

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

GUSTAVO DE OLIVEIRA FULGÊNCIO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE IMPLANTES
MUCOCONJUNTIVAIS BIODEGRADÁVEIS CONSTITUÍDOS DE
QUITOSANA PARA TRATAMENTO DE OFTALMOPATIAS**

BELO HORIZONTE

2012

GUSTAVO DE OLIVEIRA FULGÊNCIO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE IMPLANTES MUCOCONJUNTIVAIIS
BIODEGRADÁVEIS CONSTITUÍDOS DE QUITOSANA PARA TRATAMENTO DE
OFTALMOPATIAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio Bretas Viana

BELO HORIZONTE

2012

“Ora, não percebeis que com os olhos alcançais toda a beleza do mundo? O olho é o senhor da astronomia e o autor da cosmografia; ele desvenda e corrige toda a arte da humanidade; conduzem os homens as partes mais distantes do mundo; é o príncipe da matemática, e as ciências que o têm por fundamento são perfeitamente corretas.

“O olho mede a distância e o tamanho das estrelas; encontra os elementos e suas localizações; deu origem a arquitetura, a perspectiva, e a divina arte da pintura.”

“... Que povos, que línguas poderão descrever completamente sua função? O olho é a janela do corpo humano pela qual ele abre os caminhos e se deleita com a beleza do mundo.”

Leonardo Da Vinci 1452-1519

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Mariana, Célia e Leonardo

À Universidade Federal de Minas Gerais, meu berço, minha casa

À Oftalmologia Veterinária

E também a um antigo sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pela força, fé e inspiração;

Ao Professor Armando da Silva Cunha Júnior pela orientação, apoio e confiança;

Ao Professor Fernando Antônio Bretas Viana pelo incentivo, amizade e atenção;

Ao Professor André Augusto Gomes Faraco pelos conselhos e materiais cedidos;

À Juçara Franca, Ricardo Byrro e Juliana Saliba pelos conselhos e contribuições;

Aos meus alunos pela inspiração e aprendizado contínuo;

À Fundação Presidente Antônio Carlos e Faculdade Fead pela oportunidade de trabalho;

A Mariana, nas horas livres, meu grande amor;

A minha família e amigos pela paciência e companheirismo;

A todos os colegas da Escola de Veterinária e da Faculdade de Farmácia;

Aos coelhos pela contribuição à ciência;

Por fim, a Oftalmologia Veterinária.

RESUMO

Colírios e pomadas representam a principal forma de tratamento das oftalmopatias necessitando de administrações frequentes. Os implantes mucoconjuntivais biodegradáveis são capazes de liberar os fármacos de forma prolongada permitindo maior eficácia na terapêutica ocular. A quitosana é um polissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível obtido através da desacetilação da quitina. Por isto, a quitosana vem despertando o interesse da comunidade científica como matriz polimérica no desenvolvimento de implantes. Neste trabalho, desenvolveram-se implantes mucoconjuntivais constituídos de quitosana e maleato de timolol e ofloxacino para prevenção e tratamento do glaucoma e infecções oculares superficiais, respectivamente. Os implantes foram produzidos empregando-se técnica de solvatação e evaporação. A caracterização pelo teste de hidratação, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia na região do infravermelho e teste de liberação *in vitro* confirmaram a presença e estabilidade dos fármacos na matriz polimérica. Na avaliação de eficácia *in vitro* não houve diferença significativa no halo de inibição bacteriana do implante de ofloxacino em comparação com disco estéril embebido em ofloxacino 0,3% em meio de cultura com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* ($P < 0.05$). Os implantes de ofloxacino e maleato de timolol liberaram 80% fármacos em aproximadamente 1 h e 14 dias *in vitro*, entretanto, o tempo máximo de liberação *in vivo* foi de cinco dias e 10 semanas, respectivamente. Não houve diferença estatística na redução da pressão intraocular de coelhos normotensos entre os tratamentos com maleato de timolol 0,3% e implante com mesmo fármaco ($P < 0.05$). A concentração máxima do ofloxacino nos animais que receberam ofloxacino 0,3% foi $121,09 \pm 10,84$ (C_{\max} $\mu\text{g/mL}$) às 0,5 h e mínima de $12,61 \pm 1,78$ (C_{\min} $\mu\text{g/mL}$) às 7 h com $\text{AUC}_{(0.5-7\text{h})} = 191,36 \pm 16,60$ $\mu\text{g/mL}$. Nos animais que receberam implantes de ofloxacino, a concentração do mesmo foi máxima em $1095,54 \pm 121,59$ (C_{\max} $\mu\text{g/mL}$) às 0,5 h reduzindo para o mínimo de $12,78 \pm 1,39$ (C_{\min} $\mu\text{g/mL}$) às 120 h com $\text{AUC}_{(0.5-120\text{h})} = 13524,09 \pm 2263,81$ $\mu\text{g/mL}$. Não houve diferença estatística na concentração do ofloxacino coletado às 2 h no primeiro grupo ($35,13 \pm 5,26$) e as 72 h no segundo grupo ($33,60 \pm 3,23$) ($P = 0.4544$) e às 7 h no primeiro grupo ($12,61 \pm 1,78$) comparado com 120 h no segundo grupo ($12,78 \pm 1,39$) ($P = 0.8336$). Nenhuma alteração clínica significativa foi observada e nenhum sinal de toxicidade celular

nas estruturas em contato direto com os implantes foi identificado no estudo histopatológico. Implantes mucoconjuntivais desenvolvidos representam alternativa segura, eficiente e inovadora à terapêutica convencional com futuro promissor na prevenção e tratamento do glaucoma e nas infecções oculares superficiais.

Palavras-chave: Sistema de liberação de fármacos; Implantes oculares; Oftalmopatias; Maleato de timolol; Ofloxacino; Coelho

ABSTRACT

Collirium and ointment represent the majority of topical preparations for ophthalmic diseases. Mucoconjunctival films represent alternative methods aimed at improving conventional ocular therapy. Chitosan is a polysaccharide obtained through the deacetylation of chitin. Biodegradability, biocompatibility, and non-toxicity are included in favorable biological properties, which allow for their use as vehicles for ophthalmic formulations. Mucoconjunctival films with timolol maleate and ofloxacin were produced and evaluated *in vivo* for the treatment and prevention of glaucoma and external ocular infection. Chitosan drug-loaded films were produced by a casting/solvent evaporation technique. The presence of the drugs on biopolymers was confirmed by means of swelling studies, attenuated total reflectance fourier transformed infrared spectroscopy spectral data, differential scanning calorimetry analyses, and *in vitro* studies. No significant difference could be observed between ofloxacin-loaded chitosan films and sterile disks soaked in 0.3% ofloxacin within a bacterial kill zone of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* ($P < 0.05$). In this *in vitro* study, 80% of the drug was released from the films at 1 h and 14 days after application for timolol maleate and ofloxacin, respectively. Maximum release *in vivo* was 5 days after application for timolol maleate and 10 weeks for ofloxacin. No significant difference in the lowering of intraocular pressure in rabbits treated with 0.5% timolol maleate, as compared to those that received the films ($P < 0.05$), could be observed. Ofloxacin concentration on tears of animals that received 0.3% ofloxacin was 121.09 ± 10.84 (C_{\max} $\mu\text{g/mL}$) and leveled off at 7 h at 12.61 ± 1.78 (C_{\min} $\mu\text{g/mL}$) with $\text{AUC}_{(0.5-7\text{h})} = 191.36 \pm 16.60$ $\mu\text{g/mL}$. In rabbits that received ofloxacin-loaded chitosan films, the tear concentration of the drug peaked at 0.5 h to a level of 1095.54 ± 121.59 (C_{\max} $\mu\text{g/mL}$) and leveled off at 120 h at 12.78 ± 1.39 (C_{\min} $\mu\text{g/mL}$) with $\text{AUC}_{(0.5-120\text{h})} = 13524.09 \pm 2263.81$ $\mu\text{g/mL}$. No statistically significant difference could be observed in ofloxacin concentrations in animals treated with 0.3% ofloxacin at 2 h after administration (35.13 ± 5.26) and 72 h following drug-loaded chitosan administration (33.60 ± 3.23) ($P = 0.4544$). Similarly, no statistically difference could be observed at 7 h in animals treated with 0.3% ofloxacin (12.61 ± 1.78) and 120 h or 5 days using chitosan films (12.78 ± 1.39) ($P = 0.8336$). No important signs of ocular discomfort or irritations could be identified. Ophthalmic structures that came in direct contact with the films

revealed no alterations within histopathologic studies. Moreover, the animals showed no signs of ocular discomfort during the experimental assays. These findings suggest that the drug-loaded chitosan film is safe and efficient and presents a promising future as an ocular drug delivery system in the treatment and prevention of glaucoma and external ocular infection.

Key-words: Drug delivery system; Ocular delivery; Ophthalmic disease; Timolol maleate; Ofloxacin; Rabbit

LISTAS DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1 Corte sagital do bulbo ocular e seus anexos na espécie humana..... | 23 |
| 2 Desenho esquemático das pálpebras superior e inferior..... | 25 |
| 3 Fotomicrografia da córnea do coelho..... | 27 |
| 4 Fotografia de fundo de olho de cão e gato onde não há pigmento no epitélio pigmentar da retina possibilitando a visualização dos vasos da coróide, respectivamente..... | 28 |
| 5 Representação esquemática das camadas da retina de cão..... | 31 |
| 6 Fotografia de retina e disco óptico da espécie canina, felina, eqüina e bovina..... | 32 |
| 7 Fotografia de retina com variações normais da espécie canina..... | 33 |
| 8 Representação esquemática da acomodação visual necessária para focar objetos próximos ao observador..... | 35 |
| 9 Fotografia de olho de gato com luxação anterior do cristalino..... | 36 |
| 10 Esquema representativo do aparelho lacrimal..... | 37 |
| 11 Fotografia de cão com epífora causada pela obstrução do canal nasolacrimal do lado direito evidenciado pela ausência do corante de fluoresceína na narina ipsi-lateral (Teste de Jones negativo)..... | 38 |
| 12 Fotografia da retina de cão com erliquiose. Notar coriorretinite, hemorragia e descolamento de retina..... | 40 |
| 13 Fotografia de uveíte anterior em cão e gato. (A) Notar presença de sangue (hifema) em olho de cão tripanossomíase. (B) Notar “flare” aquoso e precipitados ceráticos em olho de gato com leucemia felina a vírus..... | 41 |
| 14 Fotografia de olho de cão com glaucoma agudo. Notar midríase moderada e hiperemia conjuntival..... | 43 |
| 15 Fotografia de olho de cão com glaucoma crônico. Notar congestão dos vasos episclerais, edema de córnea e midríase..... | 43 |
| 16 Representação esquemática da via de absorção de fármacos administrados através das vias sistêmica e tópica. A absorção é indicada pelas setas finas e excreção pelas setas em negrito. As barreiras oculares estão representadas como BHR E/I (barreira hemoretiniana externa / interna) e BHA (barreira hematoaquosa)..... | 48 |
| 17 Estrutura química da quitosana..... | 51 |
| 18 Estrutura química do maleato de timolol..... | 54 |
| 19 Estrutura química do ofloxacino..... | 55 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 20 | Fotografia da película da quitosana sem o fármaco..... | 60 |
| 21 | Fotografia do filme de quitosana com MT cortados em circunferência preparados para a administração <i>in vivo</i>..... | 63 |
| 22 | Gráfico de hidratação do filme de quitosana branco (BCF) e do filme de quitosana com o MT (MTF)..... | 69 |
| 23 | Gráfico de hidratação do filme de quitosana branco (BCF) e do filme de quitosana com o ofloxacino (OfF)..... | 70 |
| 24 | Espectroscopia infravermelho na região de 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹ do filme de quitosana branco (a), MT (b) e filme de quitosana com MT (c)..... | 71 |
| 25 | Espectroscopia infravermelho na região de 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹ do ofloxacino (a), filme de quitosana branco (b) e filme de quitosana com ofloxacino (c)..... | 72 |
| 26 | Análises térmicas do filme de quitosana sem o fármaco (A) e quitosana com MT (B)..... | 74 |
| 27 | Análises térmicas do filme de quitosana sem o fármaco (BCF), ofloxacino (Of) e quitosana com ofloxacino (OfCF) em (a) corrida 1 e em (b) corrida 2..... | 76 |
| 28 | Perfil de liberação <i>in vitro</i> do filme de quitosana com MT..... | 77 |
| 29 | Perfil de liberação <i>in vitro</i> do filme de quitosana com ofloxacino..... | 78 |
| 30 | Fotografia da zona de inibição bacteriana. Meio de cultura com <i>Staphylococcus aureus</i> mostrando zona de inibição com (A) disco controle comercial de ciprofloxacino, (B) filme de quitosana sem fármaco, (C) filme de quitosana com ofloxacino e (D) disco estéril embebido em ofloxacino 0,3%..... | 79 |
| 31 | Fotografia da zona de inibição bacteriana. Meio de cultura com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mostrando zona de inibição com (A) filme de quitosana sem fármaco, (B) disco estéril embebido em ofloxacino 0,3%, (C) disco controle comercial de enrofloxacino (D) filme de quitosana com ofloxacino..... | 80 |
| 32 | Fotografia dos implantes de quitosana e MT antes (esquerda) e depois (direita) da hidratação em solução salina..... | 83 |
| 33 | Gráfico ilustrando a redução da PIO no OD tratado com o colírio (Timoptol®) e administrado o filme de quitosana e MT..... | 84 |
| 34 | Gráfico ilustrando o desvio-padrão na redução da PIO no OD tratado com o colírio (Timoptol®) e administrado o filme de quitosana com o MT..... | 85 |
| 35 | Gráfico ilustrando a redução da PIO no olho não tratado (OE)..... | 86 |
| 36 | Gráfico ilustrando o desvio-padrão na redução da PIO no olho não tratado (OE)..... | 87 |
| 37 | Fotografia de olho de coelho com filme de quitosana e MT. Notar olho calmo sem sinais de incômodo ou irritação ocular..... | 88 |

| | |
|---|-----------|
| 38 Fotografia do mesmo olho da figura anterior. Notar o implante no saco conjuntival ao puxar ventralmente a pálpebra inferior..... | 88 |
| 39 Fotografia da retina de coelho tratado com colírio de MT. Nenhuma alteração foi observada nos vasos da coróide, retina e DO..... | 89 |
| 40 Fotografia da retina de coelho tratado com quitosana e MT. Nenhuma alteração foi observada nos vasos da coróide, retina e DO..... | 89 |
| 41 Fotografia dos implantes de quitosana e ofloxacino antes da hidratação em solução salina..... | 90 |
| 42 Curvas da concentração média do ofloxacino na lágrima de coelhos tratados com colírio a 0,3% (colírio) e implante de quitosana e ofloxacino..... | 93 |
| 43 Fotografia de olho de coelho com implante de quitosana e ofloxacino no saco conjuntival..... | 94 |
| 44 Fotografia de olho de coelho com hiperemia conjuntival e lacrimejamento discretos..... | 94 |
| 45 Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com colírio de MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes..... | 97 |
| 46 Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com filme de quitosana e MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes HE..... | 97 |
| 47 Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com colírio de MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes..... | 97 |
| 48 Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com filme de quitosana e MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes..... | 97 |
| 49 Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com colírio de ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes..... | 99 |
| 50 Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com filme de quitosana e ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes.... | 99 |
| 51 Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com colírio de ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes..... | 99 |
| 52 Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com filme de quitosana e ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes..... | 99 |

LISTAS DE TABELAS

| | |
|--|----|
| 1 Comparação do halo de inibição bacteriano entre o filme de quitosana sem fármaco, disco controle comercial, disco estéril embebido em ofloxacino 0,3% e filme de quitosana e ofloxacino. Os dados são expressos em milímetros e representados como a média \pm o desvio-padrão (n=6)..... | 81 |
| 2 Concentração do ofloxacino na lágrima de coelhos tratados com 50 μ L de ofloxacino 0,3% (Oflox [®]) e filme de quitosana e ofloxacino..... | 92 |

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARVO – do inglês, Association for Research in Vision and Ophthalmology
ATCC – do inglês, American Type Culture Collection
ATR - Reflexão total atenuada
AUC – do inglês, Area under the curve
BHA - Barreira hematoaquosa
BHO - Barreira hematoocular
BHR - Barreira hematoretiniana
CETEA – Comitê de ética em experimentação animal
CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária
°C – Grau centígrado
CG - Células ganglionares
CLAE – Cromatografia a líquido de alta eficiência
CLSI - do inglês, Clinical and Laboratory Standards Institute
 C_{max} – Concentração máxima
 C_{min} – Concentração mínima
DM – Detector de massa
DO - Disco óptico
DSC – Calorimetria diferencial exploratória
EPR - Epitélio pigmentar da retina
EUA – Estados Unidos da América
FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
IACs - Inibidores da anidrase carbônica
mmHg – Milímetros de mercúrio
MT - Maleato de timolol
OD - Olho direito
OE – Olho esquerdo
PBS – Solução tampão fosfato
PG – Prostaglandina
 $PGF_{2\alpha}$ – Prostaglandina $F_{2\alpha}$
pH – Potencial hidrogeniônico

PIO - Pressão intraocular

rpm - Rotações por minuto

STT – do inglês, Schirmer tear test

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV – Ultravioleta

VCE - Via conjuntivoescleral

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 Anatomo-fisiologia ocular | 22 |
| 2.1.1 Pálpebras e Conjuntiva..... | 23 |
| 2.1.2 Túnica fibrosa: Córnea e esclerótica..... | 26 |
| 2.1.3 Túnica vascular: úvea..... | 27 |
| 2.1.4 Túnica nervosa: retina e disco óptico..... | 29 |
| 2.1.5 Meios de refração do bulbo do olho..... | 33 |
| 2.1.6 Aparelho lacrimal..... | 36 |
| 2.1.7 Barreiras hematooculares..... | 39 |
| 2.2 Glaucoma | 42 |
| 2.2.1 Tratamento medicamentoso do glaucoma..... | 44 |
| 2.3 Infecções da superfície ocular | 46 |
| 2.4 Farmacocinética da administração tópica por meio da via ocular | 47 |
| 2.5 Quitosana | 50 |
| 2.5.1 Utilização da quitosana em oftalmologia..... | 52 |
| 2.6 Implantes mucoconjuntivais | 53 |
| 2.6.1 Implantes de maleato de timolol e outros antiglaucomatosos..... | 53 |
| 2.6.2 Implantes de ofloxacino e outros antimicrobianos..... | 54 |
| 3. OBJETIVOS | 56 |
| 3.1 Objetivo geral | 56 |
| 3.2 Objetivos específicos | 56 |

| | |
|---|----|
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 58 |
| 4.1 Materiais | 58 |
| 4.2 Métodos | 59 |
| 4.2.1 Desenvolvimento dos implantes mucoconjuntivais constituídos de quitosana com maleato de timolol e ofloxacino..... | 59 |
| 4.2.2 Caracterização dos implantes mucoconjuntivais..... | 60 |
| 4.2.2.1 Teste de hidratação dos filmes de quitosana..... | 60 |
| 4.2.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho..... | 61 |
| 4.2.2.3 Calorimetria exploratória diferencial..... | 62 |
| 4.2.2.4 Teste de liberação do fármaco <i>in vitro</i> | 62 |
| 4.2.3 Teste de eficácia <i>in vitro</i> | 69 |
| 4.2.4 Teste de liberação do fármaco <i>in vivo</i> | 69 |
| 4.2.5 Determinação do ofloxacino na lágrima..... | 66 |
| 4.2.6 Avaliação histopatológica..... | 67 |
| 4.2.7 Análise estatística..... | 68 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 5.1 Teste de hidratação dos filmes | 69 |
| 5.2 Espectroscopia na região do infravermelho | 70 |
| 5.3 Calorimetria exploratória diferencial | 73 |
| 5.4 Teste de liberação do fármaco <i>in vitro</i> | 77 |
| 5.5 Teste de eficácia <i>in vitro</i> | 78 |
| 5.6 Teste de liberação do fármaco <i>in vivo</i> | 82 |
| 5.6.1 Implantes de quitosana e maleato de timolol..... | 82 |

| | |
|--|------------|
| 5.6.2 Implantes de quitosana e ofloxacino..... | 89 |
| 5.7 Avaliação histopatológica..... | 96 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 101 |
| 7. CONTRIBUIÇÕES À LITERATURA CIENTÍFICA..... | 102 |
| 7.1 Trabalhos apresentados em congressos..... | 102 |
| 7.2 Artigos científicos publicados..... | 102 |
| 7.3 Artigo científico submetido à publicação..... | 103 |
| 7.4 Depósito de patente..... | 103 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 104 |

1. INTRODUÇÃO

A administração tópica é a forma mais comum e aceitável de utilização de medicamentos na oftalmologia humana e veterinária devido as suas vantagens como pequena absorção sistêmica, poucos efeitos adversos, facilidade de aplicação e conveniência (Lee e Robinson 1986; Ludwig, 2005; Urtti, 2006; Regnier, 2007). Por outro lado, a rápida depuração ocular e instilações freqüentes que demandam tempo e cuidados dos pacientes e proprietários de animais de estimação são problemas correntes (Saettone e Salminen, 1995; Baeyens et al., 1997; Urtti, 2006). Mecanismos protetores como o ato de piscar o olho, lacrimejamento intermitente e a drenagem lacrimal necessários para preservar a integridade e higidez dos tecidos oculares também favorecem a remoção de fármacos administrados sobre a superfície do bulbo do olho, dificultando o tratamento das oftalmopatias (Urtti, 2006; Regnier, 2007).

