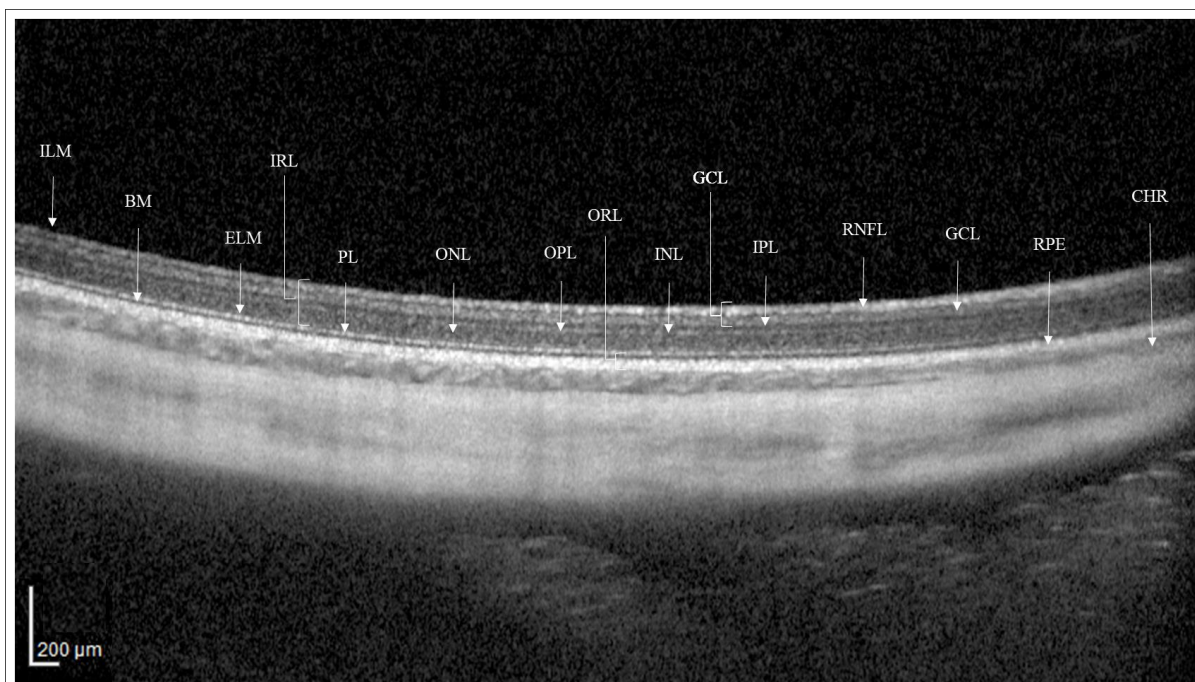
Percebe-se, portanto, o enorme potencial da formulação desenvolvida no presente estudo, que exibiu perfil de liberação sustentada em ensaio *in vitro* e reduziu a pressão intraocular de forma estável por, no mínimo, seis semanas, uma vez que o estudo *in vivo* foi interrompido depois desse prazo.

3.4.4 Tomografia de coerência óptica de domínio espectral

Ferramenta poderosa e cada vez mais importante na área oftalmológica, a tomografia de coerência óptica é um método não-invasivo e sem contato que permite obter imagens digitais transversais, com elevada resolução, *in vivo* ou em tempo real, de diferentes tecidos, como córnea e retina. Por isso, é frequentemente utilizada na prática clínica no diagnóstico de doenças dos segmentos anterior e posterior, como o glaucoma (AL-MUJAINI *et al.*, 2013; ADHI, DUKER, 2013). Sakata *et al.* (2009) reiteraram em estudo de revisão a enorme relevância do uso de tomografia de coerência óptica para avaliação e monitoramento de toxicidade *in vivo* da retina e do nervo óptico, uma vez que permite fácil e rápida identificação de mudanças na morfologia e análise quantitativa das camadas da retina. Por isso, desde sua descoberta, em 1991, muitos autores propuseram seu emprego na avaliação do efeito de fármacos e formas farmacêuticas sobre a retina (MURAOKA *et al.*, 2012).

Desse modo, propôs-se nesse trabalho o uso de tomografia de coerência óptica, combinada com oftalmoscopia confocal de varredura a laser, para monitorar semanalmente se a estrutura da retina de coelhos seria mantida ou sofreria modificações decorrentes de eventual degeneração provocada pelo fármaco. A **Figura 60** dispõe imagem, em corte transversal, da retina do olho de um coelho antes da intervenção proposta para cada grupo, na qual foi possível discriminar individualmente as doze camadas que constituem a retina, mais a coroide.

Figura 60 – Corte transversal da retina de coelho albino da raça New Zealand, antes de administração intravítrea, obtida por tomografia de coerência óptica (OTC), com discriminação de cada uma de suas camadas.



ILM: membrana limitante interna – BM: membrana de Bruch – ELM: membrana limitante externa – IRL: camada interna da retina – PL: camada de fotorreceptores – ONL: camada nuclear externa – OPL: camada plexiforme externa – ORL: camada externa da retina – INL: camada nuclear interna – GC: complexo ganglionar celular – IPL: camada plexiforme externa – RNFL: camada de fibras nervosas – GCL: camada de células ganglionares – RPE: epitélio pigmentar da retina – CHR: coróide

As imagens foram obtidas para todos os animais por grupo, nos olhos direito e esquerdo, utilizados como controle, durante todo intervalo do estudo. Resultados representativos para cada grupo estão dispostos na **Figura 61** e na **Figura 62**, para os grupos administrados com injeção intravítrea e implante intravítreo, respectivamente.

Figura 61 – Cortes transversais da retina de coelhos albinos da raça New Zealand representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração intravítrea de salina estéril (b) e do fármaco acetazolamida na dose de 0,020 mmol/L depois de três (c) e sete dias (d) para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.

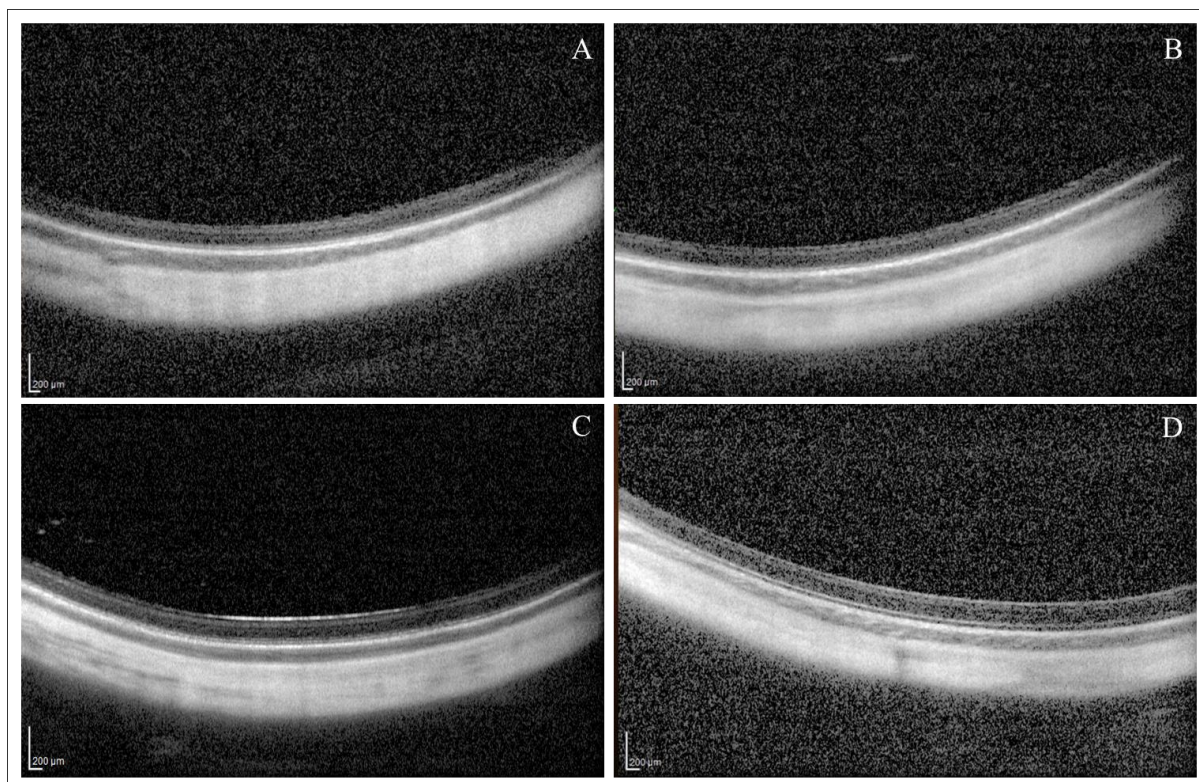
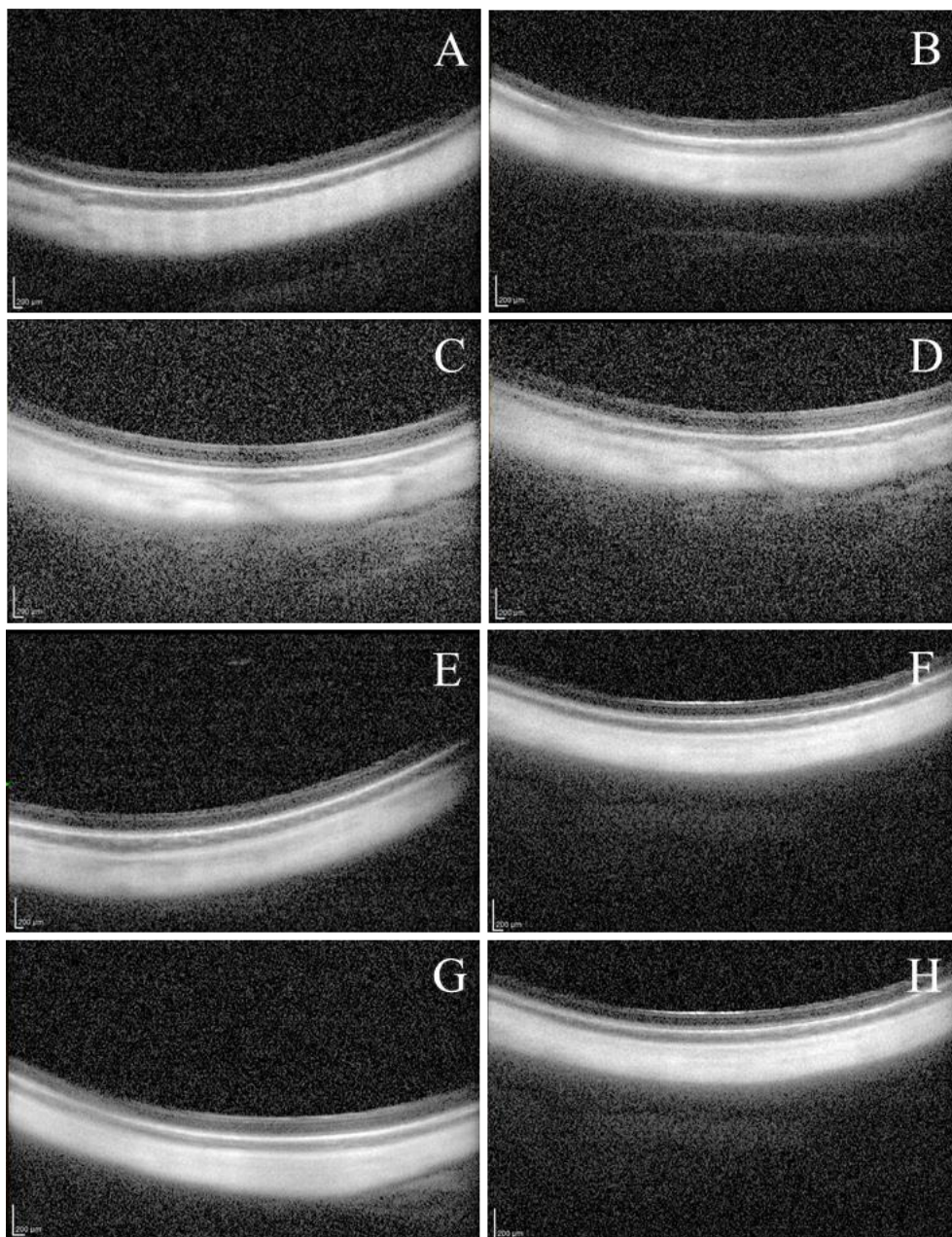


Figura 62 – Cortes transversais da retina de coelhos albinos da raça New Zealand representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois de administração de implante intravítreo branco (b) e de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de sete (c), quatorze (d), vinte e um (e), vinte e oito (f), trinta e cinco (g) e quarenta e dois dias (h), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida



Visualmente, notou-se uma perceptível concordância entre as imagens obtidas para os grupos controle, pré-administração ou depois de administrados salina estéril ou implante intravítreo sem fármaco, e para os grupos que receberam um dos dois tratamentos, sem distinções entre os primeiros ou derradeiros dias do estudo *in vivo*. Todas as camadas puderam ser observadas em todos os grupos, com dimensões e morfologia aparentemente intactas e sem nenhuma

deformação estrutural sugestiva de toxicidade, como as discutidas por Muraoka *et al.* (2012) ou descritos no atlas de anatomia da retina em pacientes saudáveis ou acometidos por diferentes patologias, produzido pelo fornecedor do equipamento (ADAMS, 2013). Em alguns exames, uma sombra preta foi percebida nos cortes de retina, em virtude da presença do implante intravítreo.