A terapêutica da maioria das doenças oculares é realizada pela aplicação tópica de colírios e pomadas (Ali e Lehmussaari, 2006; Regnier, 2007; Viana et al., 2011). Essas formas farmacêuticas representam 90% das formulações comercializadas atualmente. As razões para a escolha destas apresentações comerciais são, principalmente, a simplicidade no desenvolvimento farmacotécnico e a boa aceitabilidade pelos pacientes (Ali e Lehmussaari, 2006). Entretanto, após administração tópica, menos de 5% da dose aplicada penetra na córnea e atinge os tecidos intraoculares, enquanto a maior fração é absorvida sistemicamente através da conjuntiva ou drenada através do ducto nasolacrimal (Maurice e Mishima, 1984). Esta absorção sistêmica deve ser evitada, pois, está diretamente relacionado com efeitos adversos indesejáveis (Järvinen et al., 1995; Järvinen e Järvinen, 1995; Urtti, 2006).

Vários biomateriais têm sido utilizados na preparação de implantes oculares com destaque para a quitosana (Fialho et al., 2003; Grabovac et al., 2005; Ludwig, 2005; Ali e Lehmussaari, 2006; Bourges et al., 2006; Sandri et al., 2006). Esta última é obtida a partir da quitina, polissacarídeo biodegradável e não tóxico encontrado em exoesqueleto de de vários animais (Alpar e Groves, 2006). A quitosana apresenta características biofarmacêuticas interessantes como a biocompatibilidade com boa tolerância ocular e

Introdução

capacidade de adesão na mucosa baseado na interação iônica de ambas (Lerh et al., 1992; Henriksen et al., 1996; Felt et al., 1999). Devido às essas e outras propriedades favoráveis, o interesse da quitosana em sistemas de liberação prolongada de fármacos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos.

Com a utilização de sistemas de liberação de fármacos, o tratamento e o sucesso da terapêutica ocular não depende da adesão dos pacientes. Já na medicina veterinária, independem da cooperação dos animais e da disponibilidade de tempo dos proprietários. Nesse contexto, justifica-se o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de fármacos inovadores objetivando, principalmente, a manutenção da concentração dos fármacos nos tecidos oculares, redução da absorção sistêmica propiciando comodidade para os pacientes e proprietários de animais de companhia em tratamento de enfermidades oftálmicas.

Neste trabalho foram desenvolvidos implantes mucoconjuntivais de quitosana e maleato de timolol (MT), beta-bloqueador largamente utilizado para prevenção e tratamento do glaucoma. Posteriormente, foram produzidos implantes com ofloxacino, fluoroquinolona de segunda geração amplamente utilizado em infecções oculares externas. Ambos foram avaliados *in vivo* em relação à eficácia, toxicidade e o tempo de liberação máximo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomo-fisiologia ocular

O olho ou bulbo ocular é um complexo órgão do sentido, que consiste basicamente de uma extensão do cérebro, responsável pela captação da luz que reflete dos objetos, portanto, diretamente responsável pela visão. Evoluíram de pontos fotossensíveis primitivos na superfície de invertebrados e, em algumas espécies, desenvolveram muitas variações notáveis, proporcionando vantagens especiais a diversos nichos ecológicos. De modo geral, cada bulbo ocular tem uma camada de receptores, um sistema de lente para focalizar uma imagem nesses receptores e um sistema de axônios para transmitir os potenciais de ação para o cérebro (Dyce et al., 1997).

Além do bulbo ocular existem vários anexos, estruturas acessórias como os músculos oculares que movem o bulbo do olho, as pálpebras que protegem e o aparelho lacrimal que mantém úmida suas partes expostas. A maioria destas estruturas é mantida na órbita, onde o bulbo do olho fica envolto em grandes quantidades de gordura. As pálpebras emergem das margens ósseas da órbita e são intermitentemente dirigidas sobre a parte exposta do bulbo ocular, objetivando a distribuição das lágrimas (Samuelson, 2007).

A órbita é um compartimento ósseo formado por várias partes de ossos do crânio, como o frontal, maxilar, zigomático, esfenóide, etmóide, lacrimal e palatino que tem a função de proteger o bulbo ocular e seus anexos. Possui vários forames por onde passam vasos sanguíneos e nervos que estão diretamente relacionados com o mesmo. Estes forames diferem em tamanho e formato em diversos crânios, entretanto, permanece na mesma posição relativa (Samuelson, 2007).

Anatomicamente, o bulbo ocular dos mamíferos domésticos é quase esférico com alguma compressão ântero-posterior. É formado por três camadas delgadas ou túnicas concêntricas, ou seja, os tecidos que se sobrepõem em torno de um ponto central estando em rigorosa aposição. São conhecidas como túnica fibrosa ou externa, túnica vascular ou média e túnica nervosa ou interna. Além disso, o bulbo do olho é formado por

Revisão de literatura

dois segmentos, anterior e posterior e três câmaras, a saber: câmara anterior, posterior e câmara vítrea (Samuelson, 2007) (**Figura 01**).

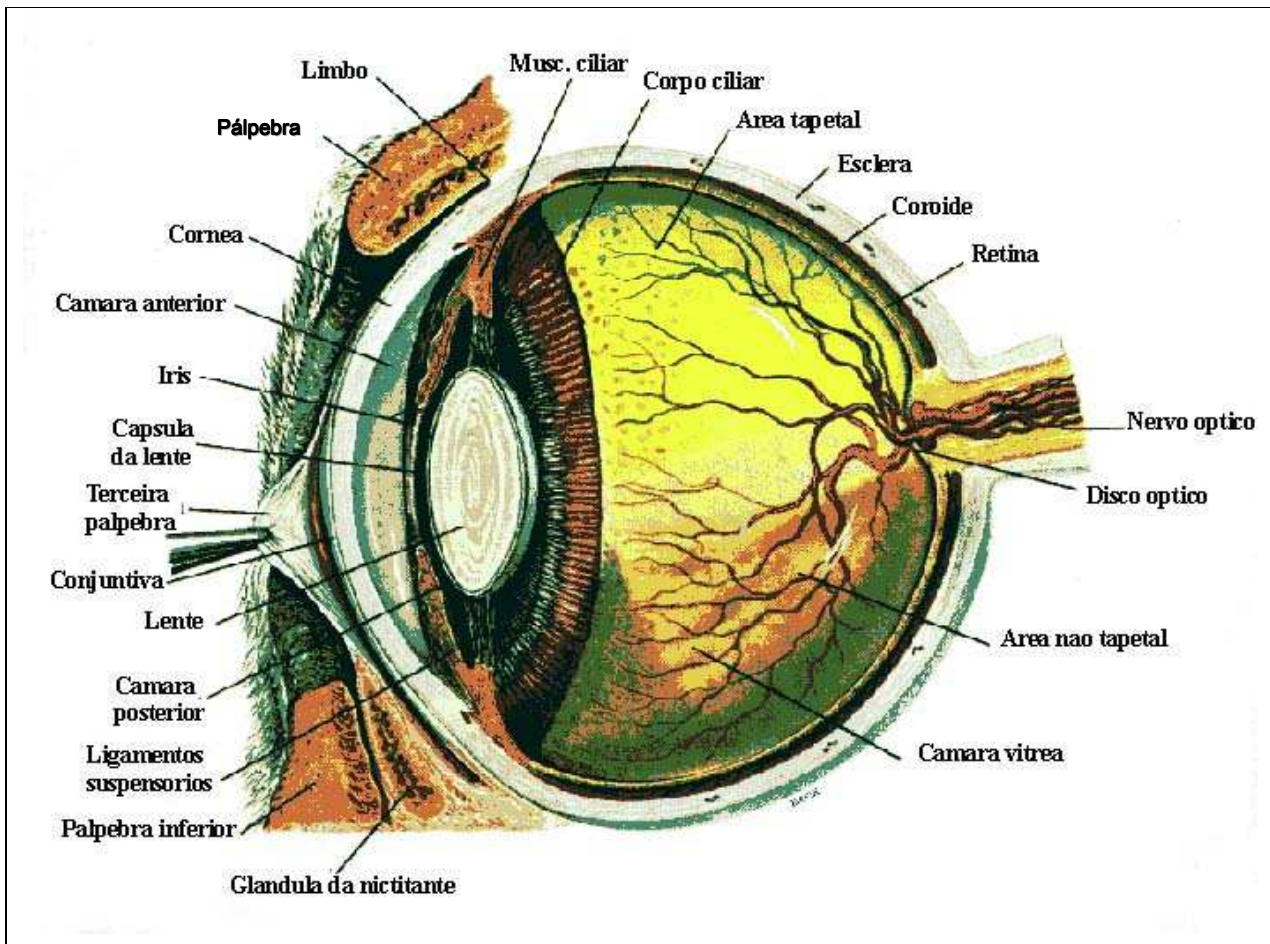


Figura 01. Corte sagital do bulbo ocular e seus anexos na espécie humana.
Fonte: Adaptação Slatter (2007, p.2)

2.1.1 Pálpebras e a conjuntiva

As pálpebras são duas pregas musculofibrosas, das quais a superior é mais extensa e móvel. As margens livres unem-se nos ângulos medial e lateral do bulbo do olho e limitam uma abertura conhecida como rima palpebral (Dyce et al., 1997). Anatomicamente, as pálpebras podem ser divididas em quatro camadas: mais externamente a pele; seguida da camada fibromuscular formada de músculos estriados e lisos, pela placa tarsa ou

Revisão de literatura

tarso, estrutura de tecido conjuntivo denso que molda a pálpebra superior contendo glândulas tarsais ou meibomianas e, por último, pela conjuntiva palpebral mais internamente (**Figura 02**). As glândulas tarsais concentram-se na pálpebra superior, sendo encontradas também, mas em quantidade menor, na pálpebra inferior, que não contem cílios nos cães ao contrário do que ocorre na pálpebra superior. A pele da pálpebra é uma das mais finas e delicadas do corpo e coberta por pêlos curtos; também pode conter alguns pêlos táteis. Apresenta grande concentração de mastócitos, razão pela qual responde facilmente com inflamação e, conseqüente, edema a injúria (Gum et al., 2007).

As funções básicas das pálpebras são as de proteger o bulbo ocular de agressões externas, regular a quantidade de luz que adentra ao bulbo do olho pela contração das pálpebras e, conseqüente, redução rima palpebral, remover corpos estranhos para o corpo medial do olho, homogeneizar o filme lacrimal sobre a córnea e facilitar a drenagem da lagrima pelo aparelho lacrimal (Gum et al., 2007). Como já mencionado anteriormente, a placa tarsal contem as glândulas tarsais que são responsáveis pela secreção do filme lipídico da lagrima. Associados aos cílios existem outros dois tipos de glândulas: as glândulas de Zeis e de Moll; as primeiras secretam uma secreção sebácea modificada, as ultimas são glândulas sudoríparas também modificadas (Dyce et al., 1997).

A superfície posterior da pálpebra é revestida de conjuntiva, uma membrana mucosa fina e transparente. A conjuntiva palpebral é refletida na base das pálpebras, para continuar sobre a esclerótica como a conjuntiva bulbar que termina no limbo, embora o epitélio continue-se com o epitélio anterior da córnea. O espaço potencial entre as pálpebras e o bulbo do olho é conhecido como saco conjuntival, cuja extremidade dorsal e ventral é o fórnice. Uma discreta elevação da mucosa, a carúncula lacrimal, situa-se no ângulo medial do bulbo do olho (Dyce et al., 1997).

Entre a carúncula lacrimal e o bulbo do olho, há uma prega conjuntival orientada dorsoventralmente no fundo do saco conjuntival, conhecida como terceira pálpebra ou membrana nictitante. É sustentada por uma porção de cartilagem em forma de "T", cuja barra, localiza-se na margem livre da prega e cuja haste se orienta em sentido inverso

Revisão de literatura

para a órbita, medial ao bulbo do olho. Ao contrário de uma pálpebra verdadeira, é recoberta por conjuntiva nas duas faces: palpebral (anterior) e bulbar (posterior) e invisível quando o olho está fechado (Samuelson 2007). A haste da cartilagem é circundada por uma glândula lacrimal acessória, a glândula da terceira pálpebra ou glândula da nictitante, que produz cerca de 30 a 50% do filme aquoso da lagrima (Giuliano e Moore, 2007).

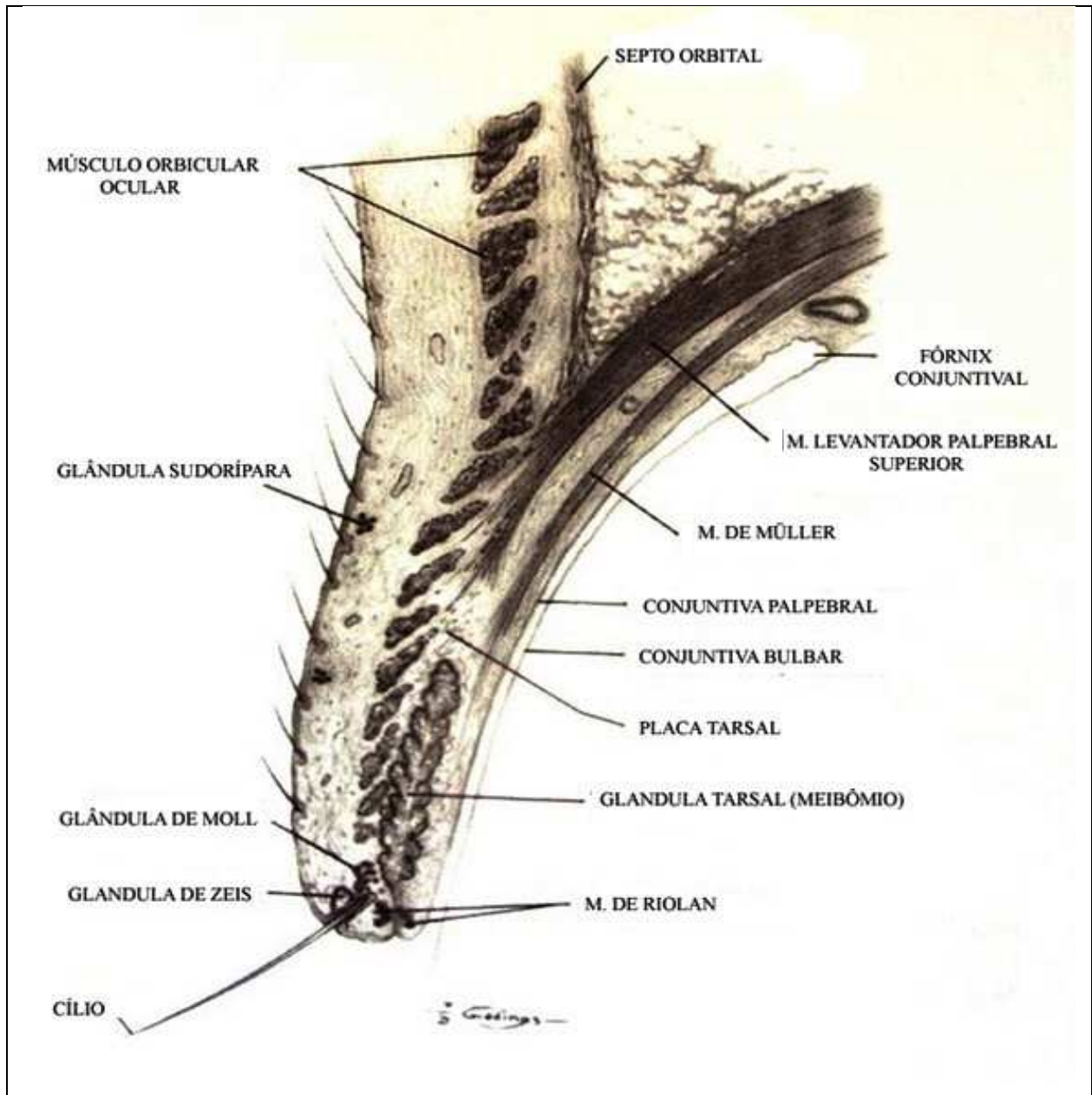


Figura 02. Desenho esquemático das pálpebras superior e inferior.
Fonte: Adaptação Slatter (2007, p.159)

2.1.2 Túnica fibrosa: córnea e esclerótica

A túnica fibrosa é composta de tecido colágeno muito denso que, resistindo à pressão interna, confere forma e firmeza ao bulbo ocular. Além disso, representa a camada mais externa do bulbo ocular com função importante na proteção do mesmo. É a única túnica completa e constituída pela córnea e esclerótica que se encontra em uma linha enegrecida, o limbo (Dyce et al., 1997).

A esclerótica é a parte posterior opaca da túnica fibrosa. Consiste em uma densa rede de fibras colágenas e elásticas e geralmente tem coloração branca embora com tom azulado. Ventral ao pólo posterior apresenta uma pequena área cribriforme, por onde passam as fibras do nervo óptico. Este nervo é rodeado por uma bainha de tecido conjuntivo que prolonga a dura-máter até a esclerótica (Samuelson, 2007). Esta última também é perfurada por várias pequenas artérias ciliares, nervos e por veias vorticosas maiores (Van Buskirk, 1979). A esclerótica confere fixação aos tendões dos músculos oculares, anterior ao equador. Posteriormente, com exceção das áreas abrangidas pelo músculo retrator do bulbo ocular, é recoberta por uma membrana delgada, que a separa da gordura retrobulbar, fornecendo uma cavidade onde o bulbo do olho pode se movimentar (Samuelson, 2007).

Localizada na porção anterior, a córnea constitui cerca de um quinto da túnica fibrosa do bulbo ocular. É formada por cinco camadas sendo a mais externa o epitélio, membrana basal, estroma, membrana de Descemet e a mais interna, o endotélio (Dyce et al., 1997) (**Figura 03**). A transparência da córnea não é somente um fenômeno estrutural, mas também fisiológico e depende de um bombeamento contínuo de líquidos intersticiais, um processo localizado no epitélio posterior. Além disso, não possui vasos sanguíneos e as fibras nervosas são desprovidas de mielina. Seus nutrientes difundem na substância própria a partir de vasos no limbo ou são transportados a superfície pelo líquido lacrimal e pelo humor aquoso (Ofri, 2007). A superfície da córnea é muito sensível devido à presença de terminações nervosas livres próximas ao epitélio anterior. Estas terminações emergem dos nervos ciliares longos, ramos do nervo oftálmico (Shively e Epling, 1970). A

Revisão de literatura

córnea contém as estruturas intraoculares e exerce importante função na refração e transmissão da luz (Samuelson, 2007).

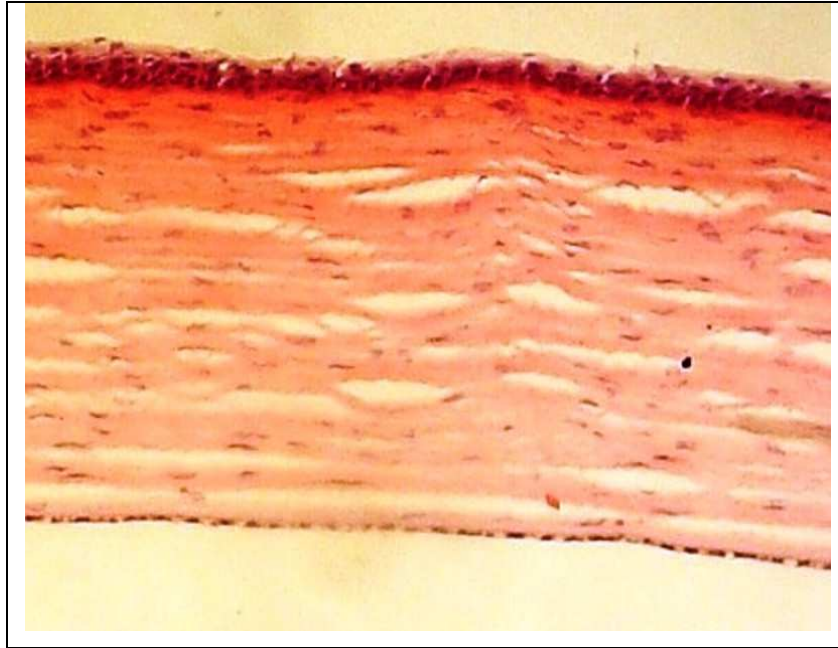


Figura 03. Fotomicrografia da córnea do coelho. HE 50x

2.1.3 Túnica vascular: úvea

A túnica vascular do bulbo ocular, também conhecida como úvea, situa-se profundamente à esclerótica, à qual se fixa. Consiste em três camadas: coróide, corpo ciliar e íris, citados em seqüência pósterio-anterior. Embora a irrigação seja a sua função principal, a túnica vascular suspende a lente, regula sua curvatura e ajusta o tamanho pupilar por meio da musculatura lisa no corpo ciliar e na íris (Samuelson, 2007).

A coróide contém uma densa rede de vasos sanguíneos embutida em tecido conjuntivo intensamente pigmentado (**Figura 04**). Esta rede é irrigada pelas artérias ciliares posteriores e drenadas pelas veias vorticosas (Auker et al., 1982). Na parte dorsal do fundo, a coróide forma uma área levemente refletora, de coloração variada conhecida

Revisão de literatura

como tapete lúcido. Este tapete é responsável pela reflexão da luz ao olharem em direção a luz no escuro quando, por exemplo, da aproximação de um carro. Esta estrutura é uma adaptação a vida noturna, pois reflete a luz incidente, potencializando o estímulo de células receptoras sensíveis a luz na retina, facilitando a visão em ambientes escuros. A coloração do tapete varia entre as espécies até mesmo dentre as raças podendo apresentar do verde ao amarelo-ouro e ao avermelhado como tonalidade verde-azulada (Ollivier et al., 2004). A coróide adere tão estreitamente à camada externa pigmentada da retina que esta permanece quando a parte principal da retina é removida durante a dissecação. Dentre as principais funções da coróide estão regulação térmica, imunologia do bulbo do olho, nutrir a retina e remover os seus catabólicos (Auker et al., 1982).

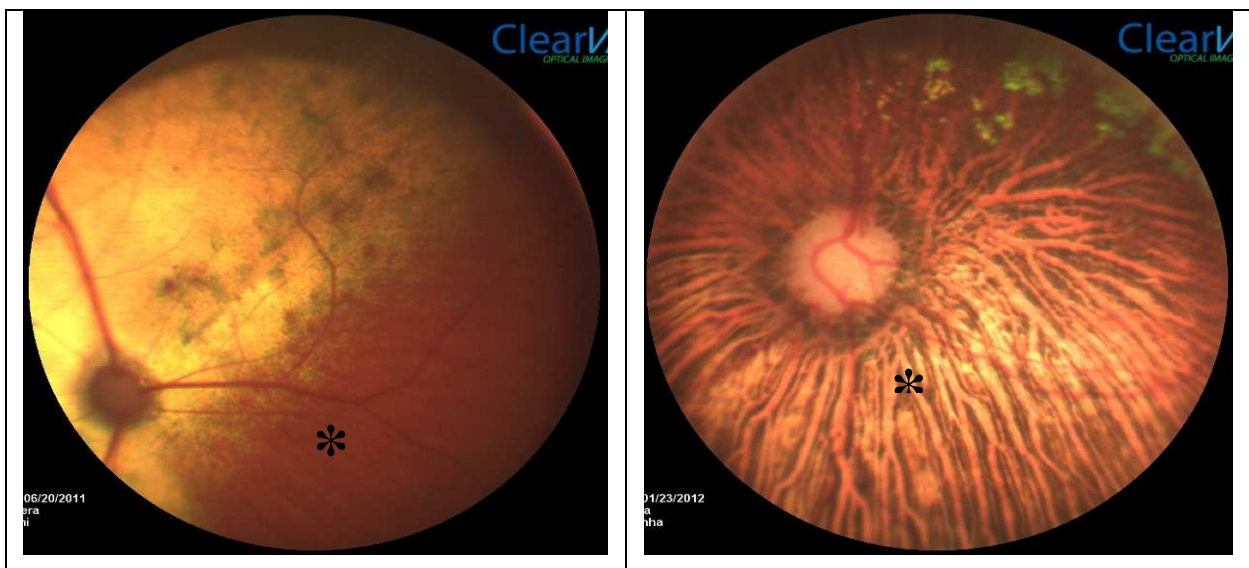


Figura 04. Fotografia da retina de gato e cão onde não há pigmento no epitélio pigmentar da retina possibilitando a visualização dos vasos da coróide (asterisco), respectivamente.

Aproximadamente à meia distância entre o equador e o limbo, a coróide se espessa para formar o corpo ciliar. Esse é um anel em relevo com cristas irradiando-se em direção ao cristalino no centro; anteriormente, o anel continua-se com a íris. O corpo ciliar é mais bem compreendido quando observado em sua totalidade, examinando-se por detrás a parte anterior do bulbo ocular. As cristas radiais, conhecidas como processos ciliares

Revisão de literatura

emitem fibras zonulares para o equador da lente, suspendendo-a ao redor da periferia (Dyce et al., 1997). Entre o corpo ciliar e a esclerótica localiza-se o músculo ciliar liso que atua na acomodação, ou seja, capacidade de focar objetos. Além da acomodação, o corpo ciliar é responsável pela produção do humor aquoso (Samuelson, 2007).

Suspensa entre a córnea e o cristalino localiza-se a menor estrutura da túnica vascular, a íris. Constitui um anel plano de tecido ligado em sua periferia à esclerótica e ao corpo ciliar. A íris divide o espaço entre a lente e a córnea em câmara anterior e posterior, que se comunicam através da pupila. Ambas são preenchidas pelo humor aquoso. A abertura formada no centro da íris é a pupila e permite que a luz alcance o segmento posterior do olho (Dyce et al., 1997). O tamanho da pupila e, conseqüentemente, a quantidade de luz que atinge a retina são regulados pelos músculos lisos esfíncter e dilatador da íris. Histologicamente pode ser dividida em três porções: epitélio anterior, estroma adjacente e camada posterior de epitélio pigmentado (Shively e Epling, 1970). A cor da íris determina a “cor do olho” e está diretamente relacionado com o número de células pigmentadas presentes em seu estroma e no tipo de pigmento nas células (Gum et al., 2007).

2.1.4 Túnica nervosa: retina

A túnica interna ou nervosa do bulbo do olho contém células fotossensíveis e é conhecida como retina. Possui dez camadas e constitui um prolongamento do encéfalo, ao qual permanece ligada ao nervo óptico (Samuelson, 2007). Apenas os dois terços posteriores da retina podem ser atingidos pela luz que adentra através da pupila. Conseqüentemente, apenas esta porção é guarnecida de células receptoras. O terço restante é “cego” sendo representado por uma fina camada pigmentada que se prolonga até o corpo ciliar. A borda formada pela repentina diminuição na espessura da junção das partes ópticas é a *ora serrata* (Dyce et al., 1997).

A parte posterior da retina, ou a porção desde o disco óptico (DO) até a ora ciliar da retina representa a porção nervosa. Na porção óptica das retinas, as camadas são as seguintes, começando na coróide: camada única de células pigmentadas ou epitélio pigmentar da

Revisão de literatura

retina (EPR), camada neuroepitelial contendo células receptoras (bastonetes e cones), camada de células ganglionares (CG) bipolares e camada de CG multipolares (**Figura 05**). Os axônios amielínicos da camada de CG multipolares passam para o DO para formar o nervo óptico (Rapaport e Stone, 1984). O DO dos animais doméstico é diferente podendo ser redonda, oval, triangular e até quadrangular (**Figura 06**). A coloração também varia bastante como muitos padrões normais dentro da mesma espécie, como ocorre no caso dos cães (**Figura 07**) (Dyce et al., 1997).

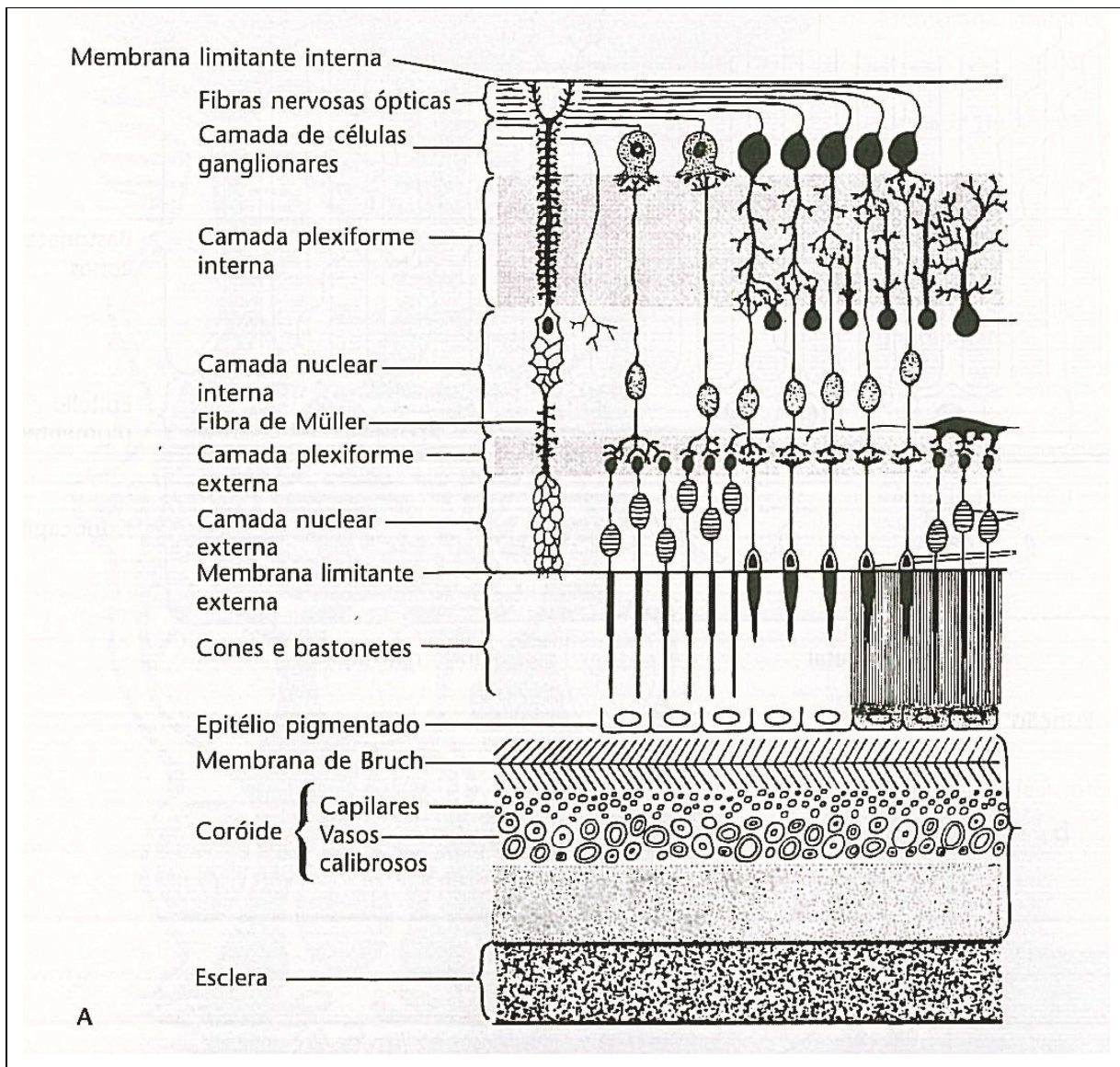


Figura 05. Representação esquemática das camadas da retina de cão.
Fonte: Adaptação Slatter (2007, p.453)

Revisão de literatura

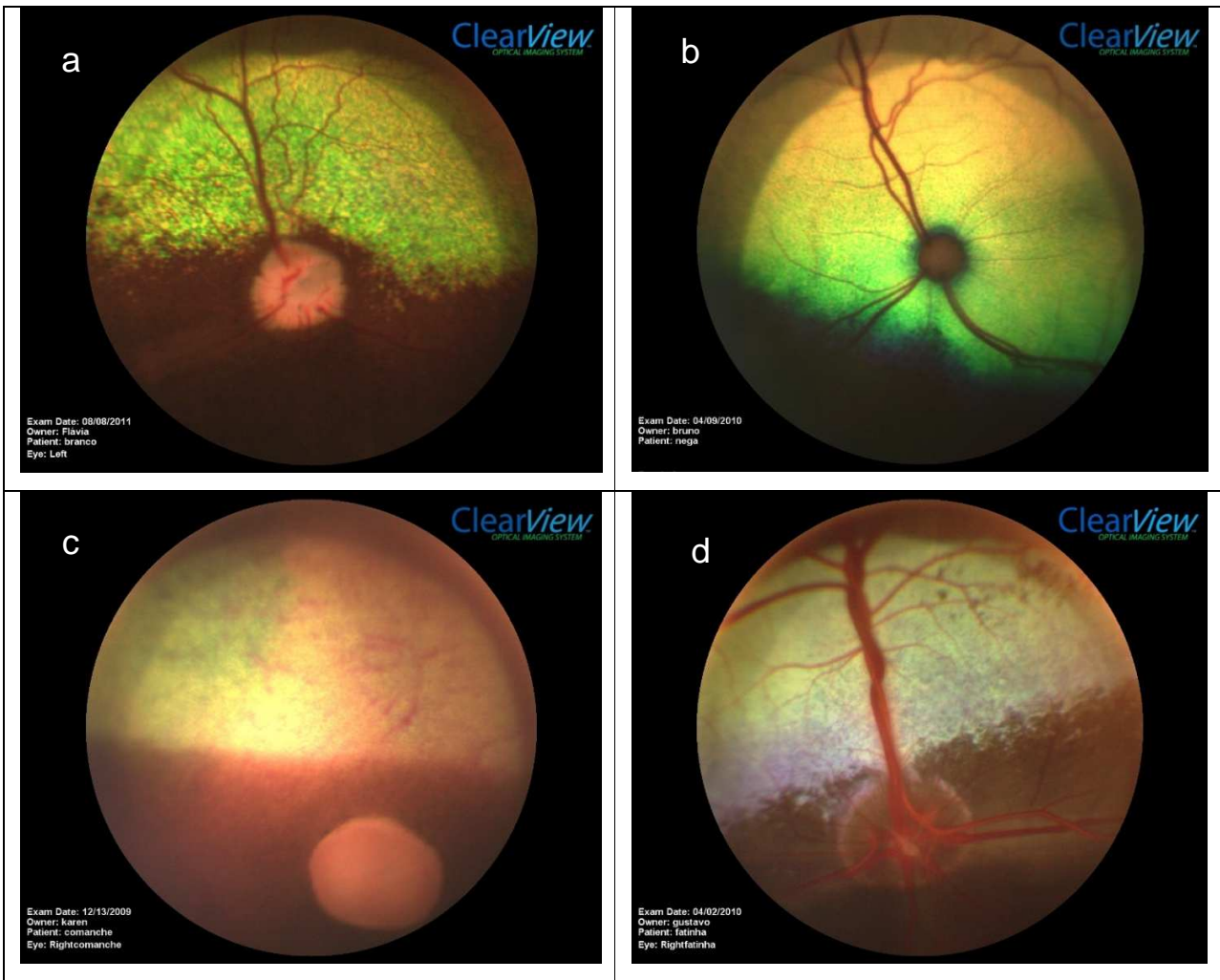


Figura 06. Fotografia de retina e disco óptico da espécie canina (a), felina (b), equina (c) e bovina (d).