Para confirmação dos resultados e análise quantitativa, as espessuras das camadas da retina foram mensuradas, conforme ferramenta do *software*. Todavia, a nitidez de alguns exames não foi suficiente e o *software* não conseguiu quantificar precisamente todas as camadas para todos os coelhos, o que poderia aumentar a imprecisão das medidas e diminuir sua confiabilidade, superestimando ou subestimando resultados e conduzindo a interpretações errôneas. Desse modo, apenas as camadas que puderam ser mensuradas para, no mínimo, 75% dos animais por grupo ($n = 3$), foram comparadas entre os grupos. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão, para espessura da retina e camadas interna e externa, foram avaliados estatisticamente por ANOVA de uma via, com pós-teste de Bonferroni, e são apresentados na **Tabela 48**.

Tabela 48 – Espessuras da retina e suas camadas interna e externa, por tomografia de coerência óptica, para grupo sem intervenção, administrados de implante intravítreo branco e administrados de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias e 42 dias

Grupo	Espessura (μm)		
	Camada interna	Camada externa	Retina
Sem intervenção	115,75 \pm 6,08	47,50 \pm 4,51	163,25 \pm 10,50
Salina estéril	113,25 \pm 6,65	43,50 \pm 3,87	156,75 \pm 9,91
Implante branco	114,00 \pm 7,39	45,75 \pm 3,50	159,75 \pm 10,75
Grupo I	116,50 \pm 8,50	45,25 \pm 6,99	161,75 \pm 15,00
Grupo II	116,50 \pm 4,20	44,00 \pm 2,71	160,50 \pm 6,81
Grupo III	116,75 \pm 8,06	42,00 \pm 5,60	158,75 \pm 13,30
Grupo IV	114,25 \pm 4,11	43,25 \pm 3,10	157,50 \pm 7,14
Grupo V	117,50 \pm 3,51	44,75 \pm 2,87	162,25 \pm 5,91
Grupo VI	116,25 \pm 2,75	45,00 \pm 1,83	161,25 \pm 3,59
Grupo VII	117,75 \pm 5,32	45,50 \pm 4,04	163,25 \pm 9,29
Grupo VIII	115,00 \pm 9,09	43,25 \pm 7,46	158,25 \pm 16,44

Não se observou diferença significativa, com p -valor $< 0,05$, entre os grupos para nenhum dos parâmetros mensurados, confirmando que os implantes intravítreos não exibiram efeito tóxico sobre nenhuma camada específica ou sobre a retina no geral, durante 42 dias de exposição. Flutuações observadas no estudo podem ser, portanto, justificadas por erro randômico, pela variabilidade individual entre animais e pela dificuldade de padronizar o procedimento de medida sempre na mesma posição. Em seu estudo, Kim *et al.* (2021) concluíram que mesmo variações milimétricas na posição em que as imagens são obtidas, distantes do nervo óptico, podem aumentar ou diminuir consideravelmente a espessura de uma ou mais camadas, mas a padronização proposta foi suficiente para que as variações não fossem relevantes do ponto de vista estatístico.

O mesmo perfil de segurança foi observado para o fármaco em solução, na dose de 0,020 mmol/L, por até 7 dias. É necessário ressaltar que a dose de 0,020 mmol/L é cerca de duas vezes maior que a dose diária máxima liberada no perfil de liberação *in vitro*. Uma vez que se espera que esse perfil seja reproduzido pelo menos parcialmente *in vivo*, considerando ainda os efeitos de drenagem ocular, ligação às proteínas e biotransformação que reduziriam a biodisponibilidade intravítrea do fármaco, os resultados aqui demonstrados sugerem fortemente que o uso de implantes intravítreos de acetazolamida é seguro.

Não estão disponíveis estudos que empregaram tomografia de coerência óptica para a acetazolamida, pois, como discutido anteriormente, o estudo da segurança do uso tópico do fármaco foi negligenciado. Entretanto, cabe mencionar que as espessuras encontradas no presente estudo para retina, camada interna e camada externa foram coincidentes com os valores reportados para retina saudável de coelhos albinos por outros autores, como Muraoka *et al.* (2012), Lavaud *et al.* (2020) e mais recentemente por Kim *et al.* (2021).

3.4.5 Avaliação histológica

Decorrido o intervalo compreendido para cada grupo, os coelhos foram eutanasiados, os olhos foram enucleados e cortes histológicos de 4 μ m ao redor do nervo óptico foram obtidos. A avaliação histopatológica permite a observação de alterações no nível celular, muitas vezes despercebidas em outros ensaios. Portanto, é uma ferramenta importante em estudos de

toxicidade retiniana de fármacos administrados via intravítrea, especialmente quando associada a outros métodos e exames diagnósticos.

Cortes histológicos para os grupos I e II, que receberam injeção intravítrea, e para os outros grupos (II a VIII), nos quais foram inseridos os implantes, comparados aos respectivos controles, estão dispostos nas **Figura 63** e **64**. Pode-se notar que não foi evidenciado nenhum sinal de toxicidade retiniana, muito menos a infiltração de células inflamatórias em nenhum corte, do início ao final do estudo. Percebe-se ainda que nenhuma anormalidade foi observada na retina por microscopia de luz, corroborando com os resultados anteriores e confirmando, mais uma vez, que a estrutura e morfologia da retina e suas camadas foi inteiramente preservada.

Figura 63 – Cortes histológicos (20x/0.40mm) da retina de coelhos albinos da raça New Zealand representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois da administração intravítrea de salina estéril (b) e do fármaco acetazolamida na dose 0,020 mmol/L depois de três (c) e sete dias (d), para avaliação da toxicidade *in vivo*.

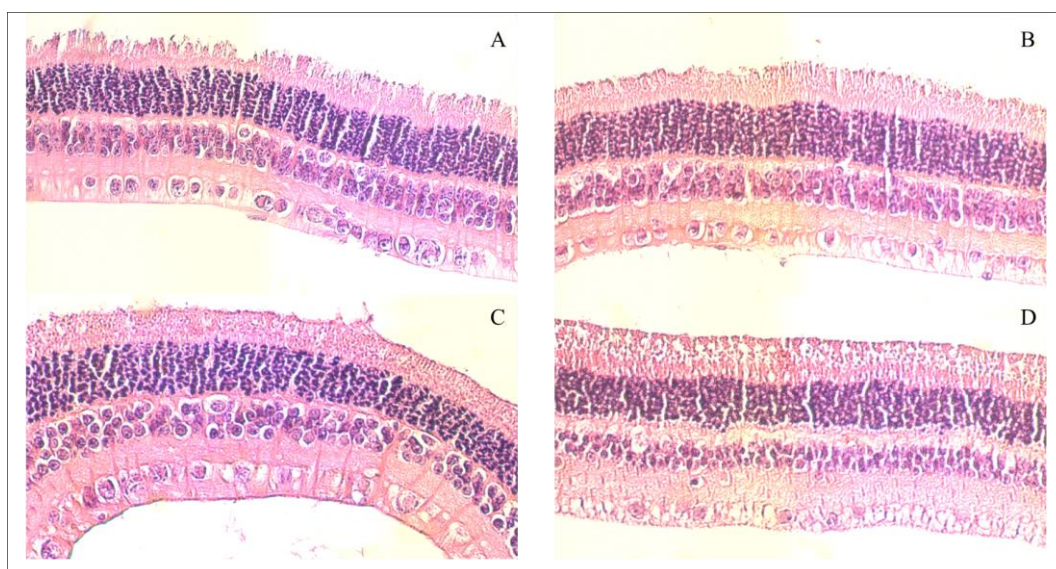
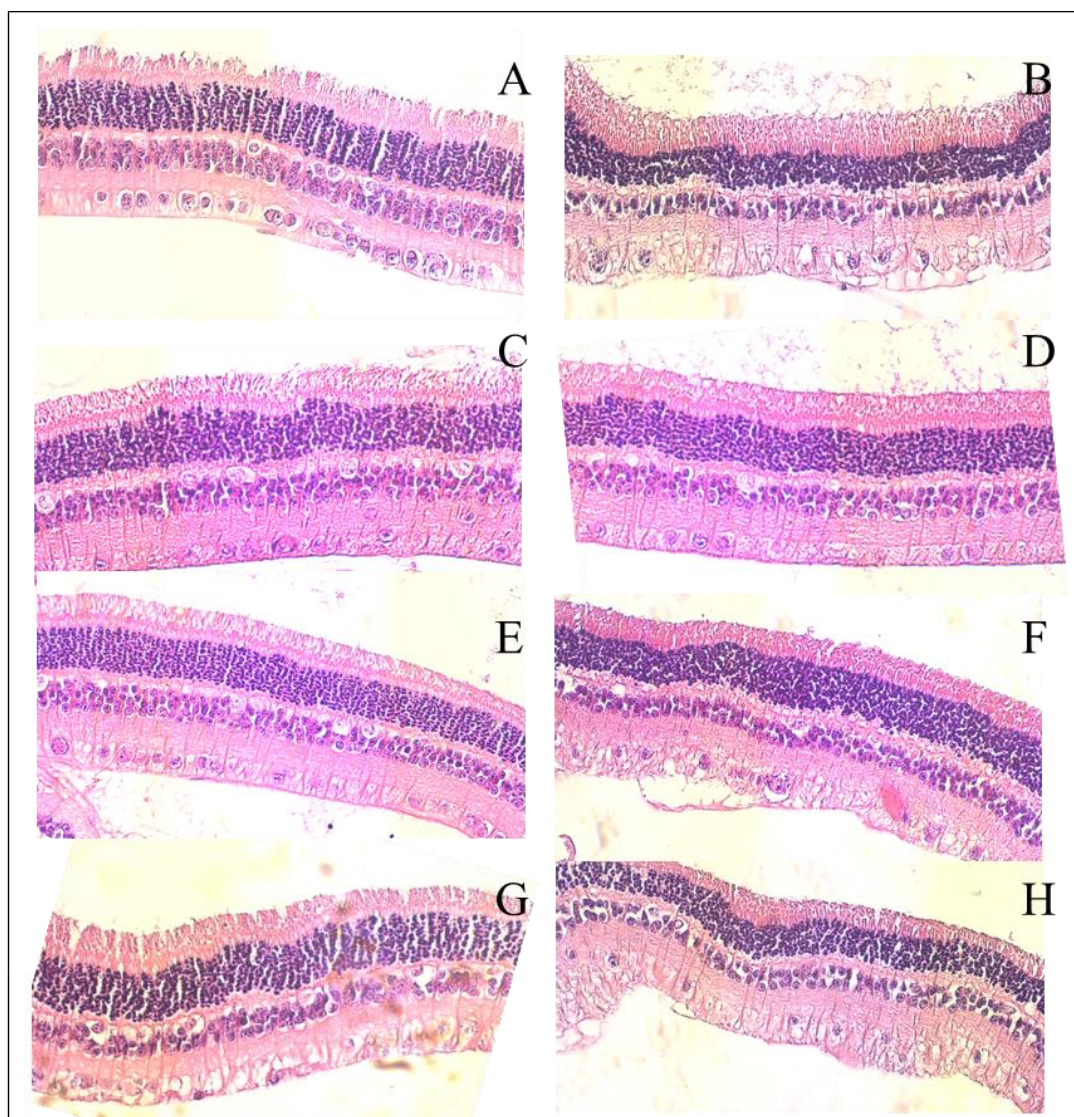


Figura 64 – Cortes histológicos (20x/0.40mm) da retina de coelhos albinos da raça New Zealand representativos para grupo sem intervenção (a) e grupos depois da administração intravítrea de implante intravítreo branco (b) e de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de sete (c), quatorze (d), vinte e um (e), vinte e oito (f), trinta e cinco (g) e quarenta e dois dias (h), para avaliação da toxicidade *in vivo* de implantes intravítreos contendo acetazolamida.



Adicionalmente, a integridade da retina foi verificada quantitativamente, medindo-se a espessura da retina, camada interna e camada externa e estimando-se o número de células ganglionares por corte, em região linear de 0,2 mm. Todos os resultados obtidos foram comparados com o grupo controle e entre si, estatisticamente. Os resultados encontrados para as espessuras estão demonstrados na **Tabela 49**.