Revisão de literatura

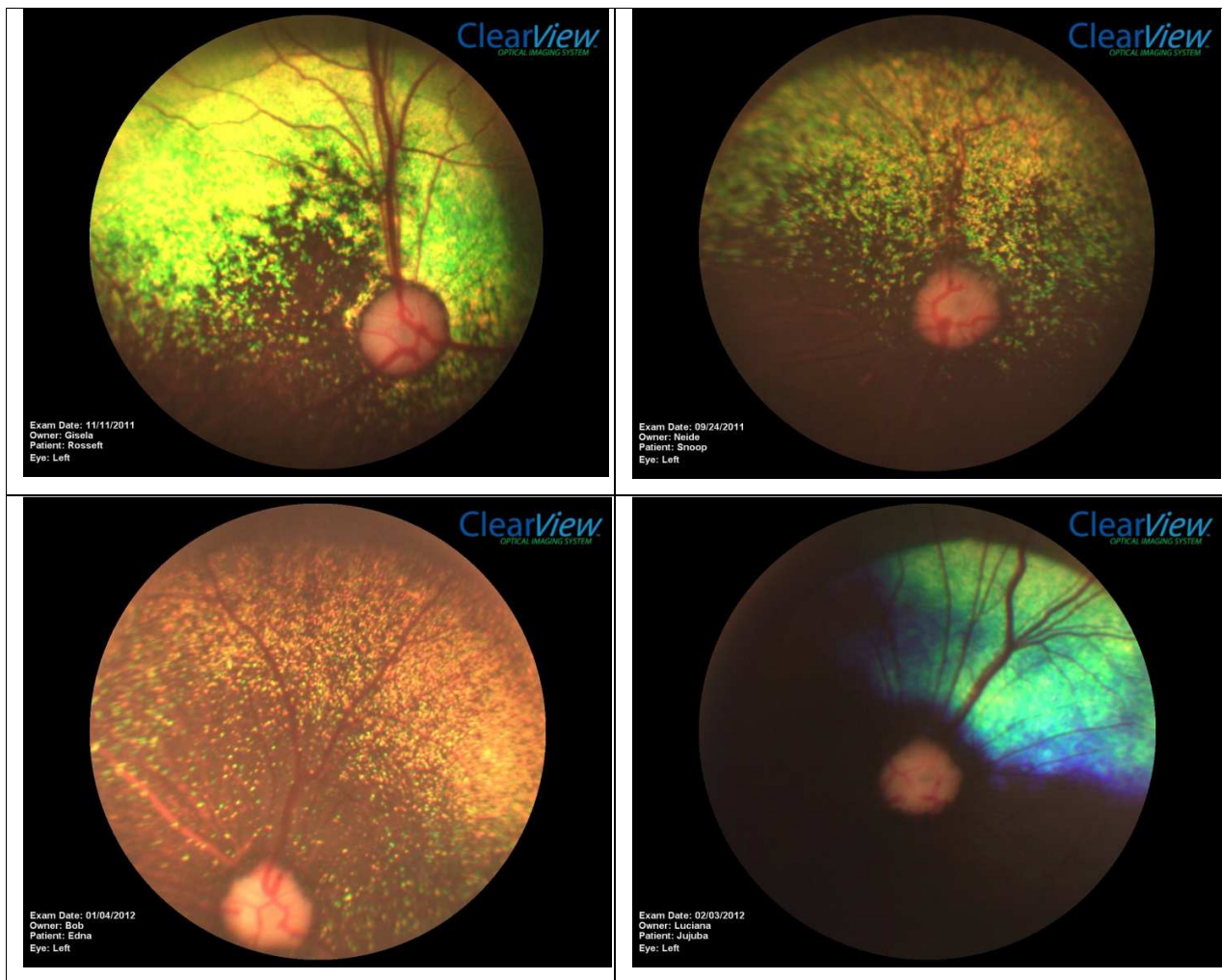


Figura 07. Fotografia de retina com variações normais da espécie canina.

2.1.5 Meio de refração do bulbo do olho

Os raios luminosos que adentram no bulbo do olho passam por estruturas e meios diferentes capazes de alterar sua direção. Neste contexto, podemos citar a córnea, humor aquoso, cristalino, e humor vítreo (Gum et al., 2007). A córnea é uma estrutura densa, resistente e, ao mesmo tempo transparente considerada o primeiro meio de refração do bulbo do olho. Desempenha um importante papel na refração da luz, ou seja, é capaz, como o cristalino, de curvar o feixe de luz para focalizá-lo na retina (Ofri, 2007).

Revisão de literatura

Em seguida, os raios encontram o humor aquoso preenchendo o espaço entre a córnea e a lente. O humor aquoso é um líquido transparente formado por 98% de água, cloreto de sódio, albumina e outros, continuamente produzido pelas células dos processos ciliares. Adentra na câmara posterior, de onde passa pela pupila para a câmara anterior e, deste ponto, através dos espaços no ligamento pectíneo no ângulo iridocorneal. Esses espaços o transportam para os seios venosos e a esclerótica e, conseqüentemente, para a corrente sanguínea (Gum et al., 2007). Além das suas propriedades de refração, desempenha um importante papel de na manutenção da pressão intraocular (PIO) e remoção de metabólicos de tecidos adjacentes. Em condições normais, a velocidade de produção do humor aquoso à de drenagem, mantendo uma pressão constante. Deficiência na drenagem permite o acúmulo excessivo de líquido provocando o aumento da PIO comprometendo a irrigação da retina causando a morte das CG da retina. Esta oftalmopatia degenerativa é conhecida como glaucoma (Gelatt et al., 2007).

O cristalino ou lente, ao contrário dos líquidos adjacentes, é uma estrutura sólida, entretanto, suficientemente elástica para mudar a forma. É uma lente biconvexa onde a superfície posterior é mais convexa que a anterior. Possui um pólo anterior e posterior, um equador e um eixo central que coincide com o eixo óptico do olho. A cápsula externa é mais espessa anteriormente e espessa-se ao máximo no equador, onde as fibras zonulares do corpo ciliar se fixam (Dyce et al., 1997). O cristalino é formado por fibras dispostas regularmente e de tal forma que fazem uma laçada de um ponto na superfície anterior até outro na superfície posterior. Na parte periférica ou cortical da lente, as fibras são relativamente mais macias, entretanto mãos firmes em direção ao centro onde formam um núcleo mais compacto (Daniel et al., 1984). Devido as suas propriedades elásticas, o córtex pode ser moldado alterando o formato da lente durante a acomodação. Defini-se por acomodação a mudança repentina do cristalino objetivando trazer a imagem dos objetos em diferentes distâncias em foco na retina (Wang e Ciuffreda, 2004). Quando um animal quer focalizar um objeto próximo, músculo ciliar contrai-se, espessando-o. Isto desloca os processos em direção ao cristalino relaxando as fibras zonulares. A lente, livre de tensão no equador, arredonda-se colocando o objeto em questão em foco (**Figura 08**). Em comparação com os humanos, o músculo ciliar e, portanto, a capacidade de acomodar-se é pouco desenvolvida nos animais domésticos (Ofri, 2007).

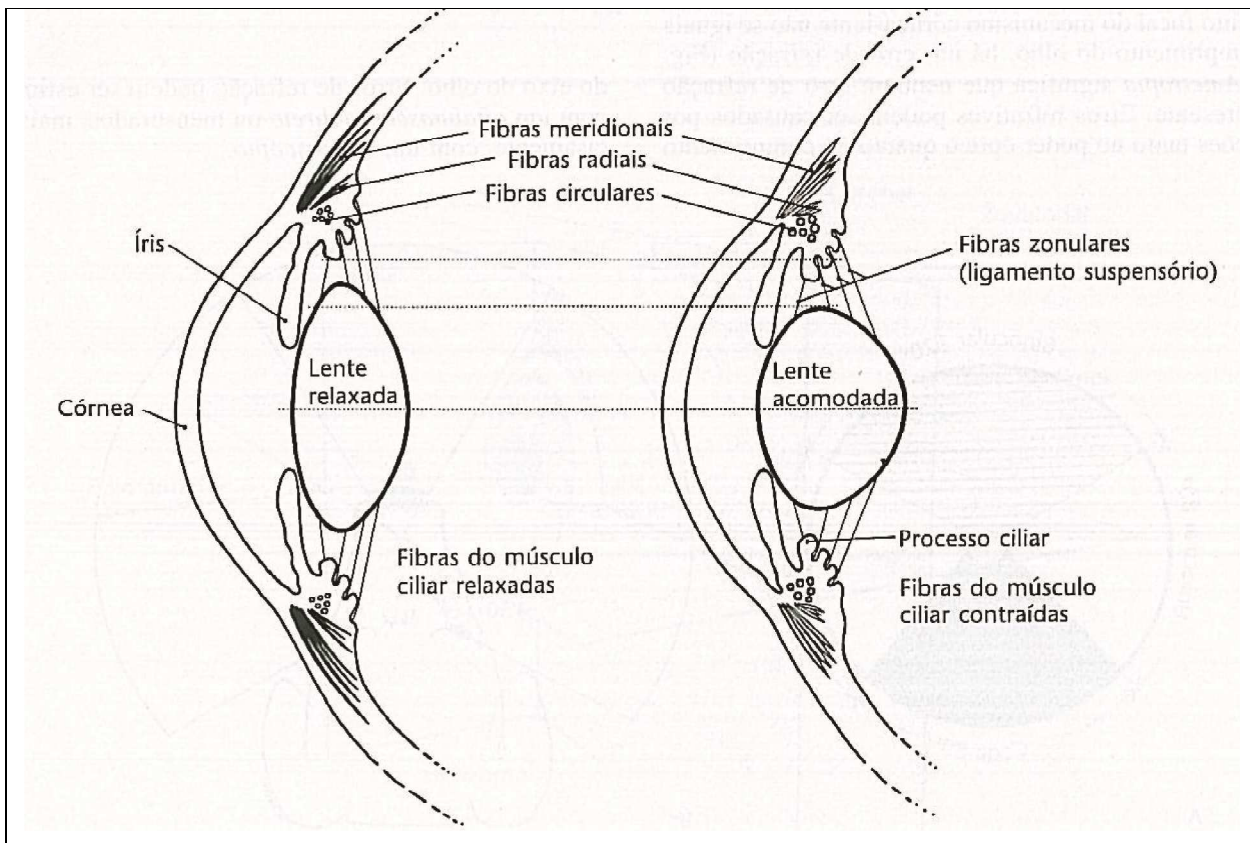


Figura 08. Representação esquemática da acomodação visual necessária para focar objetos próximos ao observador.

Fonte: Adaptação Slatter (2007, p.5)

Ao passar pelo cristalino, os raios de luz adentram ao corpo vítreo. Esse consiste em uma massa gelatinosa constituída principalmente de água, ácido hialurônico e fibrilas de colágeno semelhante àquela da cartilagem articular. O corpo vítreo fornece suporte físico ao cristalino e mantém a retina ao encontro da coróide (Gum et al., 2007). Como não existem barreiras entre os humores aquoso e vítreo ou entre o último e a retina, gradientes de nutrição e produtos de excreção circulam livremente. Portanto, alterações físico-químicas no humor vítreo podem constituir causa de luxação de cristalino e descolamento de retina (Hendrix et al., 1993) (**Figura 09**). No embrião, a lente é nutrida pela artéria hialóide, um ramo da artéria central da retina que passa através do corpo vítreo. A artéria degenera após o nascimento e o cristalino é nutrido por difusão. Ao

Revisão de literatura

contrário do humor aquoso, o humor vítreo não é constantemente reposto mantendo o volume constante (Samuelson, 2007).

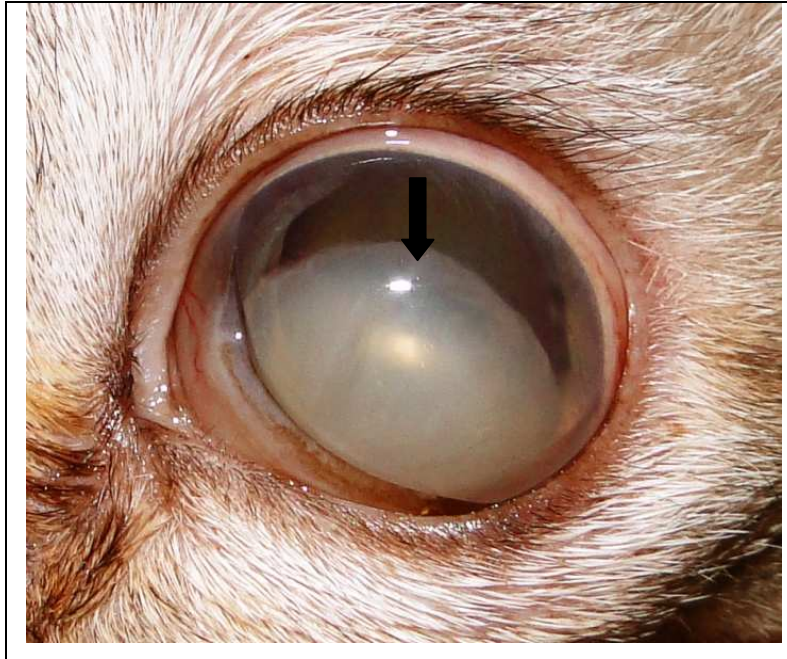


Figura 09. Fotografia de olho de gato com luxação anterior do cristalino (seta).

2.1.6 Aparelho lacrimal

Consiste em uma parte secretora, a glândulas lacrimais (glândula lacrimal orbitária ou principal, glândula da terceira pálpebra e pequenas glândulas lacrimais acessórias), seus ductos, o lago lacrimal e o ducto nasolacrimal. A localização da glândula lacrimal orbitária é dorso-lateral ao bulbo do olho, cujo tamanho, varia entre as espécies domésticas. É responsável pela produção da maior parte da lágrima e possuem alguns ductulos excretorios que se esvaziam no fórnice dorsal (Dyce et al., 1997). A glândula nictitante ou da terceira pálpebra pode produzir até 50% da totalidade da lágrima, cujos ductos, se abrem no fórnice ventral da conjuntiva (Giuliano e Moore, 2007).

Revisão de literatura

Movimentos de piscar distribuem o líquido lacrimal sobre a superfície do bulbo ocular mantendo-a úmida. Dentre as funções da lágrima podemos citar remoção de substâncias e supre a córnea com nutrientes. O líquido acumula-se ventralmente no ângulo medial do olho, na fossa lacrimal, ou seja, na depressão rasa que circunda a carúncula lacrimal, antes de ser removido por ação capilar para o sistema de ductos, através dos pontos lacrimais (**Figura 10**). As lágrimas escorrem pela face apenas quando produzido em quantidade excessiva, ou quando a drenagem encontra-se diminuída, recebendo o nome de lacrimejamento e epífora, respectivamente (Gum et al., 2007) (**Figura 11**).

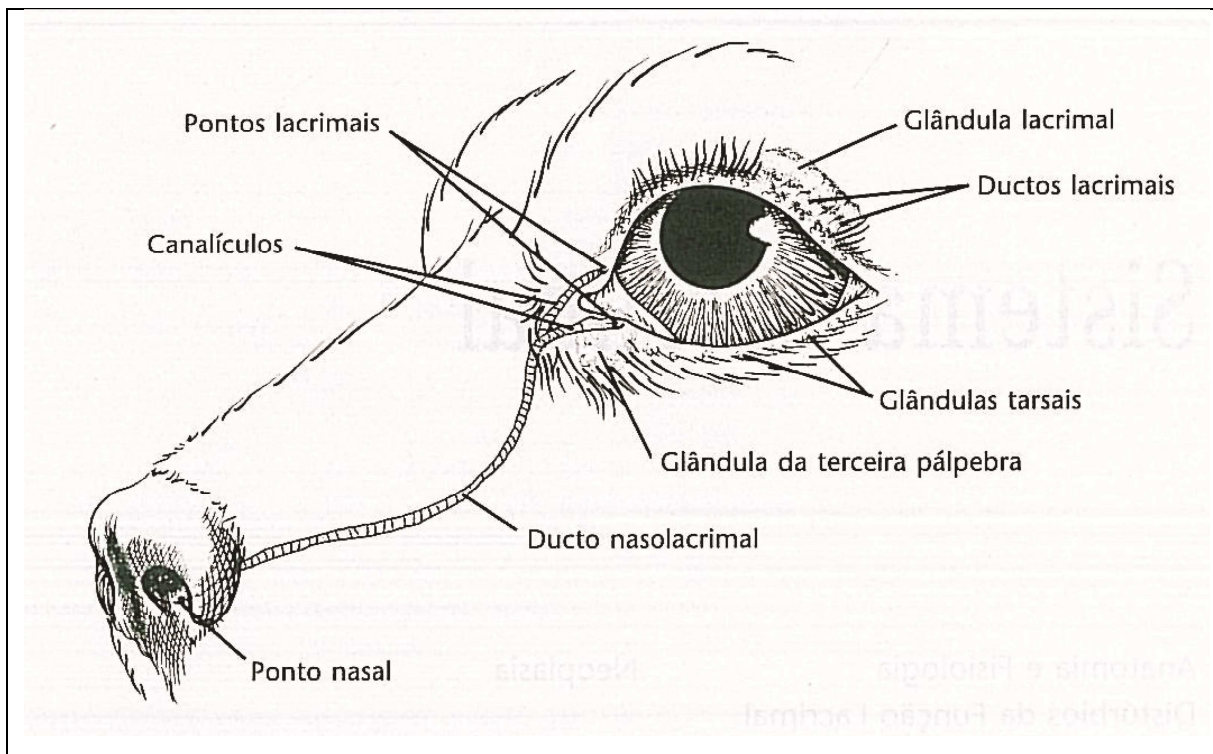


Figura 10. Representação esquemática do aparelho lacrimal.
Fonte: Adaptado Slatter (2007, p.260)



Figura 11. Fotografia de cão com epífora causada pela obstrução do canal nasolacrimal do lado direito evidenciado pela ausência do corante de fluoresceína na narina ipsi-lateral (Teste de Jones negativo).

Os pontos lacrimais são aberturas minúsculas, uma na borda de cada pálpebra, próximos a carúncula. Cada ponto leva a um canalículo curto e estreito, através do qual o líquido segue até o ducto nasolacrimal. O início deste ducto é levemente dilatado, formando o saco lacrimal, que ocupa uma fossa afunilada junto à margem óssea da órbita. Estende-se rostralmente, primeiro na parede da maxila, em seguida sobre uma superfície interna onde é revestido por mucosa nasal. Em algumas espécies, o ducto nasolacrimal termina na narina e, em outras, mais profundamente, na cavidade nasal (Dyce et al., 1997).

A película lacrimal que banha o bulbo do olho é constituída de três camadas. A mais externa ou lipídica origina-se da secreção das glândulas tarsais que auxiliam na distribuição da lágrima de maneira uniforme e retarda a dissolução da película. A espessa camada aquosa média é derivada das glândulas lacrimais que exercem a função de umedecer e nutrir a córnea. A camada mucilaginosa mais interna é produzida pelas

Revisão de literatura

células caliciformes na conjuntiva mantendo a película lacrimal junto à córnea. O fluxo lacrimal sobre influência dos fármacos e pode ser aumentado reflexamente pelo estímulo da conjuntiva, córnea e narina. O choro como manifestação emotiva restringe a espécie humana (Davison e Kuonen, 2004).