Tabela 49 – Espessuras da retina e suas camadas interna e externa, por tomografia de coerência óptica, para grupo sem intervenção, administrados de implante intravítreo branco e administrados de implante intravítreo contendo acetazolamida depois de 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias e 42 dias

Grupo	Espessura (μm)		
	Camada interna	Camada externa	Retina
Sem intervenção	120,25 \pm 5,38	46,00 \pm 5,35	166,25 \pm 10,66
Salina estéril	118,50 \pm 5,07	45,25 \pm 7,09	163,75 \pm 12,12
Implante branco	117,75 \pm 3,86	43,50 \pm 3,70	161,25 \pm 7,54
Grupo I	118,00 \pm 3,74	44,75 \pm 2,22	162,75 \pm 5,91
Grupo II	119,50 \pm 5,45	43,75 \pm 5,12	163,25 \pm 10,53
Grupo III	117,75 \pm 4,92	44,50 \pm 2,65	162,25 \pm 7,37
Grupo IV	119,25 \pm 8,66	45,50 \pm 7,85	164,75 \pm 16,38
Grupo V	116,75 \pm 7,63	42,75 \pm 7,04	159,50 \pm 14,53
Grupo VI	117,00 \pm 9,42	44,25 \pm 6,18	161,25 \pm 15,52
Grupo VII	115,75 \pm 5,38	42,25 \pm 3,40	158,00 \pm 8,52
Grupo VIII	117,75 \pm 8,46	44,50 \pm 5,92	162,25 \pm 14,29

Mais uma vez, concluiu-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e os grupos controle, sem intervenção ou tratados com salina estéril e implante branco, quanto aos parâmetros de espessura da retina e suas camadas ($p\text{-valor} < 0,05$). Portanto, pode-se afirmar que a estrutura e morfologia da retina foi preservada durante os 42 dias de estudo, sem sinais de toxicidade retiniana. Ademais, os resultados estão em consonância com os encontrados no ensaio de tomografia de coerência óptica, uma vez que valores muito parecidos de espessura foram obtidos em ambos. Por isso, o estudo histológico evidenciou que a administração intravítrea de acetazolamida, por injeções de doses de 0,020 mmol/L ou por dispositivos intravítreos de 230 ug/mg, não provocou efeito tóxico notório, sendo seguro por, no mínimo, respectivamente, 7 e 42 dias.

4 CONCLUSÃO

Este capítulo visou determinar a segurança do uso de acetazolamida e implantes intravítreos contendo o fármaco, desenvolvidos para o manejo do glaucoma. Os resultados mostraram que, mesmo não produzidos sob condições assépticas, os dispositivos foram eficientemente esterilizados por irradiação gama. A ausência de toxicidade retiniana para doses de até 0,020 mmol/L do fármaco foi previamente confirmada por ensaios *in vitro*, de estudo de citotoxicidade e viabilidade celular em células ARPE-19, e por ensaios *in vivo*, como eletrorretinografia, tonometria de aplanção de Goldmann, tomografia de coerência óptica e histologia.

Por sua vez, os implantes intravítreos foram precisamente inseridos na cavidade vítrea dos coelhos albinos e foram não-irritantes durante inspeção ocular, oftalmoscopia binocular indireta e biomicroscopia de lâmpada de fenda. Tal qual o fármaco, a administração dos implantes intravítreos não evidenciou nenhum sinal de toxicidade retiniana durante os 42 dias de estudo, segundo ensaios *in vivo* por tonometria, tomografia de coerência óptica e avaliação histológica. Mais que isso, os implantes foram capazes de reduzir de forma estatisticamente significativa a pressão intraocular em coelhos normotensos, em níveis considerados clinicamente relevantes por consenso.

Todos os resultados comprovaram que os implantes intravítreos são seguros e potencialmente eficazes por, no mínimo, 42 dias, consolidando-se como promissora alternativa para tratamento do glaucoma e outras doenças oftálmicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de formas farmacêuticas eficazes e seguras para administração intraocular de acetazolamida mostra-se um desafio desde sua introdução na prática clínica para o manejo do glaucoma. No presente trabalho, foram produzidos, caracterizados e avaliados *in vitro* e *in vivo* implantes intravítreos biodegradáveis de ácido polilático-co-glicólico para o fármaco. O procedimento de preparo demonstrou-se simples, relativamente rápido e muito reprodutível.

No estudo, para garantir segurança e qualidade dos implantes produzidos, métodos cromatográficos foram desenvolvidos e validados para posterior uso no controle de qualidade, estudo de estabilidade e perfil de liberação *in vitro*. Um estudo de compatibilidade fármaco-excipientes, utilizando diferentes métodos de caracterização físico-química, foi conduzido e comprovou não haver incompatibilidade entre os componentes da formulação proposta. Os implantes intravítreos apresentaram dose declarada de 230 µg/mg, uniformidade de doses unitárias e estabilidade por 24 meses e foram capazes de liberar o fármaco, de forma sustentada, por pelo menos 42 dias, sem *burst* inicial.

Não se observou nenhum sinal de irritação ocular ou toxicidade retiniana *in vitro* ou *in vivo* para os dispositivos intravítreos nem para o fármaco, em doses de até 0,020 mmol/L, em ratos e coelhos albinos, uma vez que foi comprovada a preservação da morfologia e da estrutura da retina. Os implantes intravítreos foram eficazes na redução da pressão intraocular em coelhos normotensos de forma prolongada, por 42 dias, exibindo números clinicamente relevantes.

Desse modo, conclui-se que, embora estudos posteriores devam ser realizados para melhor compreensão das propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas do sistema de liberação, os implantes intravítreos produzidos podem ser considerados uma formulação promissora para administração intraocular do fármaco, oferecendo uma alternativa viável, eficaz, segura e muito mais conveniente para o tratamento do glaucoma, um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo.

PERSPECTIVAS

Estudos posteriores são necessários para confirmar eficácia e segurança do uso dos implantes intravítreos. A avaliação do estado funcional da retina em coelhos, por eletrorretinografia, é imprescindível para investigação de sua toxicidade retiniana. Similarmente, a eficácia dos dispositivos deve ser avaliada em modelo animal de glaucoma, para confirmar se o efeito hipotensor observado em coelhos normotensos é reproduzido em quadros de hipertensão ocular. Em seguida, no estágio final, espera-se que a segurança e eficácia dos implantes seja avaliada em estudos clínicos, com pacientes sadios e acometidos por glaucoma.

É importante ainda compreender o perfil de liberação *in vivo* dos implantes, em estudos de farmacocinética ocular, para que se verifique que as concentrações atingidas na cavidade intravítrea são seguras e terapêuticas, o que requer validação do método proposto para amostras oculares, como humor vítreo e humor aquoso. O desenvolvimento de métodos de amostragem não-terminais e menos invasivos para estes fluidos biológicos faz-se crucial para que estes estudos sejam conduzidos com menor variabilidade e menor sofrimento animal.

Finalmente, caso os implantes intravítreos na formulação proposta demonstrem resultados satisfatórios, estudos de *scaling up* devem ser conduzidos para assegurar qualidade e reprodutibilidade de sua produção em escala industrial.

REFERÊNCIAS

- ABDELMONEM, R.; ELHABAL, S. F.; ABDELMALAK, N. S.; EL-NABARAWI, M. A.; TEAIMA, M. H. Formulation and Characterization of Acetazolamide/Carvedilol Niosomal Gel for Glaucoma Treatment: In Vitro, and In Vivo Study. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 221, 2021.
- ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-2580, 2010.
- ADAMS, N. A. **Atlas of OCT: Retinal Anatomy in Health & Pathology**. 2021. Disponível em: <https://media.heidelbergengineering.com/downloads/ebooks/OCT-Atlas-Adams_EN.pdf>.
- ANVISA. **Anvisa é reeleita como membro do Comitê Gestor do ICH**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-e-reeleita-como-do-membro-do-comite-gestor-do-ich>>.
- ANVISA. **Lista de medicamentos referência, similares e genéricos**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/>>.
- ADHI, M.; DUKER, J. S. Optical coherence tomography – current and future applications. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 24, n. 3, p. 213-221, 2013.
- AGARWAL, R.; IEZHITSA, I.; AGARWAL, P.; NASIR, N. A. A.; RAZALI, N.; ALYAUTDIN, R.; ISMAIL, N. M. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1075-1091, 2016.
- AGGARWAL, D.; GARG, A.; KAUR, I. P. Development of a topical niosomal preparation of acetazolamide: preparation and evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 12, p. 1509-1517, 2004.
- AGGARWAL, D.; PAL, D.; MITRA, A. K.; KAUR, I. P. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1-2, p. 21-26, 2007.
- AGGARWAL, M.; BOONE, C. D.; KONDET, B.; MCKENNA, R. Structural annotation of human carbonic anhydrases. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 267-277, 2013.
- AGRAHARI, V.; MANDAL, A.; AGRAHARI, V.; TRINH, H. M.; JOSEPH, M.; RAY, A.; HADJI, H.; MITRA, R.; PAL, D.; MITRA, A. K. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 6, p. 735-754, 2016.
- ALBERTS, M. K.; CLARKE, C. R.; MACALLISTER, C. G.; HOMER, L. Pharmacokinetics of acetazolamide after intravenous and oral administration in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 8, p. 965-968, 2000.
- ALHAFALI, A. M. Applications of polymers in intraocular drug delivery systems. **Oman Journal of Ophthalmology**, v. 10, n. 1, p. 3-8, 2017.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVIH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 716 p.
- ALM, A.; BREGGREN, L.; HARTVIG, P.; ROOSDORP, M. Monitoring acetazolamide treatment. **Acta Ophthalmologica**, v. 60, n. 1, p. 24-34, 1982.
- ALMEIDA, F. P. P. DE; SALIBA, J. B.; RIBEIRO, J. A. S. In vivo release and retinal toxicity of cyclosporine-loaded intravitreal device. **Documenta Ophthalmologica**, v. 131, n. 3, p. 207-214, 2015.
- ALMASIEH, M.; WILSON, A. M.; MORQUETT, B.; CUEVA VARGAS, J. L.; DI POLO, A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, n. 2, p. 152-181, 2012.
- AL-MUJAINI, A.; WALI, U. K.; AZEEM, S. Optical Coherence Tomography: Clinical Applications in Medical Practice. **Oman Medical Journal**, v. 28, n. 2, p. 86-91, 2013.

ALVES, A. A. **Desenvolvimento de implantes biodegradáveis constituídos de copolímero dos ácidos láctico e glicólico e losartan**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

AOAC Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Rockville: AOAC International. 2016. 18 p.

ARIAS, J. L. Liposomes in drug delivery: a patent review (2007 - present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, n. 11, p. 1399-1414, 2013.

ARIOGLU-TUNCIL, S.; VOELKER, A. L.; TAYLOR, L. S.; MAUER, L. J. Amorphization of Thiamine Chloride Hydrochloride: Effects of Physical State and Polymer Type on the Chemical Stability of Thiamine in Solid Dispersions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5935, 2020.

ASPATWAR, A.; WINUM, J.; CARTA, F.; SUPURAN, C. T.; HAMMAREN, M.; PARIKKA, M.; PARKKILA, S. Carbonic Anhydrase Inhibitors as Novel Drugs against Mycobacterial β -Carbonic Anhydrases: An Update on In Vitro and In Vivo Studies. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2911-2925.

ASTM D3418-15. **Standard Test Method for Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry**, ASTM International, West Conshohocken, 2015.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 679 p.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 2011. 612 p.

BAKALASH, S.; KESSLER, A.; MIZRAHI, T.; NUSSENBLATT, T.; SCHWARTZ, M. Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. I **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3374-3381, 2003.

BARALDI, C.; GAMBERINI, M. C.; TINTI, A.; PALAZZOLI, F.; FERIOLI, V. Vibrational study of acetazolamide polymorphism, **Journal of Molecular Structure**, v. 918, n. 1-3, p. 88-96, 2009.

BARILE, F. A. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n. 2, p. 136-145, 2010.

BARTUMA, H.; PETRUS-REURER, S.; ARONSSON, M.; WESTMAN, S.; ANDRÉ, H.; KVANTA, A. In Vivo Imaging of Subretinal Bleb-Induced Outer Retinal Degeneration in the Rabbit. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, p. 2423-2430, 2015.

BAYNE, W. F.; ROGERS, G.; CRISOLOGO, N. Assay for acetazolamide in plasma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 3, p. 402-404, 1975.

BEG, S.; HASNAIN, M. S.; RAHMAN, M.; ALMALKI, W. **Handbook of Analytical Quality by Design**. 1st ed. Washington: Academic Press. 2021. 222 p.

BENCHORIN, G.; CALTON, M. A.; BEAULIEU, M. O.; VOLLRATH, D. Assessment of Murine Retinal Function by Electroretinography. **Bio-protocol**, v. 7, n. 7, p. 1-11, 2017.

BERSON, F. G.; EPSTEIN, D. L.; GRANT, W. M.; HUTCHINSON, B. T.; DOBBS, P. C. Acetazolamida Dosage forms in the Treatment of Glaucoma. **Archives of Ophthalmology**, v. 98, n. 6, p. 1051-1054, 1980.

BIELORY, L. Ocular Toxicity of systemic asthma and allergy treatments. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 6, p. 299-305. 2006.

BHARDWAJ, P.; TRIPATHI, P.; GUPTA, R.; PANDEY, S. Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. 4, p. 101581, 2020.

BHATTACHARJEE, S. **Principles of Nanomedicine**. 1st ed. New Delhi: Jenny Stanford Publishing. 2019. 62 p.

BISHT, R.; JAISWAL, J. K.; OLIVER, V. F.; EURTIVONG, C.; REYNISSON, J.; RUPENTHAL, I. D. Preparation and evaluation of PLGA nanoparticle-loaded biodegradable light-responsive injectable implants as a promising platform for intravitreal drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 40, p.142-156, 2017.

- BOIMVASER, S.; MARIANO, R. N.; TURINO, L. N.; VEGA, J. R. In vitro bulk/surface erosion pattern of PLGA implant in physiological conditions: a study based on auxiliary microsphere systems. **Polymer Bulletin**, v.73, n. 1, p.209-227, 2016.
- BOYES, W. K. et al. Toluene inhalation exposure for 13 weeks causes persistent changes in electroretinograms of Long–Evans rats. **Neurotoxicology**, v. 53, p. 257–270, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº. 53, de 4 de dezembro de 2015**. Diário Oficial da União, Brasília, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia nº. 4/2015, de 8 de dezembro de 2015**. Diário Oficial da União, Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº. 166, de 25 de julho de 2017**. Diário Oficial da União, Brasília, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº. 200, de 26 de dezembro de 2017**. Diário Oficial da União, Brasília, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº. 318, de 6 de novembro de 2019**. Diário Oficial da União, Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia nº. 28/2019, de 11 de novembro de 2019**. Diário Oficial da União, Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário Terapêutico Nacional 2022: Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (RENAME)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº. 200, de 29 de janeiro de 2018**. Diário Oficial da União, Brasília, 2018
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Conjunta nº. 11, de 2 de abril de 2018 – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Glaucoma**. 1ª ed. Secretaria de Atenção à Saúde e Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Brasília, 2018.
- BRECHUE, W. F.; MAREN, T. H. A comparison between the effect of topical and systemic carbonic anhydrase inhibitors on aqueous humor secretion. **Experimental Eye Research**, v. 57, n. 1, p. 67-78, 1993.
- BRETON, S. The cellular physiology of carbonic anhydrases. **JOP: Journal of The Pancreas**, v. 2, p. 159-164, 2001.
- BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 13ª ed. São Paulo: AMGH, 2018, 1760 p.
- BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231-247, 2012.
- CALLES, J. A.; MORA, M. J.; ONNAINTY, R.; TARTARA, L. I.; GRANERO, G. E.; LONGHI, M. R.; DIEBOLD, Y.; VALLÉS, E. M.; PALMA, S. D. Cross-linked hyaluronan films loaded with acetazolamide-cyclodextrin-triethanolamine complexes for glaucoma treatment. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 3, p. 205-220, 2018.
- CAO, Y.; SAMY, K. E.; BERNARDS, D. A.; DESAI, T. A. Recent advances in intraocular sustained-release drug delivery devices. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 8, p. 1694-1700, 2019.
- CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 7-8, p. 1462-1469, 2006.
- CASSON, R. J.; CHIDLOW, G.; WOOD, J. P.; CROWSTON, J. G.; GOLDBERG, I. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 40, n. 4, p. 341-349, 2012.
- CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82-97, 2014.

CHAMBERS, D. M.; WHITE, M. H.; KOSTENBAUDER, H. B. Efficient extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography-ultraviolet quantitation of acetazolamide in serum. **Journal of Chromatography**, v. 225, n. 1, p. 231-235, 1981.

CHAPRON, D. J.; WHITE, L. B. Determination of acetazolamide in biological fluids by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 7, p. 985-989, 1984.

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, p. 303–306, 2013.

CHEN, Y.; YANG, G.; CHEN, Z.; XU, Y.; ZHANG, J. Experimental study on improving ocular penetrability of acetazolamide ophthalmic solution. **Chinese Ophthalmic Research**, v. 22, n. 6, p. 614-616, 2004.

CHINTA, S. R.; PAIDIKONDALA, K.; KATARI, N.; DONGALA, T.; EDIGA, S. G.; MARISSETTI, V. M. Reverse-phase LC method development and validation for the quantification of acetazolamide and its specified and unspecified degradation products in hard gelatin capsule formulations. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 19, p. 775-784, 2022.

CHRISTOFORIDIS, J. B.; CHANG, S.; JIANG, A.; WANG, J.; CEBULLA, C. M. Intravitreal Devices for the Treatment of Vitreous Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

CHEMICALIZE. Banco de dados. Disponível em: <https://chemicalize.com>. 2022.

COOK, C.; FOSTER, P. Epidemiology of glaucoma: what's new? **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 47, n. 3, p. 223-226, 2012.

CORAL-GHANEM, C. evantamento de casos de Glaucoma em Joinville $\frac{3}{4}$ Santa Catarina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 52, p. 40-43, 1984.

COSSÉ, A.; KONIG, C.; LAMPRECHT, A.; WAGNER, K. G. . Hot Melt Extrusion for Sustained Protein Release: Matrix Erosion and In Vitro Release of PLGA-Based Implants. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 1, p. 15–26, 2017.

COSTA, B. L. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica de implantes poliméricos biodegradáveis contendo sirolimus**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

COX, J. A.; MOLLAN, S. P.; BANKART, J.; ROBINSON, R. Efficacy of antiglaucoma fixed combination therapy versus unfixed components in reducing intraocular pressure: a systematic review. **British Journal of Ophthalmology**, v. 92, n. 6, p. 729-734, 2008.

CURSIFIEN, C.; CORDEIRO, F.; CUNHA-VAZ, J.; WHEELER-SCHILLING, T.; SCHOLL, H. P. N. Unmet Needs in Ophthalmology: A European Vision Institute-Consensus Roadmap 2019–2025. **Ophthalmic Research**, v. 62, p. 123-133, 2019.

DAMICO, F. M.; SCOLARI, M. R.; IOSHIMOTO, G. L.; et al. Vitreous pharmacokinetics and electroretinographic findings after intravitreal injection of acyclovir in rabbits. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 67, n. 8, p. 931–7, 2012.

DAVE, V. S.; HAWARE, R. V.; SANGHAVE, N. A.; SAYLES, M.; POPIELARCZYK, M. Drug-Excipient Compatibility Studies in Formulation Development: Current Trends and Techniques. **Fisher Digital Publications**, v. 1, 2015.

DEL AMO, E. M.; RIMPELA, A. K.; HEIKKINEN, E.; HARI, O. K.; RAMSAY, E.; LAJUNEN, T.; SCHMITT, M.; PELKONEN, L.; BHATTACHARYA, M.; RICHARDSON, D.; SUBRIZI, A.; TURUNEN, T.; REINISALO, M.; ITKONEN, J.; TOROPAINEN, E.; CASTELEIJN, M.; KIDRON, H.; ANTOPOLSKY, M.; VELLONEN, K. S.; RUPONEN, M.; URTTI, A. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 57, p. 134-185, 2017.

DEVANSHU, S.; RAHUL, M.; ANNU, G.; KISHAN, S.; ANROOP, N. Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2010.

DE VRIES, V. A.; BASSIL, F. L.; RAMDAS, W. D. The effects of intravitreal injections on intraocular pressure and retinal nerve fiber layer: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 13248, 2020.

DIAMOX®: acetazolamida. União Química. Farm. Resp.: Florentino de Jesus Krencas – CRF-SP nº. 49136. Bula de remédio. Disponível em: <<http://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/diamox.pdf>>.

DING, S. L. S.; KUMAR, S.; MOK, P. Cellular Reparative Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells for Retinal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 1406-1425, 2017.

DONG, M. W.; HUYNH-BA, K.; AYERS, J. T. Development of Stability-Indicating Analytical Procedures by HPLC: An Overview and Best Practices. *LCGC North America*, v. 38, n. 8, p. 440-456, 2020.

DOOZANDEH, A.; YAZDANI, S. Neuroprotection in glaucoma. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, v. 11, n. 2, p. 209-220, 2016.

DRUGBANK. Banco de dados. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/>. 2019.

DUARTE, A. R.; ROY, C.; VEJA-GONZÁLEZ, A.; DUARTE, C. M.; SUBRA-PATERNAULT, P. Preparation of acetazolamide composite microparticles by supercritical anti-solvent techniques. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 332, n. 1-2, p. 132-139, 2007.

DUNN, K. C.; AOTAKI-KEEN, A. E.; PUTKEY, F. R.; HJELMELAND, L. M. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research*, v. 62, n. 2, p. 155-169, 1996.

DUQUE, L.; KORBER, M.; BODMEIER, R. Improving release completeness from PLGA-based implants for the acid-labile model protein ovalbumin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 538, n. 1-2, p. 139-146, 2018.

DUSINSKA, M.; RUNDEN-PRAN, E.; SCHNEKENBURGER, J.; KANNO, J. Chapter 3 - Toxicity Tests: In vitro and In Vivo. In: FADEEL, B.; PIETROIUSTI, A.; SHVEDOVA, A. A. *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*. 2nd ed. Waltham: Academic Press. 2017, p. 51-82.

EDELHAUSER, H. F.; GREEN, K. Workshop on in Vitro Versus in Vivo Models for Ocular Toxicity Testing. In: GREEN, K.; EDELHAUSER, H. F.; HACKETT, R. B.; HULL, D. S.; POTTER, D. E.; TRIPATHI, R. C. *Advances in Ocular Toxicology*. Boston: Springer, 1997, 276 p.

EL-GAZAYERLY, O.; HIKAL, A. H. Preparation and evaluation of acetazolamide liposomes as an ocular delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 158, p. 121-127, 1997.

ELJARRAT-BINSTOCK, E; PE'ER, J., DOMB, A. J.. New techniques for drug delivery to the posterior eye segment. *Pharmaceutical Research*, v. 27, n. 4, p. 530-543, 2010.

EL-MENSHAWE, S. F. A novel approach to topical acetazolamide/PEG 400 ocular niosomes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 22, n. 4, p. 295-299, 2012.

EPSTEIN, D. L.; GRANT, W. M. Carbonic Anhydrase Inhibitor Side Effects. *Archives of Ophthalmology*, v. 95, n. 8, p. 1378-1382, 1977.

EUROPEAN GLAUCOMA SOCIETY Terminology and Guidelines for Glaucoma. 4 ed. - Chapter 3: Treatment principles and options. *British Journal of Ophthalmology*, v. 101, p.130-195, 2017.

EUROPEAN Pharmacopeia. 10th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2019.

EVANS, L. S.; PEACHEY, N. S.; MARCHESE, A. L. Comparison of three methods of estimating the parameters of the Naka-Rushton equation. *Documenta Ophthalmologica*, v. 84, n. 1, p. 19-30, 1993.

FAGERLUND, C.; HARTVIG, P.; LINDSTROM, B. Extractive alkylation of sulphonamide diuretics and their determination by electron-capture gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 168, n. 1, p. 107-116, 1979.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. 903 p.

FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C. LANÇAS, F. M. Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. *Journal of Chromatography B*, v. 847, p. 217-223, 2007.

FERRARA, M.; LUGANO, G.; SANDINHA, M. T.; KEARNS, V. R.; GERAGHTY, B.; STEEL, D. H. W. Biomechanical properties of retina and choroid: a comprehensive review of techniques and translational relevance. **Eye**, v. 35, p. 1818–1832, 2021.

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

FIALHO, S. L. **Desenvolvimento de implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular de corticóides**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos).

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

FLACH, A. J.; PETERSON, J. S. Topically applied acetazolamide and intraocular pressure. **ARVO**, p. 196, 1981.

FLACH, A. J.; PETERSON, J. S.; SELIGMANN, K. A. Local Ocular Hypotensive Effect of Topically Applied Acetazolamide. **American Journal of Ophthalmology**, v. 98, n. 1, p. 66-72, 1984.

FOSS, R. H. Local application of Diamox: An experimental study of its effect on the intraocular pressure. **American Journal of Ophthalmology**, v. 39, p. 336, 1955.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1-2, p. 34-52, 2011.

FRIEDENWALD, J. S. Current studies on acetazolamide (Diamox) and aqueous humor flow. **American Journal of Ophthalmology**, v. 40, n. 5, p. 139-147, 1955.

FRIEDLAND, B. R.; MALLONEE, J.; ANDERSON, D. R. Short-term dose response characteristics of acetazolamide in man. **Archives of Ophthalmology**, v. 95, n. 10, p. 1809-1812, 1977.

FRIEDMAN, Z.; ALLEN, R. C.; RAPH, S. M. Topical acetazolamide and methazolamide delivered by contact lenses. **Archives of Ophthalmology**, v. 103, n. 7, p. 963-969, 1985.