2.1.7 Barreiras hematooculares

As barreiras hematooculares (BHO) contêm junções endoteliais e epiteliais serradas, ou seja, formada pela por vasos e células justapostos, que impedem o movimento moléculas de baixa massa molecular e grande maioria das proteínas. A complexidade destas estruturas varia em relação aos diferentes endotélios vasculares que permitem o livre movimento de algumas substâncias entre os compartimentos (Gum et al., 2007). Existem duas barreiras importantes dentro do bulbo do olho, barreira hemoretiniana (BHR) e barreira hematoaquosa (BHA); outras barreiras secundárias, como o epitélio da córnea e endotélio de vasos sanguíneos da íris exercem alguma resistência a entrada de substâncias incluindo moléculas de diversos fármacos (Bellhorn, 1981).

A porção endotelial da BHR é constituída pelo endotélio dos capilares da retina. Apresenta junções serradas e são do tipo não fenestrado, portanto, impede a entrada e saída de substâncias. Já a porção epitelial desta barreira é formada pelo EPR e é responsável pela separação do fluido da coróide e da retina (Gum et al., 2007). O ponto mais permeável da BHR é o DO por onde substâncias da coróide passam através do nervo óptico para a retina (Rodríguez-Peralta, 1975). Os coriocapilares são permeáveis e permitem a passagem de moléculas de baixa massa molecular. Assim, nutrientes presentes nos vasos da coróide prontamente atravessam o EPR onde existem mecanismos passivos que o levam as camadas mais internas da retina (Gum et al., 2007).

Dentre as funções da BHR incluem regular a entrada de leucócitos, de nutrientes e outras moléculas provenientes da circulação sanguínea a fim de preservar a homeostasia da retina. Mecanismos de transferência através destas barreiras são controlados por

Revisão de literatura

processos passivos por difusão aquosa da retina para o vítreo. Entretanto, a passagem de oxigênio e substâncias lipídicas da retina para os vasos retinianos se dá por transporte ativo (Gum et al., 2007). A ruptura da BHR pode ocorrer durante intervenção cirúrgica ou em patológicas. A vasodilatação decorrente desta quebra permite que células inflamatórias e sangue ganhem o espaço subretiniano provocando coriorretinite, hemorragia e descolamento de retina (Regnier et al., 1986) (**Figura 12**).

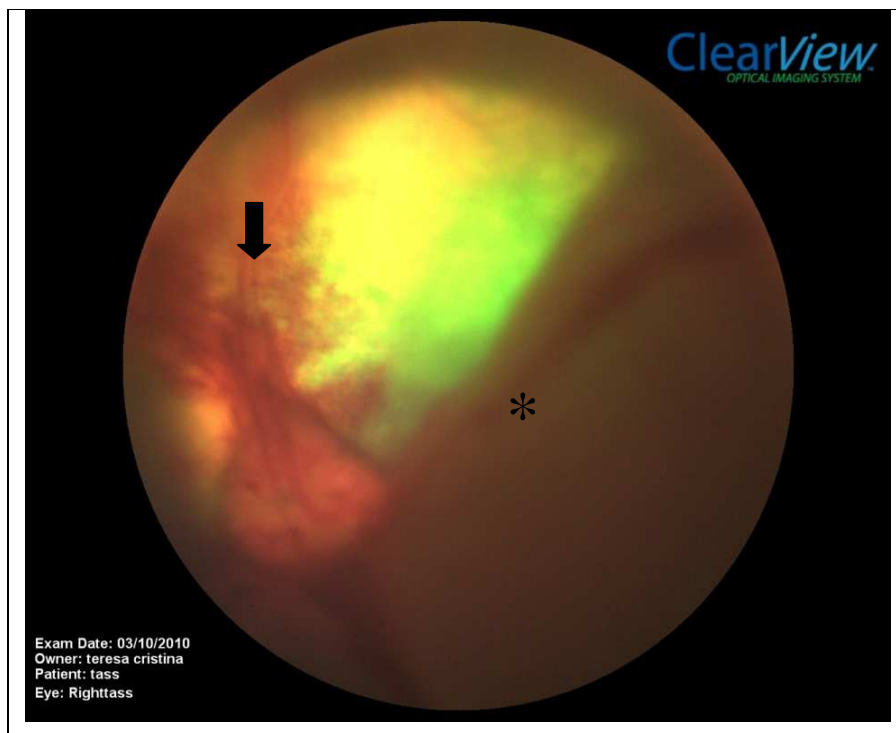


Figura 12. Fotografia da retina de cão com erliquiose. Notar coriorretinite, hemorragia (seta) e descolamento de retina (asterisco).

A BHA depende primariamente das junções serradas do epitélio não pigmentado do corpo ciliar que controla o fluxo de líquidos dentro da câmara anterior. Essa barreira não é eficiente como EPR, pois, as proteínas ganham o humor aquoso por pinocitose através de aberturas na úvea anterior. Já os vasos sanguíneos do corpo ciliar são fenestrados e exercem função similar aos coriocapilares permitindo alguma permeabilidade a proteínas

Revisão de literatura

de elevada massa molecular, portanto, grande parte dos constituintes do plasma pode adentrar ao estroma do corpo ciliar (Gum et al., 2007).

Nenhuma barreira está presente entre o humor aquoso e o vítreo, permitindo a difusão de solutos entre os mesmos como também entre a úvea anterior e a esclerótica (Freddo e Sacks-Wilner, 1989). A BHA permite a passagem de algumas substâncias presentes no humor aquoso para os tecidos adjacentes como também dentro da corrente sanguínea (Rodríguez-Peralta, 1975). Da mesma maneira, fármacos dissolvidos no humor aquoso podem facilmente difundir pela sua superfície porosa, porém, moléculas de elevada massa molecular não atravessam pelos seus vasos, porém, permeia entre as fenestrações dos capilares do corpo ciliar ganhando o humor aquoso (Hornof et al., 2005). A quebra da BHA pode ser diagnosticada clinicamente como uveíte anterior onde pode existir “flare” aquoso, ou seja, aumento de celularidade do humor aquoso, miose, presença de hifema ou hipópio dentre outros (Ward, et al., 1992; Fulgêncio et al., 2009) (Figura 13).

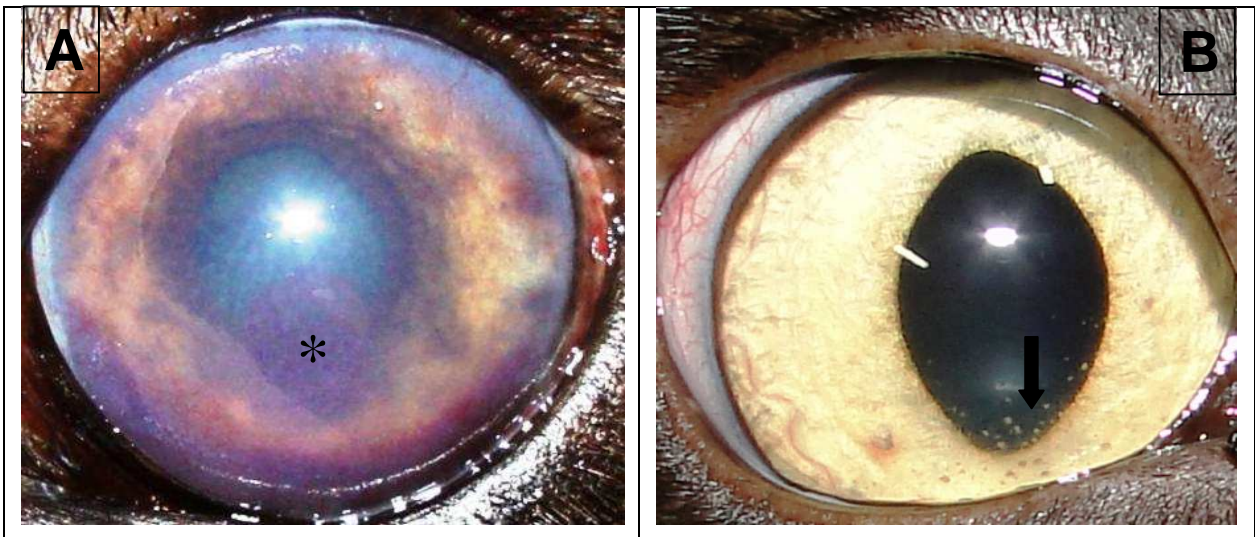


Figura 13. Fotografia de uveíte anterior em cão e gato. (A) Notar presença de sangue (hifema) (asterisco) em olho de cão tripanossomíase. (B) Notar “flare” aquoso e precipitados ceráticos (seta) em olho de gato com leucemia felina a vírus.

2.2 Glaucoma

Glaucoma é definido como uma neuropatia óptica multifatorial onde há degeneração das CG da retina e escavação do DO, provocando déficit visual, sendo o principal fator de risco o aumento da PIO, que pode até estar ausente. Ainda não existe consenso de como a elevada PIO provoca lesões nas CG da retina e DO (Ofri et al., 1994; Gelatt et al., 2003). De fato, em certas condições, estas mesmas lesões ocorrem com a PIO normal. Portanto, parecem existir outros fatores que contribuem para a degeneração das CG da retina. Alterações independentes da PIO, tais como aminoácidos excitotóxicos, defeitos na microcirculação do DO e anormalidades na matriz extracelular do mesmo, também podem contribuir para degeneração do nervo óptico dos animais domésticos e do homem (Gelatt et al., 2007).

Em relação aos animais de companhia, o glaucoma é mais frequente em cães que em gatos, não havendo predisposição sexual. De modo geral, acomete de 0,5% a 1% dos cães, mas em algumas raças, pode chegar a 5%. Nos felinos, a maioria dos casos é secundária a outras doenças oculares ou enfermidades sistêmicas (Gelatt et al., 2007). No homem, o glaucoma é um problema de saúde pública e uma das mais importantes causas de cegueira (Wilson e Martone, 1996). Acomete cerca de 65 milhões de pessoas no mundo sendo 4 milhões somente no Brasil constituindo a principal causa de cegueira irreversível. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a incidência de glaucoma é estimada em 2,4 milhões de novos casos por ano (WHO, 2012).

Uma ampla variedade de sinais é observada no paciente glaucomatoso. No início da doença, os olhos apresentam midríase discreta, congestão dos vasos episclerais e aumento da PIO, acompanhados por déficit visual importante e até cegueira (**Figura 14**). Se não tratado corretamente, o glaucoma se torna subagudo ou crônico, podendo desenvolver edema e vascularização corneanas, luxação do cristalino, pupila fixa em midríase, escavação do DO e buftalmia, dentre outros (**Figura 15**). Os sinais clínicos dependem do estágio da doença, tipo de glaucoma e da intensidade e duração do aumento da PIO (Gelatt et al., 2007; Ofri e Narfström, 2007).

Revisão de literatura



Figura 14. Fotografia de olho de cão com glaucoma agudo. Notar midríase moderada e hiperima conjuntival.



Figura 15. Fotografia de olho de cão com glaucoma crônico. Notar congestão dos vasos episclerais, edema de córnea e midríase.

Revisão de literatura

Tonometria, gonioscopia e oftalmoscopia são os três procedimentos principais para o diagnóstico e manejo clínico dos pacientes com glaucoma. A aferição da PIO ou tonometria é fundamental para o correto diagnóstico, cujos valores normais dos cães e gatos é, variam entre 15 mmHg a 25 mmHg (Gelatt et al., 2007). Os seres humanos apresentam níveis menores de PIO quando comparado aos animais de companhia, variando entre 12 mmHg a 20 mmHg (Wilson e Martone, 1996). Uma grande combinação de terapias médicas e cirúrgicas pode ser utilizada. A escolha do tratamento é complexa e está diretamente relacionada com os diferentes tipos de glaucoma (Gelatt et al., 2007).

2.2.1 Tratamento medicamentoso do glaucoma

A terapêutica tópica para o glaucoma inclui quatro classes de fármacos: parasimpaticomiméticos, adrenérgicos, inibidores da anidrase carbônica (IACs) e análogos das prostaglandinas (Gelatt et al., 2007). Os parasimpaticomiméticos ou mióticos incluem pilocarpina e brometo de demecário e são utilizados na maioria dos glaucomas, exceto àqueles onde há uveíte anterior e luxação do cristalino. Reduzem a PIO devido à constrição pupilar facilitando a drenagem do humor aquosos através da malha trabecular. Atualmente apresentam uso restrito devendo ser associado a outros fármacos como beta-bloqueadores adrenérgicos e IACs (Ward et al., 2003; Gelatt et al., 2007). Em alguns animais de companhia e pacientes, a pilocarpina causa ardor e irritação a instilação devido ao pH ácido da apresentação comercial (Gelatt et al., 1997).

Dentre os fármacos adrenérgicos, destacam-se os beta-bloqueadores como o maleato de timolol (MT) e o betaxolol. Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, postula-se que reduzem a produção do humor aquoso através do bloqueio dos receptores beta localizados no corpo ciliar, portanto, diminuindo a PIO (Frishman et al., 1994). O MT é um dos antiglaucomatosos mais utilizados em humanos com glaucoma apesar dos graves efeitos adversos no sistema cardiorrespiratório (Kiel e Patel, 1998). É eficiente nas principais espécies domésticas, entretanto, não existe consenso sobre a sua eficácia terapêutica em cães (Liu et al., 1980; Wilkie e Latimer, 1991; Van der Woerd et al., 2000). Além da redução da PIO há diminuição do tamanho pupilar, porém este efeito é mínimo

Revisão de literatura

em humanos (Wilkie e Latimer, 1991; Gelatt et al., 1995). Curiosamente, MT reduz a PIO e o tamanho pupilar do olho contralateral, ou seja, o olho não tratado; este efeito decorre da absorção sistêmica pela via transconjuntival e do ducto nasolacrimonial (Wilkie e Latimer, 1991). Gum e colaboradores sugeriram que MT a 0,25% e 0,5% é ineficiente em única e múltiplas instilações em cães normotensos, entretanto, reduziu a PIO em aproximadamente 4 mmHg a 5 mmHg em olhos glaucomatosos (Gum et al., 1991a). Por outro lado, o aumento da concentração do MT para 2% a 8% foi responsável pela diminuição da PIO de 8 mmHg a 14 mmHg em cães normotensos (Gelatt et al., 1995).

Dorzolamida e brinzolamida são os principais IACs para administração tópica. A enzima anidrase carbônica é importante para a produção do humor aquoso. Uma vez inibida, há redução na produção do mesmo e, conseqüentemente, redução na PIO. A dorzolamida pode provocar gosto metálico na boca dos seres humanos quando instilada nos olhos (Kass, 1989; Maren et al., 1997). Apresenta efeito importante em pequenos animais com destaque nos cães, porém, é pouco eficiente na espécie equina sendo recomendado nesta última, como adjuvante a outros fármacos (Willis et al., 2001; Cawrse et al., 2003; Rainbow e Dziezyc, 2003). Em relação à eficácia clínica, brinzolamida é bastante similar a dorzolamida, porém é pouco eficiente na redução da PIO em gatos normotensos (Gray et al., 2003; Regnier 2007).

Os análogos das PGs tornaram-se um grupo de antiglaucomatosos após descoberto que pequenas doses de uma determinada PG, $PGF_{2\alpha}$, poderia diminuir a PIO. A partir daí, derivados das PGs foram aprovados para terapêutica tópica de pacientes glaucomatosos (Bito, 1984; Alm, 1998). Estes fármacos atuam aumentando a drenagem do humor aquoso através da via não convencional, ou seja, via uveoescleral (Hurwitz, et al., 1991). Além disso, na espécie canina, causam miose favorecendo também a drenagem do humor aquoso através da malha trabecular (Gum et al., 1991b). Latanoprost, bimatoprost e unoprostona isopropílica promovem uma redução significativa da PIO em pacientes normais e glaucomatosos (Gum et al., 1991b; Studer et al., 2000; Gelatt e MacKay, 2004; Ofri et al., 2000). Efeitos adversos do uso crônico de latanoprost incluem pigmentação da íris, cílios e hipertricose em humanos, outros primatas e coelhos pigmentados (Studer et al., 2000; Gelatt et al., 2007).

2.3 Infecções da superfície ocular

A superfície ocular é uma extensão da pele possuindo propriedades imunológicas semelhantes à das mucosas. Células dendríticas do tipo CD1⁺ e macrófagos abundam no tecido conjuntival atuando como sentinelas na proteção aos patógenos (Gillette et al., 1982). Além deste, células CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B também modulam a resposta imunológica nas infecções da superfície do olho. Existe uma flora endógena que permanece em equilíbrio na superfície ocular. Quando há multiplicação exagerada de um agente em questão há quebra deste equilíbrio ocorrendo então às infecções na superfície dos olhos (Chandler e Gillette, 1983).

Agentes infecciosos causam uma grande variedade de enfermidades oculares e de seus anexos como celulite orbitária, blefarite, dacriocistite, conjuntivite, ceratite, uveíte e endoftalmite (Galle e Moore, 2007). Vários patógenos são isolados nas ceratites e conjuntivites em humanos com destaque para as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pneumoniae*. Dentre o grupo das Gram-negativas, há maior prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* (Bourcier et al., 2003; Daniell et al., 2003; Hovding, 2008; Bertino, 2009). *S. aureus* e *P. aeruginosa* estão frequentemente envolvidas em enfermidades da córnea e da conjuntiva de cães, gatos e cavalos, entretanto, são também isolados na flora normal da superfície ocular de animais saudáveis (Moore et al., 1995; Whitley, 2000; Keller e Hendrix, 2005). Na ceratite ulcerativa, a *P. aeruginosa* pode causar uma lesão grave e profunda com potencial de perfuração ocular e, conseqüente, perda da visão (Whitley, 2000; Keller e Hendrix, 2005).

Baseado no espectro de ação e baixa toxicidade, as fluorquinolonas constituem primeira escolha no tratamento das enfermidades na superfície ocular nos animais domésticos e em seres humanos (Whitley, 2000; Daniell et al., 2003; Keller e Hendrix, 2005). Nesse contexto, o ofloxacino é comumente utilizado no tratamento de infecções oculares externas causadas por bactérias nos animais de companhia e humanos (Moore et al., 1995; Keller e Hendrix, 2005; Martinez et al., 2006). É um agente bactericida e classificado como fluoroquinolona de segunda geração atuando na inibição das enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, essenciais na duplicação, transcrição e reparação do DNA

Revisão de literatura

(Hussy et al., 1986; Blondeau, 2004). Embora fluoroquinolonas de terceira e quarta geração tenham sido desenvolvidas, o ofloxacino representa excelente escolha na prevenção e tratamento das infecções oculares superficiais nos animais e em seres humanos (Whitley, 2000; Bourcier et al., 2003; Daniell et al., 2003; Keller e Hendrix, 2005; Martinez et al., 2006).

2.4 Farmacocinética da administração tópica por meio da via ocular

A maioria dos fármacos instilados na superfície ocular é rapidamente drenada. Além disso, apresentam elevada concentração logo após sua administração que diminui abaixo dos níveis terapêuticos após alguns minutos. De fato, apenas uma pequena quantidade do fármaco instilado sobre o olho é absorvida, representando, no máximo 10% de sua concentração na câmara anterior (Patton e Robinson, 1976; Lee e Robison, 1986). O tempo de absorção do fármaco é apenas de alguns minutos, cuja biodisponibilidade, é geralmente menor que 5% (Maurice e Mishima, 1984).