FRIEDMAN, D. S.; QUIGLEY, H. A.; GELB, L.; TAN, J.; MARGOLIS, J.; SHAH, S. N.; KIM, E. E.; ZIMMERMAN, T.; HAHN, S. R. Using pharmacy claims data to study adherence to glaucoma medications: methodology and findings of the Glaucoma Adherence and Persistency Study (GAPS). **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 11, p. 5052-5057, 2007.

FUCHSCHOFFER, R.; TAMM, E. R. The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 1, p. 279-290, 2012.

GAL, J.; ELLIS, P. P.; RENDI, M. Determination of acetazolamide in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Current Eye Research**, v. 1, n. 6, p. 361-365, 1981.

GAUDANA, R.; ANANTHULA, H. K.; PARENKY, A.; MITRA, A. K. Ocular drug delivery. **AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 349-360.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.

GILLIUM, C.; FRICIU, M.; ABATZOGLOU, N.; LECLAIR, G. Stability of Extemporaneously Prepared Acetazolamide Oral Suspensions at Two Temperatures. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 8, p. 723-729, 2020.

GONÇALVES, M. R.; GUEDES, M. M. R.; CHAVES, M. A. P. D.; PEREIRA, C. C. L.; OTTON, R. Analysis of risk factors and epidemiology of blindness prevention campaign by glaucoma in João Pessoa, Paraíba. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 72, n. 6, p. 396-399, 2013.

GOMEZ DE BALUGERA, Z.; GOICOLEA, M. A.; BARRÍO, R. J. Joint determination of todralazine and acetazolamide in human serum by differential pulse polarography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 7, p. 883-887, 1994.

GRANERO, G. E.; LONGHI, M. R.; BECKER, C.; JUNGINGER, H. E.; KOPP, S.; MIDHA, K. K.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J. B.; BARENDT, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Acetazolamide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 9, p. 3691-3699, 2008.

GRANERO, G. E.; LONGHI, M. R. Promising complexes of acetazolamide for topical ocular administration. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 8, p. 943-953, 2010.

GRANIZO, P. E. R. **Avaliação da fotoestabilidade de acetazolamida e loratadina e da capacidade de fotoproteção de seus complexos com ciclodextrinas**. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2012. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos).

GREEN, H.; BOCHER, C. A.; CALNAN, A. F.; LEOPOLD, I. H. Carbonic anhydrase and the maintenance of intraocular tension in the rabbit eye. **Archives of Ophthalmology**, v. 53, p. 463, 1955.

GUINEDI, A. S.; MORTADA, N. D.; MANSOUR, S.; HATHOUT, R. M. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 206, n.1-2, p. 71-82, 2005.

GUPTA, V. D.; PARASRAMPURIA, J. Quantitation of Acetazolamide in Pharmaceutical Dosage Forms Using High-Performance Liquid Chromatography. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 13, n. 1, p. 147-157, 1987.

GUPTA, K. R.; POUNIKAR, A.; UMEKAR, M. J. Drug Excipient Compatibility Testing Protocols and Characterization: A Review. **Asian Journal of Chemical Sciences**, 2019.

HALASZ, K.; KELLY, S. J.; IQBAL, M. T.; PATHAK, Y.; SUTARYIA, V. Micro/Nanoparticle Delivery Systems for Ocular Diseases. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 17, n. 4, 2019.

HALL, J. E. **Fundamentos de Fisiologia Médica**. 13ª ed. Atlanta: Elsevier, 2017, 568 p.

HAMPSON, A. J.; BABALONIS, S.; LOFWALL, M. R.; NUZZO, P. A.; KRIETER, P.; WALSH, S. L. A Pharmacokinetic Study Examining Acetazolamide as a Novel Adherence Marker for Clinical Trials. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 324-332, 2016.

HARE, W.; WOLDEMUSSIE, E.; LAI, R.; TON, H.; RUIZ, G.; FELDMANN, B.; WIJONO, M.; CHUN, T.; WHEELER, L. Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, p. 284-289, 2001.

HARKE, W.; SCHIRREN, C.; WEHRMANN, R. Experimentelle Untersuchungen zur Bestimmung der Acetazolamid-Ausscheidung im menschlichen Harn mittels eines Diazotier-und Kupplungsverfahrens. **Klinische Wochenschrift**, v. 37, n. 19, p. 1040-1044, 1959.

HARRIS, A.; AREND, O.; KAGEMANN, L.; GARRETT, M.; CHUNG, H. S.; MARTIN, B. Dorzolamide, visual function and ocular hemodynamics in normal-tension glaucoma. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 189-197, 1999.

HARTLEY, R.; LUCOCK, M. ; BECKER, M.; SMITH, I. J.; FORSYTHE, W. I. Solid-phase extraction of acetazolamide from biological fluids and subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 377, p. 295-305, 1986.

HATHOUT, R. M.; MANSOUR, S.; MORTADA, N. D.; GUINEDI, A. S. Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 1, p. 1, 2007.

HAZNEDAR, S.; DORTUNÇ, B. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p.131-140, 2004.

HEINIG, K.; BERTRAN, E.; POTTER, J.; FRAIER, D. Ocular bioanalysis: challenges and advancements in recent years for these rare matrices. **Bioanalysis**, v. 9, n. 24, p. 1997-2014, 2017.

HECKENLIVELY, J. R.; TANJI, T.; LOGANI, S. Retrospective study of hyperabnormal (supranormal) electroretinographic responses in 104 patients. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 92, p. 217-231, 1994.

- HERRAÉZ-HERNÁNDEZ, R.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; SEVILLANO-CABEZA, A. Determination of acetazolamide in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the presence of xanthenes. **Journal of Chromatography**, v. 582, n. 1-2, p. 181-187, 1992.
- HIGGINBOTHAM, E. J. Considerations in glaucoma therapy: fixed combinations versus their component medications. **Clinical Ophthalmology**, v. 4, p. 1-9, 2010.
- HOSSIE, R. D.; MOUSSEAU, N.; SVED, S.; BRIEN, R. Quantitation of acetazolamide in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 3, p. 348-349, 1980.
- HOFF, S. F.; CHEN, Y. Chapter 37 - Product Registration and Drug Approval Process in the United States. In: QIU, Y.; ZHANG, G. G. Z.; PORTER, W. R.; CHEN, Y.; LIU, L. **Developing Solid Oral Dosage Forms**. Cambridge: Academic Press. 2009. p. 861-883.
- HUANG, W. et al. Application of electroretinography (ERG) in early drug development for assessing retinal toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 525–533, 2015.
- HWANG, P. T. R.; LANG, J. R.; WOOD, G. C.; MEYER, M. C. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Acetazolamide in Human Plasma. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 8, n. 8, p. 1465-1473, 1985.
- ICHIKAWA, N.; NAORA, K.; HIRANO, H.; IWAMOTO, K. Quantitation of acetazolamide in rat plasma, brain tissue and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 8, p. 1415-1421, 1998.
- INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2(R1)**. Geneva, 1996.
- JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.
- JEEVANANDAM, J.; BARHOUM, A.; CHAN, Y. S.; DUFRESNE, A.; DANQUAH, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050-1074, 2018.
- JOHNSON, B. K.; COLVIN, C. J.; NEEDLE, D. B.; MBA MEDIE, F.; CHAMPION, P. A.; ABRAMOVICH, R. B. The Carbonic Anhydrase Inhibitor Ethoxzolamide Inhibits the Mycobacterium tuberculosis PhoPR Regulon and Esx-1 Secretion and Attenuates Virulence. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4436-4445, 2015.
- JONAS, J. B.; AUNG, T.; BOURNE, R. R.; BRON, A. M.; RITCH, R.; PANDA-JONAS, S. Glaucoma. **The Lancet**, v. 390, n. 10108, p. 2183-2193, 2017.
- JONES, T. M. Chapter 1:Preformulation Studies. In: TOVEY, G. D. **Pharmaceutical Formulation: The Science and Technology of Dosage Forms**. Londres: Royal Society of Chemistry. 2018. p. 1-41.
- JOYCE, P. W.; MILLS, K. B.; RICHARDSON, T.; MAWER, G. E. Equivalence of conventional and sustained release oral dosage formulations of acetazolamide in primary open angle glaucoma. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 597-606, 1989.
- JUG, M. Chapter Two - Cyclodextrin-based drug delivery systems. In: PIPPA, N.; DEMETZOS, C. **Nanomaterials for clinical applications**. Amsterdã: Elsevier. 2020. p. 29-69.
- KALOUDA, P.; KESKINI, C.; ANASTASOPOULOS, E.; TOPOUZIS, F. Achievements and Limits of Current Medical Therapy of Glaucoma. **Developments in Ophthalmology**, v. 59, p. 1-14, 2017.
- KAMILOGLU, S.; SARI, G.; OZDAZL, T.; CAPANOGLU, E. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, p. 332-349, 2020.
- KARAKAS, D.; ARI, F.; ULUKAYA, E. The MTT Viability Assay Yields Strikingly False-Positive Viabilities although the Cells are Killed by Some Plant Extracts. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p. 919-925, 2017.
- KASHI, J.; SADAT, T.; ESKANDARION, S.; ESFANDYARI-MANESH, M.; MAHMOUD, S.; MARASHI, A.; SAMADI, N.; FATEMI, S. M.; ATYABI, F.; ESHRAGHI, S.; DINARVAND, R. Improved drug loading

and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 221-234, 2012.

KASS, M. A.; HEUER, D. K.; HIGGINBOTHAM, E. J.; JOHNSON, C. A.; KELTNER, J. L.; MILLER, J. P.; PARRISH, R. K. WILSON, M. R.; GORDON, M. O. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. **Archives of Ophthalmology**, v. 120, n. 6, p. 701-713, 2002.

KAUR, I. P.; SINGH, M.; KANWAR, M. Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, n. 2, p. 119-127, 2000.

KAUR, I. P.; KAPIL, M.; SMITHA, R.; AGGARWAL, D. Development of Topically Effective Formulations of Acetazolamide Using HP- β -CD-Polymer Co-Complexes. **Current Drug Delivery**, v. 1, n. 1, p. 65-72, 2004.

KELS, B. D.; GRZYBOWSKI, A.; GRANT-KELS, J. M. Human Ocular Anatomy. **Clinics in dermatology**, v. 33, n. 2, p. 140-146, 2015.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica**, v. 215, n. 3, p. 143-155, 2001.

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.

KINGMAN, S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. **Bull World Health Organization**, v. 82, n. 11, p. 887-888, 2004.

KNIEP, E. M.; ROEHLECKE, C.; OZKUCUR, N.; STEINBERG, A.; REBER, F.; KNELS, L.; FUNK, R. H. Inhibition of apoptosis and reduction of intracellular pH decrease in retinal neural cell cultures by a blocker of carbonic anhydrase. **Investigative Ophthalmology and Vision Science**, v. 47, n. 3, p. 1185-1192, 2006.

KO, M. L.; HU, D. N.; RITCH, R.; SHARMA, S. C. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. **Investigative Ophthalmology and Vision Science**, v. 41, n. 10, p. 2967-2971, 2000.

KOHANE, D. S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. **Biotechnology & Bioengineering**, 2006.

KOTECHA, A.; LIM, K. S.; HIRN, C.; GARWAY-HEATH, D. 10 - Tonometry and Intraocular Pressure Fluctuation. **Glaucoma (Second Edition)**, v. 1, p. 98-108, 2015.

KUNKA, R. L.; MATTOCKS, A. M. Nonlinear model for acetazolamide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 3, p. 342-346, 1979.

KUNO, N., FUJII, S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders. **Drugs Aging**, v. 27, n. 2, p. 117-134, 2010.

KIM, W.; CHOI, M.; KIM, S. The normative retinal and choroidal thicknesses of the rabbit as revealed by spectral domain optical coherence tomography. **Journal of the Korean Ophthalmological Society**, v. 62, n. 3, p. 354-361, 2021.

KOINZER, S.; SAEGER, M.; HESSE, C.; PORTZ, L.; KLEEMANN, S.; SCHLOTT, K.; BRINKMANN, R.; ROIDER, J. Correlation with OCT and histology of photocoagulation lesions in patients and rabbits. **Acta Ophthalmologica**, v. 91, n. 8, p. e603-e611, 2013.

LADAS, I. D.; BALTATZIS, S.; PANAGIOTIDIS, D.; ZAFIRAKIS, P.; KOKOLAKIS, S. N.; THEODOSSIADIS, G. P. Topical 2.0% dorzolamide vs oral acetazolamide for prevention of intraocular pressure rise after neodymium:YAG laser posterior capsulotomy. **Archives of Ophthalmology**, v. 115, n. 10, p.1241-1244, 1997.

LAI, S.; WEI, Y.; WU, Q.; ZHOU, K.; LIU, T.; ZHANG, Y.; JIANG, N.; XIAO, W.; CHEN, J.; LIU, Q.; YU, Y. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, p. 64, 2019.

LANYI, F. J.; WENZKE, N.; KASCHTA, J.; SCHUBERT, D. W. On the Determination of the Enthalpy of Fusion of α -Crystalline Isotactic Polypropylene Using Differential Scanning Calorimetry, X-Ray Diffraction,

and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy: An Old Story Revisited. **Advanced Engineering Materials**, 2019.

LATOSINSKA, J. N.; LATOSINSKA, M. **Towards Understanding Drugs on the Molecular Level to Design Drugs of Desired Profiles**. In: KAPETANOVIC, I. M. Drug Discovery and Development - Present and Future. Londres: InTech. 1^a ed. 2011, p. 231-274.

LAUX, B. E.; RAICHLER, M. E. The effect of acetazolamide on cerebral blood flow and oxygen utilization in the rhesus monkey. **Journal of Clinical Investigation**, v. 62, n. 3, p. 585-592, 1978.

LAVAUD, A.; SOUKUP, P.; MARTIN, L.; HARTNACK, S.; POT, S. Spectral domain optical coherence tomography in awake rabbits allows identification of the visual streak, a comparison with histology. **Translational Vision Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 13-27, 2020.

LAMBIASE, A.; ABDOLRAHIMZADEH, S.; RECUPERA, S. M. An update on intravitreal implants in use for eye disorders. **Drug Today**, v. 50, n. 3, p. 239-249, 2014.

LAWWILL, T.; WACKER, W.; MACDONALD, R. The role of electroretinography in evaluating posterior uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 74, n. 6, p. 1086-1093, 1972.

LEE, S. S.; HUGHES, P.; ROSS, A. D.; ROBINSON, M. R.. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 2043-2053, 2010.

LEHMANN, B.; LINNÉR, E.; WISTRAND, P. J. The Pharmacokinetics of Acetazolamide in Relation to its Use in the Treatment of Glaucoma and to its Effects as an Inhibitor of Carbonic Anhydrases. **Advances in the Biosciences**, p. 197-217, 1970.

LENTZ, N. B.; HOUK, R. S. Negative Ion Mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry Study of Ammonium Counter Ion Clusters. **American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, p. 285-293, 2007.

LI, X.; LI, N.; WANG, C.; DENG, S.; SUN, X.; ZHANG, W.; GAO, W.; ZHAO, D.; LU, Y.; CHEN, X. Development and validation of a simple and reliable LC-MS/MS method for the determination of acetazolamide, an effective carbonic anhydrase inhibitor, in plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Drug Research**, v. 64, n. 9, p. 499-504, 2014.

LI, T.; LINDSLEY, K.; ROUSE, B.; HONG, H.; SHI, Q.; FRIEDMAN, D. S.; WORMALD, R.; DICKERSIN, K. Comparative Effectiveness of First-Line Medications for Primary Open-Angle Glaucoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis. **Ophthalmology**, v. 123, n. 1, p. 129-140, 2016.

LIU, P.; CHEN, G.; ZHANG, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1372, 2022.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDOTTIR, H.; THORISDOTTIR, S.; STEFANSSON, E.; SIGTHORSSON, T. Topically effective ocular hypotensive acetazolamide and ethoxzolamide formulation in rabbits. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, v. 46, p. 503-504, 1994.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDOTTIR, H.; THORISDOTTIR, S.; STEFANSSON, E.; SIGURDARDOTTIR, A.; GUDMUNDSSON, O.; SIGTHORSSON, T. 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in topical carbonic anhydrase inhibitor formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 175-180, 1994b.

LOFTSSON, T.; STEFANSSON, E.; KRISTINSSON, J. K.; FRIDRIKSDOTTIR, H.; SVERRISSON, T.; GUDMUNDSDOTTIR, S.; THORISDOTTIR, S. Topically Effective Acetazolamide Eye-drop Solution in Man. **Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 6, p. 277-279, 1996.

LOFTSSON, T.; JAHRO, P.; MASSON, M.; JARVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 335-351, 2005.

LOMELINO, C. L.; MCKENNA, R. Carbonic anhydrase inhibitors: a review on the progress of patent literature (2011-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 8, p. 947-956, 2016.

LOVEJOY, D. A.; HEWETT-EMMETT, D.; PORTER, C. A.; CEPOI, D.; SHEFFIELD, A.; VALE, W. W.; TASHIAN, R. E. Evolutionarily conserved, "acatalytic" carbonic anhydrase-related protein XI contains a sequence motif present in the neuropeptide sauvagine: the human CA-RP XI gene (CA11) is embedded between the secretor gene cluster and the DBP gene at 19q13.3. **Genomics**, v. 54, n. 3, p. 484-493, 1998.

- LUSTHAUS, J.; GOLDBERG, I. Current management of glaucoma. **The Medical Journal of Australia**, v. 210, n. 4, p. 180-187, 2019.
- MAKADIA, H. L.; SIEGEL, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.
- MALHOTRA, A.; MINJA, F. J.; CRUM, A.; BURROWES, D. Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. **Seminars in Ultrasound, CT and MR**, v. 32, n. 1, p. 2-13, 2011.
- MANDANDA, S.; SAHOO, P. K. Topical delivery of acetazolamide by encapsulating in mucoadhesive nanoparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 550-557, 2017.
- MANDRACCHIA, D.; TRIPODO, G. Chapter 1:Micro and Nano-drug Delivery Systems. In: BARI, E.; PERTEGHELLA, S.; TORRE, M. L. **Silk-based Drug Delivery Systems**. 2020. p. 1-24.
- MANNA, S.; AUGSBURGER, J. J.; CORREA, Z. M. Noninvasive Electroretinography Assessment of Intravitreal Sustained-Release Methotrexate Microimplants in Rabbit Eyes. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 9, p. 583-594, 2016.
- MANNERMAA, E.; REINISALO, M.; RANTA, V.; VELLONEN, K.; KOKKI, H.; SAARIKKO, A.; KAARNIRANTA, K.; URTTI, A. Filter-cultured ARPE-19 cells as outer blood-retinal barrier model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 289-296, 2010.
- MAREN, T. H.; ASH, V. I.; BAILEY, E. M. Carbonic anhydrase inhibition. II. A method for determination of carbonic anhydrase inhibitors, particularly of diamox. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v. 95, n. 5, p. 244-255, 1954.
- MAREN, T. H. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 130, n. 1, p. 26-29, 1960.
- MAREN, T. H. Use of inhibitors in physiological studies of carbonic anhydrase. **The American Journal of Physiology**, v. 232, n. 4, p. 291-297, 1977.
- MARTÍNEZ, A.; GONZÁLEZ, F.; CAPEANS, C.; PÉREZ, R.; SÁNCHEZ-SALORIO, M. Dorzolamide effect on ocular blood flow. **Investigative Ophthalmology and Vision Science**, v. 40, n. 6, p.127-1275, 1999.
- MASEREEL, B.; ROLIN, S.; ABBATE, F.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: anticonvulsant sulfonamides incorporating valproyl and other lipophilic moieties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 312-320, 2002.
- MATURAVONGSADIT, P.; PARAVYANA, G.; KOVAROVAC, M.; GARCIA, V.; BENHABBOUR, R. A new engineering process of biodegradable polymeric solid implants for ultra-long-acting drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**: X, v. 3, e100068, 2021.
- MAUS, T. L.; LARSSON, L. I.; MCLAREN, J. W.; BRUBAKER, R. F. Comparison of dorzolamide and acetazolamide as suppressors of aqueous humor flow in humans. **Archives of Ophthalmology**, v. 115, n. 1, p. 45-49, 1997.
- MAZYED, E. A.; ABDELAZIZ, A. E. Fabrication of Transgelosomes for Enhancing the Ocular Delivery of Acetazolamide: Statistical Optimization, In Vitro Characterization, and In Vivo Study. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 465-497, 2020.
- MCCUSKER, L. B.; VON-DREELE, R. B.; COX, D. E.; LOUER, D.; SCARDI, P. Rietveld refinement guidelines. **Journal of Applied Crystallography**, v.32, p.36-50, 1999.
- MEDSCAPE. Banco de dados. Disponível em: <https://www.medscape.com/>. 2019.
- MCKINNON, S. J.; GOLDBERG, L. D.; PEEPLES, P.; WALT, J. G.; BRAMLEY, T. J. Current management of glaucoma and the need for complete therapy. **The American Journal of Managed Care**, v. 14, p. 20-27, 2008.
- MILLICHAP, J. G.; WOODBURY, D. M.; GOODMAN, L. S. Mechanism of the anticonvulsant action of acetazoleamide, a carbonic anhydrase inhibitor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 115, n. 3, p. 251-258, 1955.

- MINCIONNE, F.; SCOZZAFAVA, A. SUPURAN, C. T. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 7, p. 649-654, 2008.
- MISHRA, G. P.; BAGUI, M.; TAMBOLI, V.; MITRA, A. K. Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, n. 863734, 2011.
- MISHRA, V.; JAIN, N. K. Acetazolamide encapsulated dendritic nano-architectures for effective glaucoma management in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 380-390, 2014.
- MOFFAT, A. C.; OSSELTON, D. M.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4 ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2011. 2736 p.
- MORSI, N. M.; MOHAMED, M. I.; REFAEI, H.; EL SOROGY, H. M. Nanoemulsion as a novel ophthalmic delivery system for acetazolamide. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 227-236, 2014.
- MOURA, S. A. L.; LIMA, L. D. C.; ANDRADE, S. P.; CUNHA JR, A. S.; ORÉFICE, R. L.; AYRES, E.; SILVA, G. R.. Local Drug Delivery System: Inhibition of Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model by Dexamethasone-Loaded Polyurethane Implants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2886-2895, 2011.
- MUNEMASA, Y.; KITAOKA, Y. Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, p. 1-13; 2013.
- MURAOKA, Y.; IKEDA, H. O.; NAKANO, N.; HANGAI, M.; TODA, Y.; OKAMOTO-FURUTA, K.; KOHDA, H.; KONDO, M.; TERASAKI, H.; KAKIZUKA, A.; YOSHIMURA, N. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. **PLoS One**, v. 7, e36135, 2012.
- NAGASUBRAMANIAN, S.; BLOOM, J.; POINOOSAWMY, D.; HITCHINGS, R. A. The Effects of a Topical Acetazolamide Preparation on Intraocular Pressure in Patients with Ocular Hypertension. **Glaucoma Update III**, p. 255-259, 1987.
- NARAPUSETTI, A.; BETHANABHATLA, S. S.; SOCKALINGAM, A.; PILLI, N. R. LC-MS/MS assay for Acetazolamide, A Carbonic Anhydrase Inhibitor in Human Plasma and its Clinical Application. **Journal of Young Pharmacists**, v. 7, n. 4, p. 438-445, 2015.
- NATU, M.; SOUSA, H. C.; GIL, M. H. Electrospun Drug-Eluting Fibers for Biomedical Applications. In: ZILBERMAN, M. (ed). **Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration**. Berlin: Springer, 2011, p. 57-85.
- NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana**. 5^a ed. Atlanta: Elsevier, 2014. 640 p.
- NOCENTINI, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 10, p. 729-740, 2018.
- OBIEDALLAH, M. M.; ABDEL-MAGEED, A. M.; ELFAHAM, T. H. Ocular administration of acetazolamide microsponges in situ gel formulations. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 7, p. 909-920, 2018.
- ODOM, J. V.; BACH, M.; BRIGELL, M. ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update). **Documenta Ophthalmologica**, v. 133, n. 1, 2016.
- OKAHARA, A.; TANIOKA, H.; TAKADA, K.; KAWAZU, K. Ocular Toxicity of Benzalkonium Chloride Homologs Compared with Their Mixtures. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 4, p. 343-349, 2013.
- OKAZAWA, H.; YAMAUCHI, H.; SUGIMOTO, K.; TOYODA, H.; KISHIBE, Y.; TAKAHASHI, M. Effects of acetazolamide on cerebral blood flow, blood volume, and oxygen metabolism: a positron emission tomography study with healthy volunteers. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 12, p. 1472-1479, 2001.
- OLIVEIRA, R. C.; MESSIAS, A.; SIQUEIRA, R. C.. Vitreous Pharmacokinetics and Retinal Safety of Intravitreal Preserved Versus Non-preserved Triamcinolone Acetonide in Rabbit Eyes. **Current Eye Research**, v. 37, n. 1, p. 55-61, 2012.
- OPATHA, S. A. T.; TITAPIWATANAKUN, V.; CHUTOPRAPAT, R. Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 855, 2020.