A capacidade das moléculas dos fármacos administrados sobre a superfície ocular em transpor as diversas barreiras biológicas existentes está diretamente relacionada com a eficácia terapêutica durante o tratamento das oftalmopatias. De modo geral, estas moléculas podem seguir através em três diferentes vias; drenadas através do aparelho lacrimal, penetrar dentro do olho através da córnea ou da via conjuntivoescleral (VCE) e, finalmente, ser absorvido até a circulação sistêmica através da conjuntiva e nasofaringe como explicado na **figura 16** (Järvinen, et al., 1995; Regnier, 2007).

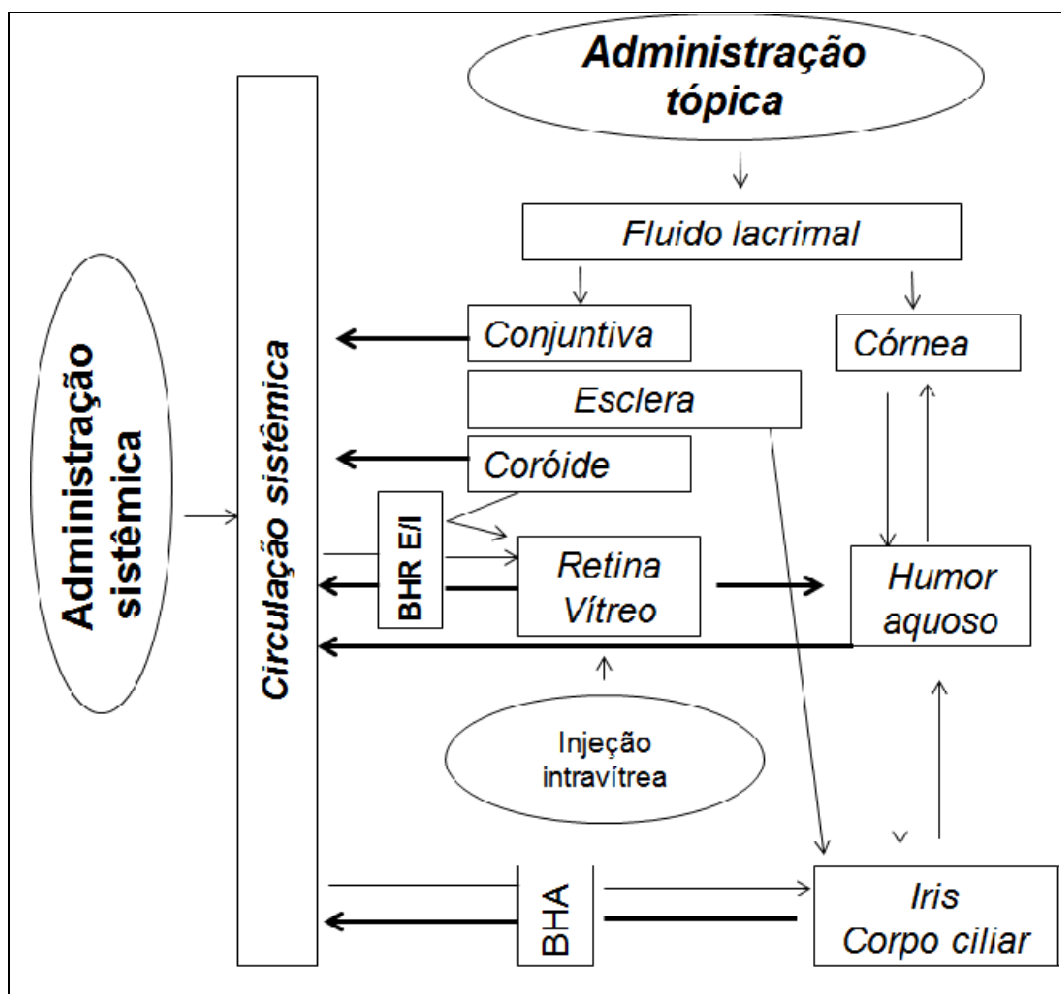


Figura 16. Representação esquemática da via de absorção de fármacos administrados através das vias sistêmica e tópica. A absorção é indicada pelas setas finas e excreção pelas setas em negrito. As barreiras oculares estão representadas como BHR E/I (barreira hemato-retiniana externa / interna) e BHA (barreira hemato-aquosa).

Fonte: Adaptado de Hornof et al. (2005, p.210)

Quando o colírio é administrado há mistura da solução com o filme corneano pré-lacrimal, cujo volume estimado, é de 7 μl a 10 μl (Shell, 1982). O volume médio de uma gota das apresentações comerciais de colírios é 40 μl , com variações entre 25 μl a 70 μl dependendo do formato do bico do frasco e das propriedades físico-químicas do medicamento (Lederer e Harold, 1986; Van Santvliet e Ludwig, 2004). Como a fissura palpebral apresenta a capacidade de retenção de até 30 μl da solução, o volume excedente é rapidamente drenado pelo sistema nasolacrimal como também escorre sobre a pálpebra inferior (Mishima et al., 1966; Hegeman et al., 1984). Concomitantemente, um

Revisão de literatura

segundo mecanismo de depuração ocular é representado pela produção e drenagem intermitente da lágrima. No olho humano hígido, a secreção e drenagem da lágrima ocorre aproximadamente 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, portanto, fármacos instilados por meio de colírios permanecem na superfície ocular brevemente sendo praticamente drenados através do aparelho lacrimal em aproximadamente 10 minutos (Davies, 2000).

Na segunda opção, o fármaco é absorvido através da córnea, cuja taxa e a proporção está diretamente relacionada com as características estruturais das membranas biológicas a serem transpostas e das propriedades físico-químicas destes fármacos (Doane et al., 1978; Lee e Robinson, 1986). A córnea consiste basicamente de três camadas; epitélio, estroma e endotélio, sendo uma camada hidrofílica (estroma) envolvido por duas camadas lipofílicas (epitélio e endotélio) (Regnier, 2007). A camada mais externa ou epitélio é funciona como uma barreira aos fármacos polares (Grass e Robinson, 1988a e Grass e Robinson, 1988b). A camada intermediária ou estroma é constituído por 78% de água, portanto admiti a entrada livre de moléculas polares. O endotélio, porção mais interna da córnea, é uma camada unicelular sendo sua permeabilidade influenciada pelo tamanho das partículas e coeficiente de partição óleo / água. Devido a estas características, esta camada não apresenta dificuldade à penetração dos fármacos (Hegeman et al., 1984; Prausnitz e Nooman, 1998). Portanto, para absorção eficiente através da córnea, os fármacos devem apresentar um coeficiente de partição óleo / água equilibrado (Grass e Robinson, 1984).

A absorção através da VCE, ou seja, através da conjuntiva e esclerótica é importante para fármacos com características hidrofílicas e moléculas grandes que não são capazes de transpor as barreiras corneanas (Ahmed e Patton, 1985). Uma vez que o fármaco penetra pela conjuntiva, há duas possibilidades para que o mesmo alcance os tecidos intraoculares. A primeira envolve a difusão pela esclerótica e outras camadas oculares chegando à câmara anterior (Regnier, 2007). O acesso ao segmento posterior do olho é também possível através da esclerótica para fármacos com características hidrofílicas, cuja passagem, é até quatro vezes mais eficientes em comparação com a via corneana (Sasaki et al., 1996). A outra possibilidade ocorre quando o fármaco absorvido alcança os vasos esclerais, e finalmente, o corpo ciliar. Embora a proporção de fármacos que entra

Revisão de literatura

através da VCE seja desconhecida, é sabido que determinados fármacos penetram melhor por uma ou outra via (Schoenwald et al., 1997).

Por último, há drenagem do fármaco através do sistema nasolacrimal sendo absorvido pela vascularização local (Shell, 1982; Bartlett e Cullen, 1984). Em coelhos, epitélio do canal nasolacrimal absorve substâncias lipofílicas e, portanto, moléculas lipofílicas oriundas dos medicamentos e dos constituintes da lágrima são provavelmente também absorvidas pelo canal lacrimal em outras espécies (Paulsen et al., 2002). A absorção sistêmica de fármacos através das fenestrações dos vasos que irrigam a conjuntiva e a esclerótica também devem ser consideradas (Shell, 1982; Bartlett e Cullen, 1984; Hegeman et al., 1984). Esta absorção conjuntival e nasal pela via nasolacrimal é geralmente indesejável, pois, esta fração que é removida pela circulação sistêmica não promove efeito ocular, portanto, com potencial de efeitos adversos sistêmicos. Fármacos absorvidos pela mucosa do ducto lacrimal, conseqüentemente, ganham a circulação e não são sofrem efeito de primeira metabolização hepática. Em relação à absorção sistêmica, a administração de colírios pode ser comparada a injeções endovenosas de forma lenta com potencial de causar efeitos adversos (Mealey, 2000). Esta toxicidade sistêmica é bem conhecida e foi observada em cães que utilizaram administrações tópicas de fenilefrina, MT e corticóide (Pascoe et al., 1994; Mealey, 2000).

2.5 Quitosana

Alguns polímeros são utilizados como biomateriais, termo que vem sendo utilizado para descrever matrizes poliméricas usadas na terapêutica de tecidos vivos. São largamente utilizados na medicina como material cirúrgico, próteses odontológicas e ortopédicas ou mesmo como forma de veiculação de fármacos em sistemas de liberação prolongada (Griffth, 2000; Roldo et al., 2004; Takeuchi et al., 2005).

A quitosana é um polissacarídeo linear biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural e abundante encontrado em exoesqueletos de crustáceos, outros

Revisão de literatura

animais marinhos, insetos e fungos composto pelas unidades monoméricas de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-acetamida-2-desoxi-D-glicose (Alpar e Groves, 2006; Laranjeira e Fávere, 2009) (**Figura 17**).

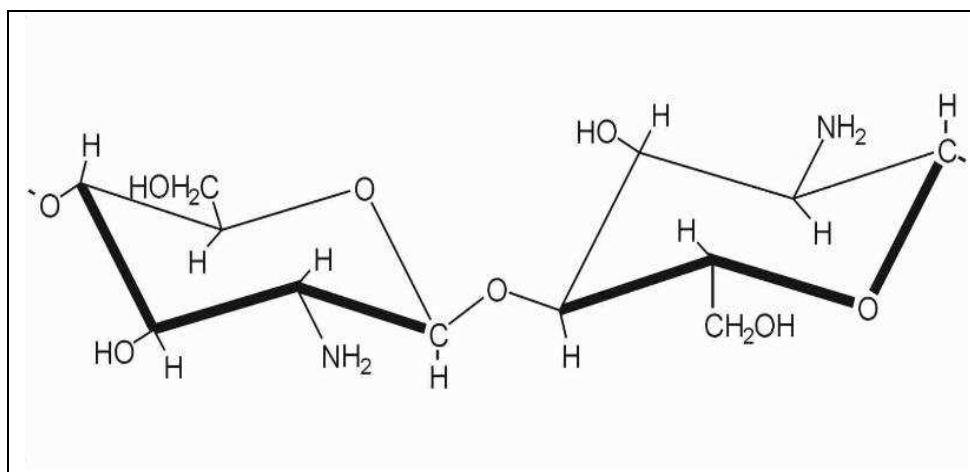


Figura 17. Estrutura química da quitosana.

A descoberta da quitosana remota ao século XIX, quando em 1859, foi isolada após o aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio, resultando na sua desacetilação (Freepons, 1986). Entretanto, somente nas duas últimas décadas sua importância tem aumentado significativamente por se tratar de uma fonte renovável, biodegradável e de baixo custo, uma vez que é obtida como material rejeitado pela indústria pesqueira, como também, pelo recente aumento no conhecimento a cerca de sua funcionalidade nas aplicações tecnológicas e biomédicas (Li et al., 1992; Laranjeira e Fávere, 2009).

Dentre as várias características biofarmacêuticas da quitosana, destaca-se a baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Devido a estas propriedades favoráveis, o interesse da quitosana e seus derivados em sistemas de liberação de fármacos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Para tal é importante que a quitosana seja hidrossolúvel e carregada positivamente para que esse biopolímero

Revisão de literatura

interaja com polímeros carregados negativamente, macromoléculas e poliânions em meio aquoso, favorecendo a difusão dos fármacos (Alpar e Groves, 2006; Laranjeira e Fávere, 2009).

2.5.1 Utilização da quitosana em oftalmologia

Vários biomateriais são utilizados em sistemas de liberação de fármacos de uso oftalmológico destacando os derivados da celulose, o poliacrilato, o polioxietileno e a quitosana (Fialho et al., 2003; Grabovac et al., 2005; Ludwig, 2005; Ali e Lehmussaari, 2006; Bourges et al., 2006; Sandri et al., 2006; Cao et al., 2007; Mansour et al., 2010). Dentre esses, a quitosana tem se destacado com futuro promissor como matriz polimérica baseado nas características supracitadas como também nas propriedades antiangiogênica, antimicrobiana e, principalmente, na capacidade de mucoadesão e excelente tolerância ocular (Greaves e Wilson, 1993; Sintzel et al., 1996; Zheng e Zhu, 2003; Roldo et al., 2004; Kean e Thanou, 2010).

Formulações contendo quitosana apresentam a capacidade de permanecer por tempo prolongado na superfície ocular devido suas características hidrofílicas como também as propriedades mucoadesivas. De fato, o grande número de grupos hidroxila e amino presentes na cadeia polimérica resultam na elevada hidroficidade da quitosana (Grabovac et al., 2005; Laranjeira e Fávere, 2009) Em relação a propriedade de mucoadesão decorrem da formação de ligações químicas como pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas entre a carga positiva de grupos amino presentes na quitosana e a carga negativa da mucina (Lehr et al., 1992; Ludwig, 2005; Smart et al., 2005).

Uma ampla variedade de fármacos pode ser incorporada a matriz polimérica de quitosana e utilizada como sistemas de liberação de fármacos em oftalmologia. Antimicrobianos como ofloxacino (Di Colo et al., 2001a; Di Colo et al., 2002) e tobramicina (Felt et al., 2001); imunomoduladores com destaque para a ciclosporina (Malaekheh-Nikouei et al., 2008), antiinflamatórios esteroidais incluindo a dexametasona (Rodrigues et al., 2009), antiglaucomatosos como o MT (Agnihotri e Aminabhavi, 2007) e cloridato de dorzolamida

Revisão de literatura

(Papadimitriou et al., 2008) dentre outros. Além disso, a quitosana pode ser modificada em sistemas constituídos de diferentes formas tais como membranas, géis, esponjas, microesferas e nanopartículas (Li et al., 1992). Estas alternativas possibilitam desenvolvimento farmacotécnico amplo e diversificado da quitosana em sistemas de liberação de fármaco de uso oftálmico.

2.6 Implantes mucoconjuntivais

2.6.1 Implantes de MT e outros antiglaucomatosos

Os pacientes portadores de glaucoma são na maioria geriátricos, portanto, muitas vezes, não seguem as orientações médicas ou dependem de parentes e ou enfermeiros para as instilações de colírios (Macmahon et al., 1979). A posologia é de duas a seis administrações ao dia, durante meses, em um tratamento, na maioria das vezes vitalício. A absorção sistêmica do MT deve ser considerada, pois, provocar efeitos respiratórios e cardiovasculares graves (**Figura 18**). Estes efeitos adversos têm sido descritos como bradicardia, hipotensão e até a morte (Macmahon et al., 1979; Nelson et al., 1986; Wolfhagen et al., 1998). A redução da quantidade do fármaco administrado têm sido responsável pela diminuição dos efeitos adversos (Aggarwal e Kaur, 2005; Agnihotri e Aminabhavi, 2007). A diminuição destes efeitos é possível com sistemas de liberação prolongada de fármacos, pois, permitem a liberação de fármacos de forma mais homogêneas que as apresentações comerciais convencionais (Agnihotri e Aminabhavi, 2007).

Alguns estudos relatam a utilização com sucesso do MT em implantes mucoconjuntivais como sistemas de liberação prolongada (El-Kamel, 2002; Rouland et al., 2002; Cao et al., 2007). Outros antiglaucomatosos têm sido utilizados associados à quitosana como a dorzolamida (Papadimitriou et al., 2008) e pilocarpina (Li e Xu, 2002). O desenvolvimento de implantes para tratamento de doenças crônicas e degenerativas como o glaucoma tem crescido consideravelmente nos últimos anos (Aggarwal e Kaur, 2005).

Revisão de literatura

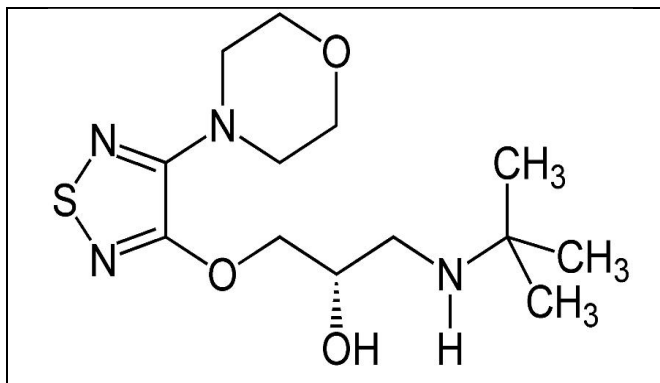


Figura 18. Estrutura química do MT (Farm. Brás. IV ed.).

2.6.2 Implantes de ofloxacino e outros antimicrobianos

Infecções na superfície ocular são muito comuns predominando as ceratites e conjuntivites. O tratamento recomendado destas oftalmopatias é tópico, cujas administrações, devem ser várias vezes ao dia, para promover cura clínica (Bourcier et al., 2003; Daniell et al., 2003). Na medicina veterinária, o tratamento das enfermidades oculares depende da colaboração dos pacientes e disponibilidade de tempo dos proprietários que podem comprometer a terapêutica devida administrações freqüentes. O desenvolvimento de sistema de liberação prolongada de fármaco seguro e eficiente pode solucionar estes entraves proporcionando segurança e comodidade para os animais e seus proprietários (Saettone e Salminen, 1995; Baeyens et al., 1997).

Implantes contendo antibióticos representam uma área de estudo emergente constituindo uma alternativa para o tratamento convencional, disponibilizando o fármaco no sítio da infecção (Di Colo et al., 2002; Noel et al., 2008). Uma ampla variedade de fármacos pode ser incorporada a matriz polimérica de quitosana e utilizada como sistemas de liberação de fármacos em oftalmologia. Antimicrobianos como amicacina e daptomicina (Noel et al., 2008), vancomicina (Bigucci et al., 2008), ofloxacino (Di Colo et al., 2001a; Di Colo 2001b; Felt et al., 2001; Di Colo et al., 2002) foram reportados na matriz polimérica de

Revisão de literatura

quitosana. Nesse grupo, ofloxacino merece destaque, pois, constitui a primeira escolha no tratamento de ceratites e conjuntivites nos animais e em seres humanos (**Figura 19**).