- ORSKI, M.; GAWECKI, M. Current Management Options in Irvine–Gass Syndrome: A Systemized Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 19, p. 4375, 2021.
- PAIVA, M. R. B. **Avaliação da segurança e atividade anti-inflamatória de implante intravítreo contendo sirolimus em modelo de uveíte autoimune experimental**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).
- PALMA, S. D.; TARTARA, L. I.; QUINTEROS, D.; ALLEMANDI, D. A.; LONGHI, M. R.; GRANERO, G. E. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP-ss-CD and TEA for topical ocular administration. **Journal of Control Release**, v. 138, n. 1, p. 24-31, 2009.
- PANDEY, V. P.; KANNAN, K.; MANAVALAN, R.; DESAI, N. In vitro study on sustained release capsule formulation of acetazolamide. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 142, n. 8, p. 357-360, 2003.
- PANOS, G. D. Advances in intravitreal therapy and implants: where are we now? **Therapeutic Delivery**, v. 11, n. 2, 2020.
- PARASRAMPURIA, J.; GUPTA, V. D. Preformulation Studies of Acetazolamide: Effect of pH, Two Buffer Species, Ionic Strength, and Temperature on Its Stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 10, p. 855-857, 1989.
- PATEL, A.; CHOLKAR, K.; AGRAHARI, V.; MITRA, A. K. Ocular drug delivery systems: An overview. **World Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 47-64, 2013.
- POLONINI, H.; SILVA, S. L.; AGLIO, N. C. B.; ABREU, J.; BRANDÃO, M. A. F.; FERREIRA, A. O. Stability of Acetazolamide, Baclofen, Dipyrindamole, Mebevarine Hydrochloride, Propylthiouracil, Quinidine Sulfate, and Topiramate Oral Suspensions in Syrspond SF PH4. *Dossier Syrspond*, n. 26, p. 255-262, 2017.
- PORTELLOS, M.; BUCKLEY, E. G.; FREEDMAN, S. F. Topical versus oral carbonic anhydrase inhibitor therapy for pediatric glaucoma. **Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, v. 2, n. 1, p. 43-47, 1998.
- PENNESI, M.; WELEBER, R. High-Resolution Optical Coherence Tomography Shows New Aspects of Bietti Crystalline Retinopathy. **Retina**, v. 30, n. 3, p. 531-523, 2010.
- PETERS, T. et al. Evaluation of polyesteramide (PEA) and polyester (PLGA) microspheres as intravitreal drug delivery systems in albino rats. **Biomaterials**, v. 124, p. 157–168, 2017.
- PRESLAND, A. Applied ocular physiology and anatomy. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 8, n. 9, p. 379-382, 2007.
- PUBCHEM. Banco de dados. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. 2019.
- QUIGLEY, H. A. Selective citation of evidence regarding photoreceptor loss in glaucoma. **Archives of Ophthalmology**, v. 119, n. 9, p. 1390-1391, 2001.
- QUIGLEY, H. A.; BROMAN, A. T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. **British Journal of Ophthalmology**, v. 90, n. 3, p. 262-267, 2006.
- QUIGLEY, H. A. Glaucoma. **The Lancet**, v. 377, n. 9774, p. 1367-1377, 2011.
- QUINTEROS, D. A.; FERREIRA, L. M.; SCHAFFFAZIK, S. R.; PALMA, S. D.; ALLEMANDI, D. A.; CRUZ, L. Novel Polymeric Nanoparticles Intended for Ophthalmic Administration of Acetazolamide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3183-3190, 2016.
- RAJEEV, A.J. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.
- RATHORE, K.; NEMA, R. K. An Insight into Ophthalmic Drug Delivery System. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2009.
- REITSAMER, H. A.; BOGNER, B.; TOCKNER, B.; KIEL, J. W. Effects of Dorzolamide on Choroidal Blood Flow, Ciliary Blood Flow, and Aqueous Production in Rabbits. **Physiology and Pharmacology**, v. 50, n. 5, p. 2301-2307, 2009.

- RIDDERSTRALE, Y.; WISTRAND, P. J. Membrane-associated carbonic anhydrase activity in the brain of CA II-deficient mice. **Journal of Neurocitology**, v. 29, n. 4, p. 263-269, 2000.
- ROBINSON, M. R.; BAFFI, J.; YUAN, P. Safety and pharmacokinetics of intravitreal 2-methoxyestradiol implants in normal rabbit and pharmacodynamics in a rat model of choroidal neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 74, n. 2, p. 309-17, 2002.
- ROJEK, B.; WESOŁOWSKI, M. FTIR and TG analyses coupled with factor analysis in a compatibility study of acetazolamide with excipients. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 208, p. 285-293, 2018.
- RONG, X.; YUAN, W.; LU, Y.; MO, X. Safety evaluation of poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactic-acid) microspheres through intravitreal injection in rabbits. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3057-3068, 2014.
- ROPSTAD, E. O.; NARFSTROM, K. The obvious and the more hidden components of the electroretinogram. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 17, p. 290-296, 2007.
- ROY, L. F.; DUFRESNE, L. R.; LEGAULT, L.; LONG, H.; MORIN, C. Acetazolamide in hemodialysis patients: a rational use after ocular surgery. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 20, n. 6, p. 650-652, 1992.
- SALIBA, J. B., CUNHA JÚNIOR, A.S., SILVA, G. R., YOSHIDA, M. I., MANSUR, A. A. P., MANSUR, H. S. Characterization and in vitro release of cyclosporine-a from poly(d,l-lactide-co-glycolide) implants obtained by solvent/extraction evaporation. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 723-727, 2012.
- SAKATA, K.; SAKATA, L. M.; SAKATA, V. M.; SANTINI, C.; HOPKER, L. M.; BERNARDES, R.; YABUMOTO, C.; MOREIRA, A. T. Prevalence of glaucoma in a South Brazilian population: Projeto Glaucoma. **Investigative Ophthalmology and Vision Science**, v. 48, n. 11, p. 4974-4979, 2007.
- SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 9, p. 1656-1661, 2011.
- SALOMÃO, S. R.; MITSUHIRO, M. R. K. H.; BELFORT JR, R. Visual impairment and blindness: an overview of prevalence and causes in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 539-549, 2009.
- SANCHEZ-PULGARÍN, M.; MARTÍNEZ-DE-LA-CASA, J. M.; GARCÍA-FEIJÓO, J.; SAÉNZ-FRANCÉS, F.; SANTOS-BUESO, E.; HERRERO-VANRELL, R.; GARCÍA-SANCHEZ, J. [Comparative study of the pressure lowering efficacy and variations in the ocular pulse amplitude between fixed combinations of dorzolamide/timolol and brinzolamide/timolol]. **Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia**, v. 86, n. 5, p. 149-153, 2011.
- SCHMIDL, D.; SCHMETTERER, L.; GARHOFER, G.; POPA-CHERECHANU, A. Pharmacotherapy of Glaucoma. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 2, p. 63-55, 2015.
- SCHWENCK, M. H.; PETER, W. L.; MEESE, M. G.; SINGHAL, P. C. Acetazolamide toxicity and pharmacokinetics in patients receiving hemodialysis. **Pharmacotherapy**, v. 15, n. 4, p. 522-527, 1995.
- SENG YUE, C.; HUYNH, H. H.; RAYMOND, C.; CHARBONNEAU, L.; ROY, L. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of acetazolamide in peritoneal dialysis patients and healthy volunteers. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 89-98, 2013.
- SEQUEIRA, J. A. D.; SANTOS, A. C.; SERRA, J.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. J.. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix implants. **Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs**, p.375-402, 2018.
- SERCOMBE, L.; VEERATI, T.; MOHEIMANI, F.; WU, S. Y.; SOOD, A. K.; HUA, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 286, 2015.
- SHAH, S. M.; JAIN, A. S.; KAUSHIK, R.; NAGARSENKER, M. S.; NERURKAR, M. J. Preclinical Formulations: Insight, Strategies, and Practical Considerations. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 5, p. 1307-1323, 2014.
- SHARMA, P.; SAMPLE, P. A.; ZANGWILL, L. M.; SCHUMAN, J. S. Diagnostic tools for glaucoma detection and management. **Survey of Ophthalmology**, v. 53, p. 17-32, 2008.

- SHARP, M. E. A rapid screening procedure for acidic and neutral drugs in blood by high resolution gas chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 11, p. 8-11, 1987.
- SHESHALA, R.; KOK, Y. Y.; MING NG, J.; SINGH, T. R. R.; DUA, K. In Situ Gelling Ophthalmic Drug Delivery System: An Overview and Its Applications. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 9, n. 3, p. 237-248, 2015.
- SHIH, G. C.; CALKINS, D. J. Secondary neuroprotective effects of hypotensive drugs and potential mechanisms of action. **Expert Review of Ophthalmology**, v. 7, n. 2, p. 161-175, 2012.
- SINGH, G.; KAUR, T.; KAUR, R.; KAUR, A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer PLGA. **International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 30-42, 2014.
- SINGH, J.; CHHABRA, G.; PATHAK, K. Development of acetazolamide-loaded, pH-triggered polymeric nanoparticulate in situ gel for sustained ocular delivery: in vitro, ex vivo evaluation and pharmacodynamic study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 9, p. 1223-1232, 2014.
- SINGLA, A. K.; KAUR, I. P.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Novel approaches for topical delivery of acetazolamide. **Pharmaceutical Technology**, p.24-30, 2002.
- SIRBAT, D.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; HOFFMANN, M.; MAINCENT, P. [Ways to improve ocular bioavailability for topical applications]. **Journal Français d'Ophthalmologie**, v. 25, n. 5, p. 505-509, 2000.
- SILA-ON, W.; NA-RANONG, S.; RAKROD, S.; ORNLAOR, S.; JOUNGMUNKONG, Z. Development and validation of RP-HPLC method for determination of acetazolamide, furosemide and phenytoin extemporaneous suspensions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 138-139, 2016.
- SILVA, G. R.; FIALHO, S. L.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, 2010.
- SILVA, A. T. C. R. **Síntese e caracterização do copolímero PLGA e estudos *in vitro* de sua degradação e liberação do fármaco atenolol**. Belo Horizonte, Escola de Engenharia da UFMG, 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Química).
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons. 2009. 912 p.
- SOARES, D. C. F.; DUARTE, L. P.; CUNHA JR, A. S.; OLIVEIRA, D. C. P. PLGA Antiangiogenic activity of PLGA-Lupeol implants for potential intravitreal applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 394-402, 2017.
- SOLANO, A. G. R. **Desenvolvimento de implantes poliméricos intraoculares contendo etoposídeo destinados ao tratamento de retinoblastoma**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).
- SONG, X.; ZHAO, Y.; HOU, S.; XU, F.; ZHAO, R.; HE, J.; CAI, Z.; LI, Y.; CHEN, Q. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 445-453, 2008.
- SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos**. 2007. 297f. (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. **A procedure to assess linearity by ordinary least squares method**. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SOUZA, M. C., FIALHO, S. L., SOUZA, P. A., FULGÊNCIO, G. O., DA SILVA, G. R., CUNHA JÚNIOR, A. S. Tacrolimus-loaded PLGA implants: in vivo release and ocular toxicity. **Current Eye Research**, v. 39, n. 1, p. 99-102, 2014.
- SRINIVASU, P.; SUBBARAO, D. V.; VEGESNA, R. V. K.; SUDHAKAR BABU, K. A validated stability-indicating LC method for acetazolamide in the presence of degradation products and its process-related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 142-148, 2010.

STAMER, W. D.; ACOTT, T. S. Current understanding of conventional outflow dysfunction in glaucoma. **Current Opinion on Ophthalmology**, v. 23, n. 2, p. 135-143, 2012.

STANDRING, S. **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 41 ed. Atlanta: Elsevier, 2017. 1584 p.

STEIN, A.; PINKE, R.; KRUPIN, T.; GLABB, E.; PODOS, S. M.; SERLE, J.; MAREN, T. H. The effect of topically administered carbonic anhydrase inhibitors on aqueous humor dynamics in rabbits. **American Journal of Ophthalmology**, v. 95, n. 2, p. 222-228, 1983.

STEWART, S. A.; DOMÍNGUEZ-ROBLES J.; DONNELLY, R. F.; LARRAÑETA, E. Implantable Polymeric Drug Delivery Devices: Classification, Manufacture, Materials, and Clinical Applications. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 1379-1403, 2018.

SUN, S. B.; LIU, P.; SHAO, F. M.; MIAO, Q. L. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 19670-19681, 2015.

SURESH, P.; LAVAKESH, O.; PUSHPENDRA, S. Development and validation of stability indicating related substance method for acetazolamide tablets. **Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Sciences**, n. 2320, p. 7418, 2020.

TAMBOLI, V.; MISHRA, G. P.; MITRA, A. K. 3. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. In: MITRA, A.K. (ed). **Advances in Ocular Drug Delivery**. Kerala: Research SignPost, 2012, p. 66-86.

TAMILVANAN, S.; KUMAR, B. A. Influence of acetazolamide loading on the (in vitro) performances of non-phospholipid-based cationic nanosized emulsion in comparison with phospholipid-based anionic and neutral-charged nanosized emulsions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 9, p. 1003-1015, 2011.

TAMM, E. R. The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. **Experimental Eye Research**, v. 88, n. 4, p. 648-655, 2009.

TARTARA, L. I.; QUINTEROS, D. A.; SAINO, V.; ALLEMANDI, D. A.; PALMA, S. D. Improvement of acetazolamide ocular permeation using ascorbyl laurate nanostructures as drug delivery system. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 102-109, 2012.

TARTARA, L. I.; PALMA, S. D.; ALLEMANDI, D.; AHUMADA, M. I.; LLABOT, J. M. New mucoadhesive polymeric film for ophthalmic administration of acetazolamide. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 8, n. 3, p. 224-232, 2014.

TEBA, H. E.; KHALIL, I. A.; EL SOROGY, H. M. Novel cubosome based system for ocular delivery of acetazolamide. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 2177-2186, 2021.

THAM, Y.; LI, X.; WONG, T. Y.; QUIGLEY, H. A.; AUNG, T. CHENG, C. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040. **Journal of American Academy of Ophthalmology**, v. 121, n. 11, p. 2081-2090, 2014.

THIRY, A.; DOGNE, J.; SUPURAN, C. T.; MASEREEL, B. Carbonic Anhydrase Inhibitors as Anticonvulsant Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 855-864, 2007.

THRIMAWITHANA, T. R., YOUNG, S., BUNT, C. R., GREEN, C., ALANY, R. G. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 5/6, p. 270-277, 2011.

TOLEDO, C. R. **Ácido corosólico na oftalmologia: avaliação da atividade antiangiogênica, segurança e toxicidade ocular, desenvolvimento e caracterização de implante biodegradável de liberação prolongada**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

TOPOUZIS, F.; HARRIS, A.; WILSON, M. R.; KOSKOSAS, A.; FOUNTI, P.; YU, F.; ANASTASOPOULOS, E.; PAPPAS, T.; COLEMAN, A. L. Increased likelihood of glaucoma at the same screening intraocular pressure in subjects with pseudoexfoliation: the Thessaloniki Eye Study. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, n. 4, p. 606-613, 2009.

TORRING, M. S.; HOLMGAARD, K.; HESSELLUND, A.; AALKJAER, C.; BEK, T. The vasodilating effect of acetazolamide and dorzolamide involves mechanisms other than carbonic anhydrase inhibition. **Investigative Ophthalmology and Vision Science**, v. 50, n. 1, p. 345-351, 2009.

- TOUS, S. S.; ABD-EL NASSER, K. Acetazolamide topical formulation and ocular effect. **STP Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 125-131, 1992.
- TROTZMULLER, M.; GUO, X.; FAULAND, A.; KOFELER, H.; LANKMAYR, E. Characteristics and origins of common chemical noise ions in negative ESI LC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 6, p. 553-560, 2011.
- UNITED STATES Pharmacopeia. 44 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. 2021.
- URTTI, A.; DEL AMO, E.; PELKONEN, L.; RIMPELA, A. K.; KIDRON, H.; REINISALO, M. Ocular pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Acta Pharmacologica**, s/v, s/p, 2017.
- VARGAS, F.; HISBETH, M. V.; ROJAS, J. K. Photolysis and photosensitized degradation of the diuretic drug acetazolamide. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 118, p. 19-23, 1998.
- VASS, C.; HIRN, C.; SYCHA, T.; FINDL, O.; BAUER, P.; SCHMETTERER, L. Medical interventions for primary open angle glaucoma and ocular hypertension. **Cochrane Database for Systematic Reviews**, v. 17, n. 4, 2007.
- VASUDEVAN, S. K.; GUPTA, V.; CROWSTON, J. G. Neuroprotection in glaucoma. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 59, p. 102-113, 2011.
- VERCH, T.; CAMPA, C.; CHERRY, C. C.; FRENKEL, R.; GRAUL, T.; JAYA, N.; NAKLHE, B.; SPRINGALL, J.; STARKEY, J.; WYPYCH, J.; RANHEIM, T. Analytical Quality by Design, Life Cycle Management, and Method Control. **The AAPS Journal**, v. 24, n. 1, p. 34, 2022.
- VERMA, P.; GUPTA, R. N.; JHA, A. K.; PANDEY, R. Development, in vitro and in vivo characterization of Eudragit RL 100 nanoparticles for improved ocular bioavailability of acetazolamide. **Drug Delivery**, v. 20, n. 7, p. 269-276, 2013.
- VIEIRA, L. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de ácido rosmarínico para o tratamento de doenças oculares causadoras de neovascularização: obtenção e caracterização dos sistemas.** Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- VISHWARAJ, C. R.; KAVITHA, S.; VENKATESH, R.; SHUKLA, A. G.; CHANDRAN, P.; TRIPATHI, SHWETA. Neuroprotection in glaucoma. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 70, n. 2, p. 380-385, 2022.
- XUE, Y.J.; GAO, H.; JI, Q. C.; LAM, Z.; FANG, X.; LIN, Z. J.; HOFFMAN, M.; SCHULZ-JANDER, D.; WENG, N. Bioanalysis of drug in tissue: current status and challenges. **Bioanalysis**, v. 4, n. 21, p. 2637-2653, 2012.
- WALLACE, S. M.; SHAH, V. P.; RIEGELMAN, S. GLC analysis of acetazolamide in blood, plasma, and saliva following oral administration to normal subjects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 4, p. 527-530, 1977.
- WEINREB, R. N.; KHAW, P. T. Primary open-angle glaucoma. **The Lancet**, v. 363, n. 9422, p. 1711-1720, 2004.
- WEINREB, R. N.; AUNG, T.; MEDEIROS, F. A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. **Journal of The American Medical Association**, v. 311, n. 18, p. 1901-1911, 2014.
- WILSON, S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, v. 327, p. 32-46, 2015.
- WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Model List of Essential Medicines.** 25 ed. Geneva: World Health Organization, 2022.
- WISTRAND, P. J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Acetazolamide in Relation to its Use in the Treatment of Glaucoma. **Pharmacology and Pharmacokinetics**, p. 191-194, 1972.
- YADAV, D.; SANDEEP, K.; PANDEY, D.; DUTTA, R. K. Liposomes for Drug Delivery. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 7, n. 4, e1000276, 2017.
- YANO, I.; TAKAYAMA, A.; TAKANO, M.; INATANI, M.; TANIHARA, H.; OGURA, Y.; HONDA, Y.; INUI, K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetazolamide in patients with transient intraocular pressure elevation. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 63-68, 1998.

- YAKATAN, G. J.; MARTIN, C. A.; SMITH, R. V. Enzymatic determination of acetazolamide in human plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 84, n. 1, p. 173-177, 1976.
- YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; SAKURAI, E.; TABATA, Y.; KIMURA, H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2033-2046, 2005.
- YU, L. X.; AMIDON, G.; KHAN, M. A.; HOAG, S. W.; POLLI, J. RAJU, G. K.; WOODCOCK, J. Understanding pharmaceutical quality by design. **The AAPS Journal**, v. 16, n. 4, p. 771-783, 2014.
- ZARGHI, A.; SHAFATI, A. Rapid determination of acetazolamide in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 1, p. 169-172, 2002.
- ZERNII, E. Y.; BAKSHEEVA, V. E.; IOMDINA, E. N.; AVERINA, O. A.; PERMYAKOV, S. E.; PHILIPPOV, P. P.; ZAMYATNIN, A. A.; SENIN, I. I. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 15, n. 3, p. 267-291, 2016.
- ZHOU, S.; SONG, Q.; TANG, Y.; NAIDONG, W. Critical review of development, validation, and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.1, n. 1, p. 3-14, 2005.
- ZIMMER, A.; KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 61-73, 1995.
- ZHU, Y. L.; AN, J.; CHANG, H.; WANG, X. F.; ZHOU, J.; ZHANG, X. L. An analytical method for overlapping of the melting and decomposition of 2-oximemalononitrile. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 146, p. 1803-1809, 2021.
- ZOU, L.; NAIR, A.; WENG, H. Intraocular Pressure Changes: An Important Determinant of the Biocompatibility of Intravitreal Implants. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1-9, 2011.

ANEXO I – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UFMG: PROTOCOLO Nº. 43/2020

Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 43/2020 (CEUA-UFMG)

ceua@prpq.ufmg.br <ceua@prpq.ufmg.br>
Para: cfernandes@farmacia.ufmg.br, cfernandes75@gmail.com

16 de março de 2020 15:5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 43/2020

Título do projeto: Estudo farmacocinético de acetazolamida em tecidos oculares após administração intravítrea

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Christian Fernandes

Unidade: Faculdade de Farmacia

Departamento: Departamento de Produtos Farmaceuticos

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 16/03/2020. Validade: 16/03/2020 à 15/03/2025.

Belo Horizonte, 16/03/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA FUNED: PROTOCOLO Nº. 027/2021



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **"Desenvolvimento e Avaliação de Implantes Intravítreos em Coelhos Contendo Acetazolamida para o Tratamento do Glaucoma em Humanos"**, registrado com o nº **027/2021**, sob a responsabilidade de **Sílvia Ligório Fialho** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, em reunião do dia **20/10/2021**.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	01/12/2021 a 01/12/2022
Espécie/linhagem/raça	Coelhos Nova Zelândia (albinos)
Nº de animais	32
Peso/Idade	2 a 2,5Kg/ 2 a 3 meses
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	DSI-Comércio, Importação e Exportação LTDA

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste parecer e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-FUNED o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e nas publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008 e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, ou seja, até **02/01/2023**.

Belo Horizonte, 05 de novembro de 2021.


 Clara Guerra Duarte
 Coordenadora da CEUA/FUNED

Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, MG.
CEP 30510-010 Telefone: (31) 3314-4645

Recebido em: ____ / ____ / ____

Ass: _____

ANEXO III – ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb

Review

Chromatographic bioanalysis of antiglaucoma drugs in ocular tissues

Pedro Henrique Reis da Silva, Armando da Silva Cunha Júnior, Gerson Antônio Pianetti, Christian Fernandes*

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Glaucoma

Sample preparation

Bioanalytical methods

High-performance liquid chromatography

Ophthalmic drugs

ABSTRACT

Glaucoma is a heterogeneous group of multifactorial optic neuropathies and the leading cause of irreversible blindness and visual impairment. Epidemiological data has estimated that in 2020 there will be more than 80 million individuals affected by the disease worldwide. Nowadays, intraocular pressure (IOP) lowering is carried out mainly by pharmacotherapy, with different drugs. The study of ocular pharmacokinetics of antiglaucoma drugs, crucial for better understanding of ocular distribution, bioavailability, and pharmacodynamic parameters, can benefit the development of antiglaucoma drugs or formulations. Bioanalysis of drugs in ocular matrices is still underestimated, since it is challenging and rarely performed. Therefore, this review summarized the chromatographic methods employed for the quantification of several antiglaucoma drugs in different ocular matrices, discussing bioanalytical steps, such as sample preparation, separation, and detection. Animals and matrices as well as the challenges faced in ocular bioanalysis were also discussed. Ocular bioanalysis has been performed mainly in rabbits, the most adequate animal model for ocular studies. The matrix most used is aqueous humor, because it is cleaner and easier to sample. Sample preparation was carried out primarily employing classic techniques, such as liquid-liquid extraction, protein precipitation, and solid-phase extraction, with conventional solvents and sorbents. Chromatographic separation was achieved predominantly by reversed-phase liquid chromatography. Ultraviolet spectrophotometry and tandem mass spectrometry prevailed for detection, although other techniques, such as fluorimetry, have also been used. It was evidenced that more efforts must be directed towards miniaturized, eco-friendly, and non-terminal sampling for sample preparation. In its turn, ultra high-performance liquid chromatography and mass spectrometry should gain prominence in ocular bioanalysis for separation and detection, respectively, since it combines high separation capacity with selectivity and sensitivity, in addition to being an environmental friendly approach.

1. Introduction

1.1. Pathophysiology, epidemiology and pharmacotherapy of glaucoma

Glaucoma is a heterogeneous group of chronic and multifactorial ocular disorders mainly characterized by typical structural changes (cupping) in the optic disc, substantial apoptosis, or axonal loss of retinal ganglion cells (RGC) and irreversible visual acuity loss [1,2]. It is the second leading cause of general blindness and the most important cause of irreversible blindness [3,4]. Epidemiological studies have estimated that glaucoma will affect approximately 75 to 80 million individuals in 2020 and will be responsible for more than 11 million cases of unilateral or bilateral blindness [5,6].

Even though it is not the sole cause, intraocular pressure (IOP) is the

only manageable risk factor in patients suffering from glaucoma [7]. Currently, IOP lowering is still the most effective approach for glaucoma management [8]. Several surgical and minimally invasive procedures are available, but pharmacotherapy is the most recommended intervention, according to worldwide guidelines [9,10]. Different topically or systemically (orally or intravenously) applied antiglaucoma drugs are commercially available for IOP decrease. The choice of a therapeutic protocol must consider efficacy, safety, convenience, and risks of administration route, cost-benefit analysis, age, severity, prognosis, and simultaneous diseases or medical conditions [7,9,11].

The regulation of IOP is carried out through the inflow and outflow balance of aqueous humor, produced in the ciliary body and drained through the trabecular meshwork, into the Schlemm's channel (conventional pathway) or through uvea and sclera (uveoscleral pathway)

* Corresponding author.

E-mail address: cfernandes@farmacia.ufmg.br (C. Fernandes).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122388>

Received 7 May 2020; Received in revised form 11 September 2020; Accepted 24 September 2020

Available online 12 October 2020

1570-0232/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.