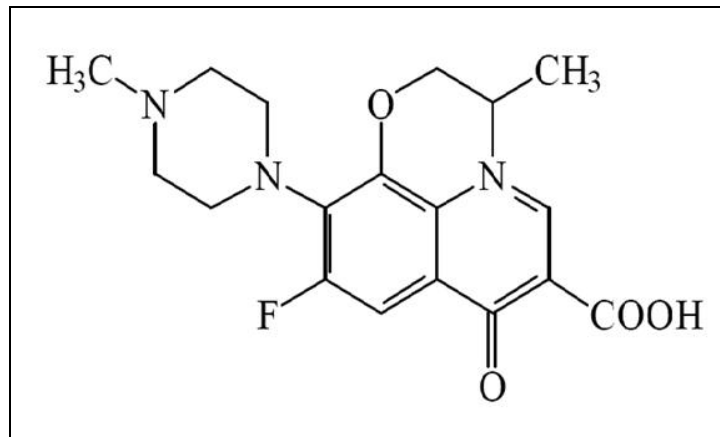


Figura 19. Estrutura química do ofloxacino (Farm. Brás. IV ed.).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é minimizar os efeitos relacionados com a baixa biodisponibilidade dos fármacos na superfície ocular, pequena disponibilidade de tempo dos proprietários e complacência dos pacientes para freqüentes administrações que ocasionalmente logram insucessos na terapêutica oftalmológica veterinária. Além disso, facilitar o tratamento oftálmico de pacientes humanos que dependem de ajuda como crianças, idosos e portadores de deficiências.

Desenvolver e avaliar *in vivo* sistemas de liberação prolongada de fármacos seguros e eficientes constituídos de quitosana com MT e quitosana com ofloxacino para tratamento e prevenção do glaucoma e infecções oculares externas em animais de companhia, animais selvagens e em seres humanos.

3.2 Objetivos específicos

Parte 1

- Desenvolver um sistema de liberação de fármacos constituído de quitosana e MT de baixo custo, biodegradável e com mínima irritabilidade tecidual;
- Caracterizar o sistema desenvolvido por meio de teste de hidratação, espectroscopia na região do infravermelho e calorimetria exploratória diferencial;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do sistema desenvolvido;
- Avaliar o perfil farmacodinâmico do sistema desenvolvido a partir da aferição da PIO após a administração nos olhos de coelhos;
- Comparar a efetividade do sistema de liberação de fármaco desenvolvido com a apresentação comercial de referência (Timoptol[®], Merck Sharp & Dohme, Farmaceutica Ltda, São Paulo, Brasil);
- Determinar o tempo médio máximo de liberação do fármaco *in vivo*;

Objetivos

- Avaliação da aceitabilidade dos sistemas desenvolvidos por meio de exame clínico e oftalmológico;
- Avaliação da toxicidade celular através da presença de lesões microscópicas por meio da histopatologia ocular;

Parte 2

- Desenvolver um sistema de liberação de fármacos constituído de quitosana e ofloxacino, de baixo custo, biodegradável e com mínima irritabilidade tecidual;
- Caracterizar o sistema desenvolvido por meio do teste de hidratação, espectroscopia na região do infravermelho e calorimetria exploratória diferencial;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do sistema desenvolvido;
- Avaliar a efetividade do ofloxacino em meio de cultura infectado com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* por meio do halo de inibição bacteriano;
- Comparar a efetividade do implante desenvolvido com disco controle de antibiótico, filme de quitosana sem fármaco e disco estéril embebido em ofloxacino 0,3% (Oflox[®], Allergan, São Paulo, Brasil) pela análise do halo de inibição bacteriano no meio de cultura infectado com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Determinar a concentração do ofloxacino na lágrima em vários momentos durante sete dias após a sua administração nos olhos de coelhos;
- Comparar a efetividade do sistema de liberação de fármaco desenvolvido com a apresentação comercial de referência (Oflox[®], Allergan, São Paulo, Brasil);
- Determinar o tempo médio máximo de liberação do fármaco *in vivo*;
- Avaliação da aceitabilidade dos sistemas desenvolvidos por meio de avaliação clínica;
- Avaliação da toxicidade celular por meio da presença de lesões microscópicas através da histopatologia ocular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os materiais utilizados foram:

- Quitosana de média massa molecular com grau de desacetilação de 85 % da marca Sigma Aldrich;
- O MT e ofloxacino foram adquiridos da Henrifarma e Sigma Aldrich, Brasil, respectivamente;
- Disco controle comercial de enrofloxacino e ciprofloxacino, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA;
- Estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25857), Difco Laboratories, New Jersey, USA;
- Meio de cultura ágar Muller-Hinton, Difco Laboratories, New Jersey, USA;
- Compasso manual, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA;
- Colírio a base de MT a 0,5%, Timoptol[®], Merck Sharp & Dohme Farmaceutica Ltda, São Paulo, Brasil;
- Colírio a base de ofloxacino a 0,3%, Oflox[®], Allergan, São Paulo, Brasil;
- Colírio a base de tropicamida, Midriacyl[®], Alcon, São Paulo, Brasil;
- Colírio a base de cloridrato de proximetacaína, Anestalcon[®], Alcon, São Paulo, Brasil;
- Colírio a base de fluoresceína sódica, Fluoresceína[®], Allergan, São Paulo, Brasil;
- Pipeta HT Labmate[®], Warsaw, Polônia;
- Lanterna multifocal Maglite[®], Mag Instruments, California, EUA;
- Fitas para mensuração da produção de lágrimas, Schirmer Tear Test (STT) Schering-Plough Animal Health, New Jersey, USA;
- Oftalmoscópio direto, Heine K180 Optotecnik, Herrsching, Alemanha;
- Oftalmoscópio indireto binocular, Opto Eletrônica Ltda, São Paulo, Brasil;
- Lentes de 20 e 40 dioptrias para fundoscopia, Volk, Cleveland, USA;
- Biomicroscópio com luz de fenda, Kowa[®] SL-15, Tóquio, Japão;
- ClearView[™], Optibrand, Fort Collins, EUA;
- Tonometria de aplanção TonoPen[®] XL, Reichert Technologies, Buffalo, EUA;
- Mavica[®] CD 500, Sony Company, Tóquio, Japão;

Material e métodos

- Xilazina (Calmium[®]) da Agener União Saúde Animal, Foz de Iguaçu, Brasil;
- Cetamina (Ketamina[®]) da Agener União Saúde Animal, Pouso Alegre, Brasil;
- Tiopental (Thionembuthal[®]) Cristália Laboratório, São Paulo, Brasil;
- Microscópio óptico de luz, Carl Zeiss, Jena, Alemanha;
- Agitador magnético IKA Color Squid;
- Aparelho de ultra-som Ultra Cleaner 1400A UNIQUE;
- Balança analítica da marca Sartorius, Modelo BP221S;
- Espectrômetro FT-IR Spectrometer One da Perkin Elmer;
- Espectrofotômetro Hewlett Packard - HP8453 UV-Vis;
- Aparelho de análise térmica modelo DSC50 da marca Shimadzu;
- Incubador de bancada com agitação circular, marca TECNAL e modelo TE-424.
- Sistema cromatógrafo a líquido de alta eficiência WATERS
- Coelhos da raça New Zealand White e linhagem Albino, machos, idade aproximada de 3 meses e pesando entre 2,0 kg e 2,5 kg;

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento dos implantes mucoconjuntivais constituídos de quitosana com maleato de timolol e ofloxacino

Para a produção dos sistemas de liberação prolongada de fármacos na forma de filmes de quitosana, foi proposto desenvolver implantes com uma única camada com e sem fármaco. Desta forma, 100 mL de uma solução de ácido acético em água destilada (1,5 % v/v) foi preparada e reservada. A seguir, 2,5 g de quitosana e o fármaco (12,5 mg de MT ou 7,5 mg de ofloxacino) foram pesados e adicionados a um béquer. A solução ácida foi adicionada gradualmente sobre a quitosana e o fármaco e o sistema foi mantido sob agitação magnética por aproximadamente 24 h, à temperatura ambiente, até completa dispersão do polímero. Em seguida, 10 mL da dispersão foram vertidos em uma placa de petri (60 mm de diâmetro x 16 mm espessura). O solvente foi evaporado à temperatura ambiente até a produção de uma fina película de filme (**Figura 20**). O mesmo foi feito para o restante da solução, a fim de obter 10 placas com filme de quitosana monocamada.

Material e métodos



Figura 20. Fotografia de fina película da quitosana sem o fármaco.

4.2.2 Caracterização dos implantes mucoconjuntivais

Os filmes de quitosana com MT e ofloxacino produzidos foram caracterizados em relação às suas propriedades físicas e químicas e também com relação à sua capacidade de liberação do fármaco em teste *in vitro*. Assim, foram realizados ensaios de caracterização de capacidade de hidratação dos filmes, registrados espectros na região do infravermelho e termogramas por intermédio de testes de calorimetria exploratória diferencial.

4.2.2.1. Teste de hidratação dos filmes de quitosana

A capacidade de hidratação dos filmes de quitosana com MT e ofloxacino foi avaliada por meio da determinação da porcentagem de hidratação dos dispositivos e determinada pela diferença de peso antes e depois de serem imersos em uma solução tampão pH 7,4, preparado a partir utilização de fosfato de sódio monobásico e dibásico (PBS pH 7,4).

Material e métodos

Os filmes foram cortados em circunferências de aproximadamente 5 mm de diâmetro e pesados utilizando uma balança analítica. Posteriormente, cada amostra foi alojada em um frasco de penicilina contendo 2 mL de PBS pH 7,4, sendo mantidas em contato com a solução durante intervalos de tempo de 5, 10, 20, 40, 60, 90 minutos, como descrito por Öner e colaboradores (2007). Após a imersão, as amostras foram removidas do meio e o excesso de solução foi retirado da superfície das amostras deixando-as em contato com papel de filtro por aproximadamente três minutos. Após esse período foram pesadas e a porcentagem de hidratação calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ hidratação} = [(X_t - X_0) / X_0] \times 100$$

Onde X_t é o peso do filme intumescido após o tempo t e X_0 é o peso original do filme no tempo zero. Todo este experimento foi realizado em triplicata.

4.2.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia no infravermelho possibilita a identificação de grupos funcionais de moléculas que são expostos a uma radiação no infravermelho, na faixa de 10.000 a 100 cm^{-1} . A radiação infravermelha, quando absorvida por uma molécula orgânica, promove a rotação e vibrações moleculares, produzindo um espectro de onda com as posições específicas de cada banda.

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. Obtiveram-se os espectros dos filmes usando-se a técnica de Reflexão total atenuada (ATR), na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} . Os filmes de quitosana com e sem fármaco foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho objetivando confirmar a estabilidade química do MT e ofloxacino após preparação dos filmes.

4.2.2.3. Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é amplamente utilizada no setor farmacêutico para caracterização de materiais como para controle de qualidade de produtos. Nessa técnica, um material de referência e uma amostra a ser investigada são colocados em dois cadinhos dispostos sobre uma base de metal potencialmente condutor e aquecidos sob temperatura controlada. Por meio da troca de calor entre a amostra e a referência, a curva de DSC expressa picos referentes a eventos físico-químicos do material, tais como a fusão, a cristalização e a transição vítrea.

Nitrogênio à taxa de 20 mL/min foi utilizado como gás de purga. A amostra foi acondicionada em um cadinho de alumínio hermeticamente fechado, aquecida de -50 a 200°C, em uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto sob atmosfera de nitrogênio, e reauecida a 350°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. Essa técnica foi útil para caracterizar as propriedades térmicas dos filmes de quitosana com e sem os fármacos por meio de um aparelho de análise térmica.

4.2.2.4. Teste de liberação do fármaco *in vitro*

Para a realização do teste de liberação *in vitro*, os filmes foram cortados em circunferências de aproximadamente 5 mm de diâmetro e adicionados, individualmente, em um frasco de vidro contendo 3,0 mL de solução tampão pH 7,4 (tampão fosfato) (**Figura 21**). As amostras foram incubadas sob agitação mecânica circular a 37°C e 30 rpm.

Material e métodos

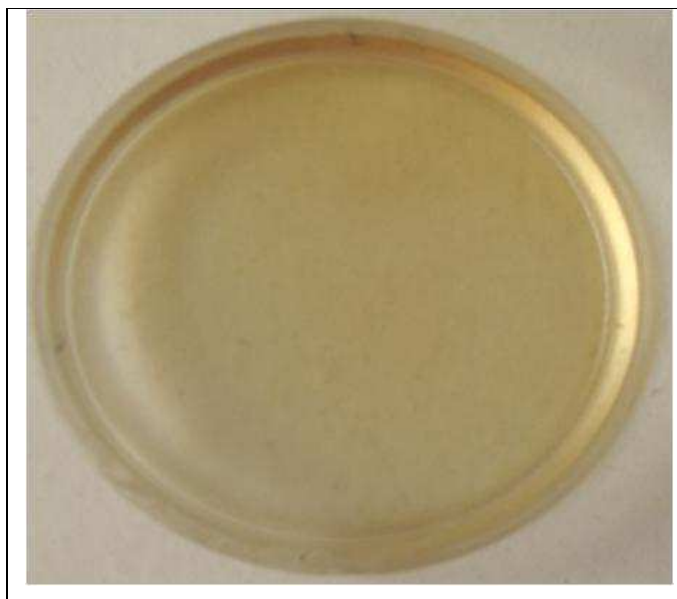


Figura 21. Fotografia de filme de quitosana com MT cortados em circunferência preparados para a administração *in vivo*.

Em intervalos de tempo pré-determinados, toda a solução era retirada dos frascos vidros de vidro constituindo assim uma amostra. Esta era reservada e, em seguida, outros 3,0 mL de solução tampão pH 7,4 (tampão fosfato) eram adicionados a cada frasco, mantendo assim condição “*sink*” durante o experimento. Após este procedimento os frascos foram recolocados na incubadora.

As soluções retiradas dos frascos de vidro contendo os filmes de quitosana sem fármaco foram utilizadas como branco. A partir da curva analítica do MT e ofloxacino em tampão fosfato pH 7,4, a concentração dos fármacos que foi liberada pôde ser determinada. O método empregado para a quantificação do fármaco foi espectrofotometria na região do UV ($\lambda = 294\text{nm}$) para o MT e ($\lambda = 285\text{nm}$) para o ofloxacino, conforme estabelece a Farmacopéia Brasileira IV Ed (Farmacopéia, 2005). Para tal, soluções do fármaco em tampão fosfato pH 7,4 com concentração variando entre 100 $\mu\text{g/ml}$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$ foram utilizadas para a construção da curva de padronização.

Material e métodos

4.2.3 Teste de eficácia *in vitro*

A avaliação de eficácia *in vitro* dos filmes de quitosana e ofloxacino foi realizada por meio da inibição da atividade de estirpes de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25857). Após crescimento por 24 h em caldo Muller-Hinton (Difco Laboratories, USA), foi realizada diluição das estirpes para a equivalência 0.5 da escala McFarland, que corresponde a uma densidade celular aproximada de $1,5 \times 10^8$ por mL. Para a avaliação, a solução diluída de cada uma das estirpes foi inoculada em seis placas de ágar Muller-Hinton (Difco Laboratories, USA) como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011) para ensaios de antibiograma com aeróbios.

Seis meios de cultura com *S.aureus* e *P.aeruginosa* receberam filme de quitosana sem fármaco, disco controle comercial com ciprofloxacino ou enrofloxacino, disco estéril embebido com ofloxacino 0,3% (Oflox®) e filme de quitosana com ofloxacino. Após período de incubação de 24 h a 37°C, o halo de inibição bacteriana foi mensurado e registrado individualmente utilizando compasso.

4.2.4 Teste de liberação do fármaco *in vivo*

Coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça New Zealand White e linhagem Albino, machos, idade aproximada de 3 meses e pesando entre 2,0 kg e 2,5 kg oriundos da Fazenda Experimental de Igarapé (UFMG) foram utilizados. Os animais permaneceram em gaiolas individuais no biotério da Escola de Veterinária (UFMG), durante o período de adaptação e experimentação. Foram alocados em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura média de 25°C, ventilação constante e luminosidade variando de acordo com a luz solar. Não houve restrição de água e alimento durante o experimento, cuja ração utilizada, foi apropriada para espécie em questão.

Material e métodos

Após o exame clínico geral com avaliação dos principais parâmetros vitais, realizou semiotécnica oftalmológica, incluindo inspeção das pálpebras, sistema lacrimal e bulbo ocular. Esta avaliação ocorreu com o auxílio de fonte de luz apropriada (Lanterna Maglite[®], Mag Instruments, California, EUA), tiras para teste lacrimal de Schirmer (Schirmer Tear Test[®], Schering-Plough Animal Health, New Jersey, EUA), tonometria de aplanção (TonoPen[®] XL, Reichert Technologies, Buffalo, EUA), oftalmoscopia direta (Oftalmoscope Heine[®] K180, Heine Optotecnik, Herrsching, Alemanha), biomicroscópio com luz de fenda (Kowa[®] SL-15 Slit-lamp Biomicroscope, Tóquio, Japão) e oftalmoscopia indireta (Oftalmoscópio indireto binocular, Opto Eletrônica Ltda, São Paulo, Brasil). A retina foi digitalizada com utilização de equipamento apropriado (ClearViewTM, Optibrand, Fort Collins, EUA). O acompanhamento por documentação fotográfica foi realizada em todos os bulbos oculares e anexos examinados, com auxílio de câmera digital (Mavica[®] CD 500, Sony Company, Tóquio, Japão). Dois coelhos foram descartados do experimento durante a quarentena após a avaliação oftalmológica; o primeiro devido à presença de conjuntivite bilateral e o segundo devido à blefarite no OE.

Em relação ao primeiro experimento envolvendo o implante de quitosana e MT, os animais foram divididos em três grupos com cinco coelhos em cada um após 15 dias de adaptação. No primeiro grupo foi instilado o volume de 50 µl de solução salina no olho direito (OD) com auxílio de micropipeta (Pipeta HT Labmate[®], Warsaw, Polônia). Já no segundo grupo foi administrado 50 µl de MT (Timoptol[®], Merck Sharp & Dohme, Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) no OD e no terceiro grupo foi administrado o filme de quitosana com o MT no saco conjuntival do OD após anestesia tópica a base de colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon[®], Allergan, São Paulo, Brasil).

A PIO de ambos os olhos foi mensurada com auxílio de um tonômetro de aplanção (TonoPen[®] XL, Reichert Technologies, Buffalo, EUA) às 13 h de dois em dois dias após a instilação de anestésico tópico (Anestalcon[®], Allergan, São Paulo, Brasil). Foram realizadas três mensurações da PIO em cada momento e a média registrada por profissional com experiência em tonometria. A instilação de MT ocorreu às 7 h e 19 h do dia durante 15 dias. O olho esquerdo (OE) não recebeu nenhum tratamento e foi utilizado

Material e métodos

como controle. Posteriormente, comparar a eficácia da terapêutica convencional à base de colírio com o filme de quitosana e MT desenvolvidos.

No segundo experimento foram avaliados os implantes de quitosana e ofloxacino. Para tal utilizaram-se 18 coelhos alocados em dois grupos após período de 15 dias de adaptação. No primeiro grupo (n=6) foi instilado 50 µl de ofloxacino 0,3% (Oflox[®], Allergan, São Paulo, Brasil), a cada 8 h (6 h, 14 h e 22 h), durante 7 dias, com auxílio de Micropipeta (Pipeta HT Labmate[®], Warsaw, Polônia) no OD. O segundo grupo (n=12) recebeu o filme de quitosana e ofloxacino no saco conjuntival do OD após anestesia tópica a base de colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon[®], Allergan, São Paulo, Brasil). O OE não recebeu nenhum tratamento e foi utilizado como controle. Além disso, comparar os resultados obtidos entre o tratamento convencional com colírio e os filmes de quitosana e ofloxacino desenvolvidos.

Amostras de lágrimas foram coletadas no saco lacrimal iniciando as 0,5 h, 2 h, 4 h e 7 h com auxílio de frações equivalentes de tiras para teste da produção lacrimal (STT, Schering-Plough Animal Health, New Jersey, USA) após administração de 50 µl de ofloxacino 0,3% as 6 h da manhã. No segundo grupo amostras de lágrimas foram coletadas as 0,5 h, 2 h, 5 h, 10 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h. Todas as amostras foram diluídas em 20 µl de acetonitrila e armazenadas -20°C até futura análise.

4.2.5 Determinação do ofloxacino na lágrima

Um método sensível e reprodutivo foi desenvolvido e validado para analisar o ofloxacino nas lágrimas de coelhos com auxílio das fitas para o STT. O método consistiu em uma etapa de extração do antimicrobiano das fitas por um solvente de extração e posterior análise em cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector de massas (DE).

Conhecendo a concentração do ofloxacino na lágrima nos tempos estabelecidos, é possível determinar a concentração mínima (C_{min}), concentração máxima (C_{max}) e área

Material e métodos

abaixo da curva (AUC) no tratamento com ofloxacino 0,3% e com filme de quitosana e mesmo fármaco.

4.2.6 Avaliação da toxicidade por meio da histologia ocular

Após o período de experimentação, os animais foram eutanasiados com a finalidade de investigar possíveis lesões microscópicas no local de administração do filme de quitosana, ou seja, na mucosa palpebral inferior e mucosa bulbar do saco conjuntival. A eutanásia ocorreu de acordo com a resolução nº 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia (BRASIL, 2002). O protocolo anestésico incluiu administração intramuscular de cloridrato de cetamina (30 mg/Kg) (Calmium[®], Agener União, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (4 mg/Kg) (Ketamina[®], Agener União, São Paulo, Brasil) para a anestesia geral dos coelhos. Posteriormente utilizou pentobarbital (100 mg/Kg) (Thionembuthal[®], Crisália Laboratório, São Paulo, Brasil) para indução da depressão do sistema nervoso central e morte.

Os bulbos oculares foram removidos após cantotomia lateral e dissecados por incisão no fórnice conjuntival, permanecendo a conjuntiva parcialmente aderida. Os músculos extra-oculares e a periórbita foram dissecados em direção ao nervo óptico permitindo a remoção do mesmo. A secção do bulbo foi realizada no sentido do plano anteroposterior, formando um meridiano do nervo óptico até a córnea. Em seguida, fatias do bulbo ocular foram fixadas em solução de formol tamponado (pH 7,2) a 10%, desidratadas, diafanizadas, embebidas e incluídas em parafina e, finalmente, cortadas com espessura de 4-5 µm em micrótomo, com posterior montagem em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas pela coloração hematoxilina e eosina e, posteriormente, analisadas ao microscópio óptico de luz (Carl Zeiss, Herrsching, Alemanha), de acordo com as recomendações de Luna (1968).

Esta avaliação permitiu determinar as alterações ou sinais de toxicidade microscópica, muitas vezes, não observada na avaliação macroscópica. Nesse contexto, incluem-se anormalidades celulares como acantose, hiperkeratose, presença de infiltrado

Material e métodos

inflamatório, lesões ulcerativas e necrose; e vasculares, tais como, congestão e hemorragia.

O experimento utilizando o polímero de quitosana e MT foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA / UFMG) – protocolo N° 156/08. No segundo experimento utilizando a quitosana e ofloxacino foi aprovado pelo CETEA / UFMG – protocolo N° 130/08. Ambos também estão em conformidade com *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) que regulamenta e normatiza uso de animais em oftalmologia.

4.2.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados relativos aos valores médios da PIO correspondente para os tratamentos com colírio de MT e filme de quitosana e MT entre a quinta e 12ª semana foram comparados. Para tal, foi realizado o teste não paramétrico Mann-Whitney e Friedman com $P < 0,05$ com nível mínimo de significância. As variáveis foram consideradas estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. Os cálculos foram realizados utilizando os programas de Sistema de Análise Gráfica (SAEG) versão 9.1 (Brasil, 2007) e Instat versão Graphpad 3 (Estados Unidos, 2003).

No segundo experimento, a análise dos dados foi realizada com o auxílio de teste não paramétrico Mann-Whitney e teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer com $P < 0,05$ como nível mínimo de significância. As variáveis foram consideradas diferentes quando $P < 0,05$. Foram utilizadas na comparação entre a efetividade do disco embebido com ofloxacino 0,3% e filme de quitosana com ofloxacino no meio de cultura com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. Além disso, a concentração do ofloxacino na lágrima oriundo da instilação do ofloxacino 0,3% e liberado a partir do implante de quitosana e ofloxacino *in vivo* foi comparada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de hidratação dos filmes

Investigando a hidratação dos implantes de quitosana com MT e ofloxacino, registrou-se a diferença de peso entre a matriz seca e a matriz hidratada após a determinação do período de tempo. O perfil total de absorção de água é demonstrado com detalhes na gráfico a seguir para quitosana e MT (**Figura 22**) seguido dos implantes de quitosana e ofloxacino (**Figura 23**).

Gráfico de hidratação dos implantes de quitosana e MT

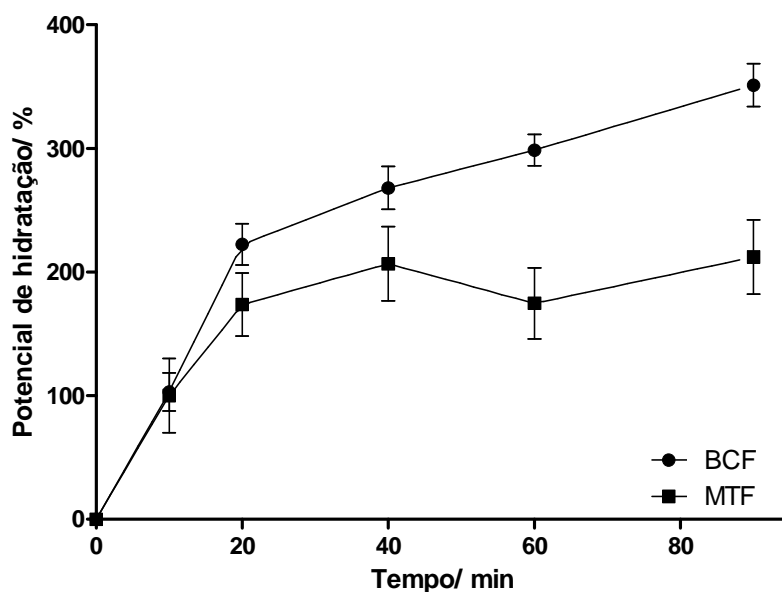


Figura 22. Gráfico de hidratação do filme de quitosana branco (BCF) e do filme de quitosana com o MT (MTF).

Gráfico de hidratação dos implantes de quitosana e ofloxacino

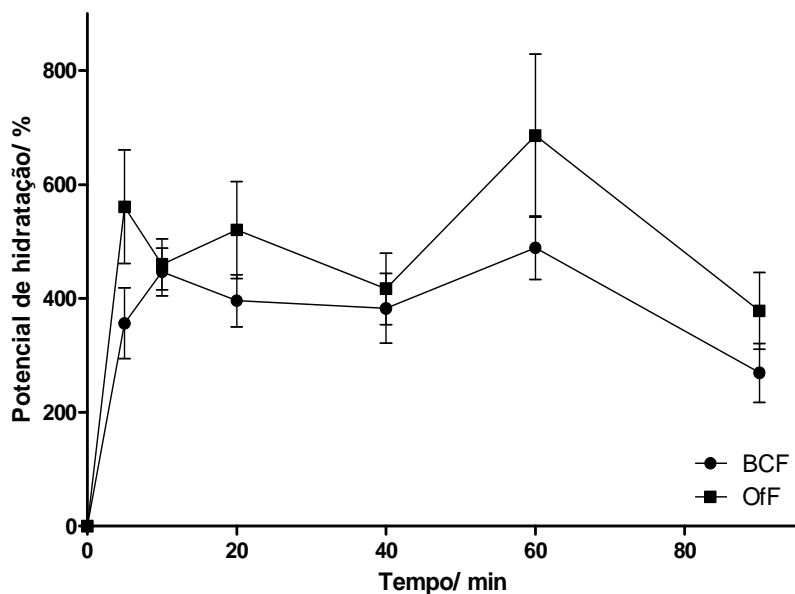


Figura 23. Gráfico de hidratação do filme de quitosana branco (BCF) e do filme de quitosana com ofloxacino (OfF).

As análises dos gráficos permitem sugerir que a hidratação dos filmes com MT e ofloxacino são inferiores as dos filmes de quitosana branco, ou seja, sem fármaco. Esse é um indicativo de que o polímero com fármaco não absorve água da mesma maneira que o mesmo sem fármaco. É possível inferir, portanto, que a presença dos fármacos reduz a propriedade de hidratação dos polímeros.

5.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma das técnicas mais utilizadas na identificação de funções químicas, sendo útil na caracterização de substâncias químicas e fármacos (Silverstein et al., 1994). Ela permite a avaliação de possíveis interações entre o

Resultados e discussão

polímero e o fármaco uma vez que cada material possui grupos químicos distintos que apresentam bandas específicas nos espectros do infravermelho.

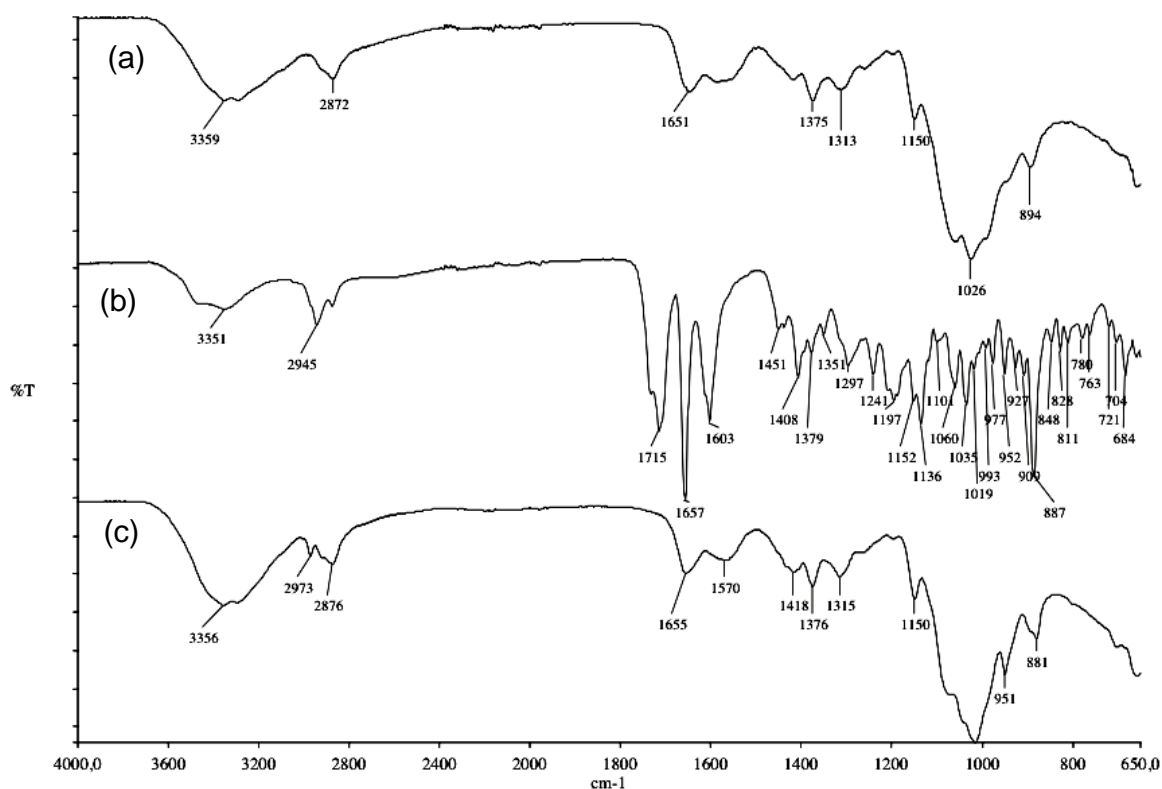


Figura 24. Espectroscopia infravermelho na região de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} do filme de quitosana branco (a), MT (b) e filme de quitosana com MT (c).

A **Figura 24** revela os espectros do infravermelho do filme de quitosana branco, TM e filme de quitosana e MT. O filme sem o fármaco apresenta uma banda em 3359 cm^{-1} e 2872 cm^{-1} atribuído a frequência de estiramento do grupo hidroxila (O-H) e metila (C-H), respectivamente. A banda característica em 1651 cm^{-1} está associada ao estiramento vibracional de grupos amida e amina presentes no polímero. Em relação ao MT, identifica-se uma banda em 3351 cm^{-1} devido ao estiramento vibracional de grupos O-H/N-H, enquanto as bandas em 2945 cm^{-1} estão associadas ao alargamento dos grupos metila presentes no fármaco. Os espectros dos filmes de quitosana e MT preservam picos

Resultados e discussão

similares do filme sem o fármaco (3356 cm^{-1} e 2876 cm^{-1}) confirmando que ambos não são caracteristicamente diferentes. Bandas típicas do MT como 2945 cm^{-1} and 1603 cm^{-1} podem ser identificadas no filme de quitosana com MT indicando estabilidade química do MT no filme de quitosana.

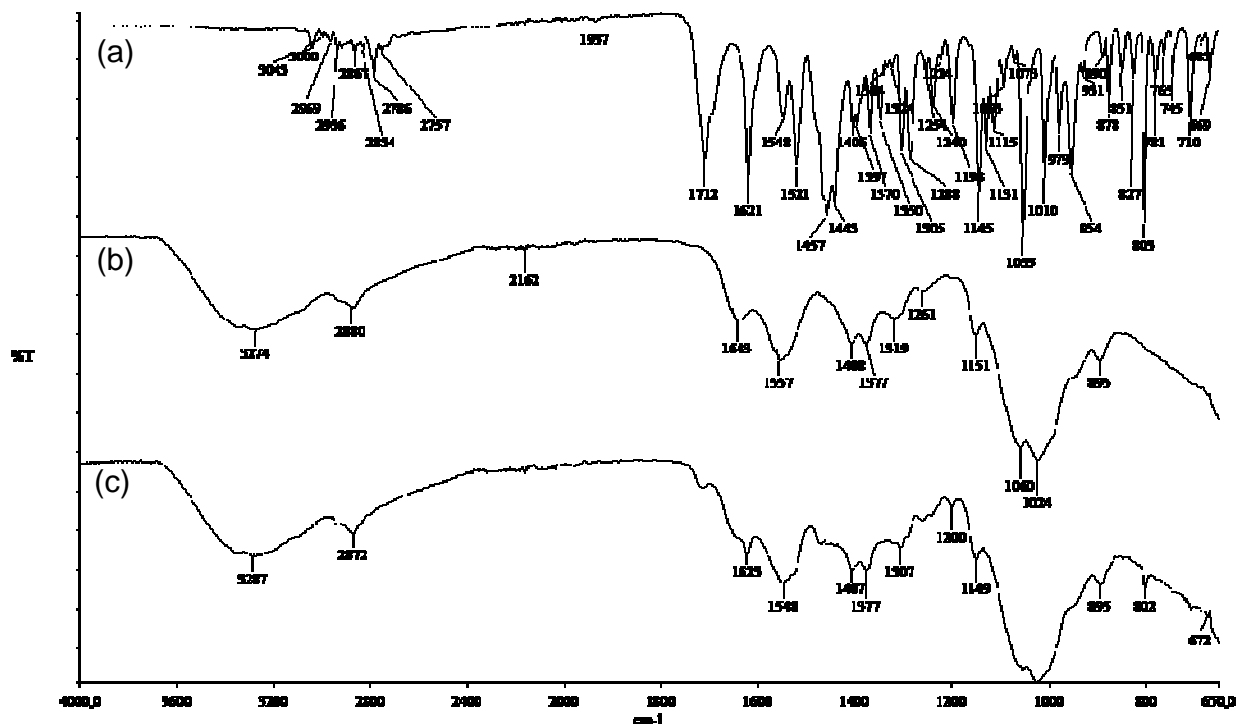


Figura 25. Espectroscopia infravermelho na região de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} do ofloxacino (a), filme de quitosana branco (b) e filme de quitosana com ofloxacino (c).

Na figura acima (**Figura 25**) se observa os espectros na região do infravermelho do ofloxacino, filme de quitosana branco e filme de quitosana com ofloxacino. O filme branco, ou seja, sem o fármaco, apresenta uma banda em 3274 cm^{-1} atribuído ao estiramento vibracional dos grupos hidroxila e outra em 2880 cm^{-1} referente ao grupo metila. Bandas características em 1643 cm^{-1} e 1557 cm^{-1} estão diretamente relacionados com estiramento vibracional de grupos amida e amina respectivamente. No espectro do ofloxacino, a banda 1712 cm^{-1} ocorre devido ao estiramento de ligações de grupos amida e os picos na região de 1621 cm^{-1} , 1548 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} e 1457 cm^{-1} é devido estiramento

Resultados e discussão

vibracional de grupos aromáticos (C=C). O espectro do filme de quitosana com ofloxacino preserva picos característicos do filme sem o fármaco e do ofloxacino. Portanto, bandas características em 1712 cm^{-1} , 1621 cm^{-1} e 1521 cm^{-1} são identificadas no filme com o fármaco sugerindo a inexistência de reações químicas entre a matriz polimérica e o ofloxacino.

A análise da espectroscopia na região do infravermelho demonstrou que não ocorreram reações químicas entre o MT e ofloxacino com a matriz polimérica de quitosana, portanto, sugere-se que tanto o MT como o ofloxacino não perderam a atividade farmacológica quando incorporado no filme de quitosana. Nenhuma alteração significativa foi observada quando comparado os espectros no infravermelho dos filmes placebo e no filmes com MT e ofloxacino.

5.3 Calorimetria exploratória diferencial

Com a finalidade de avaliar possíveis interações entre os componentes dos sistemas desenvolvidos, a análise das transições endodérmicas características da quitosana, filme de quitosana e MT e quitosana e ofloxacino foram realizadas.

Resultados e discussão

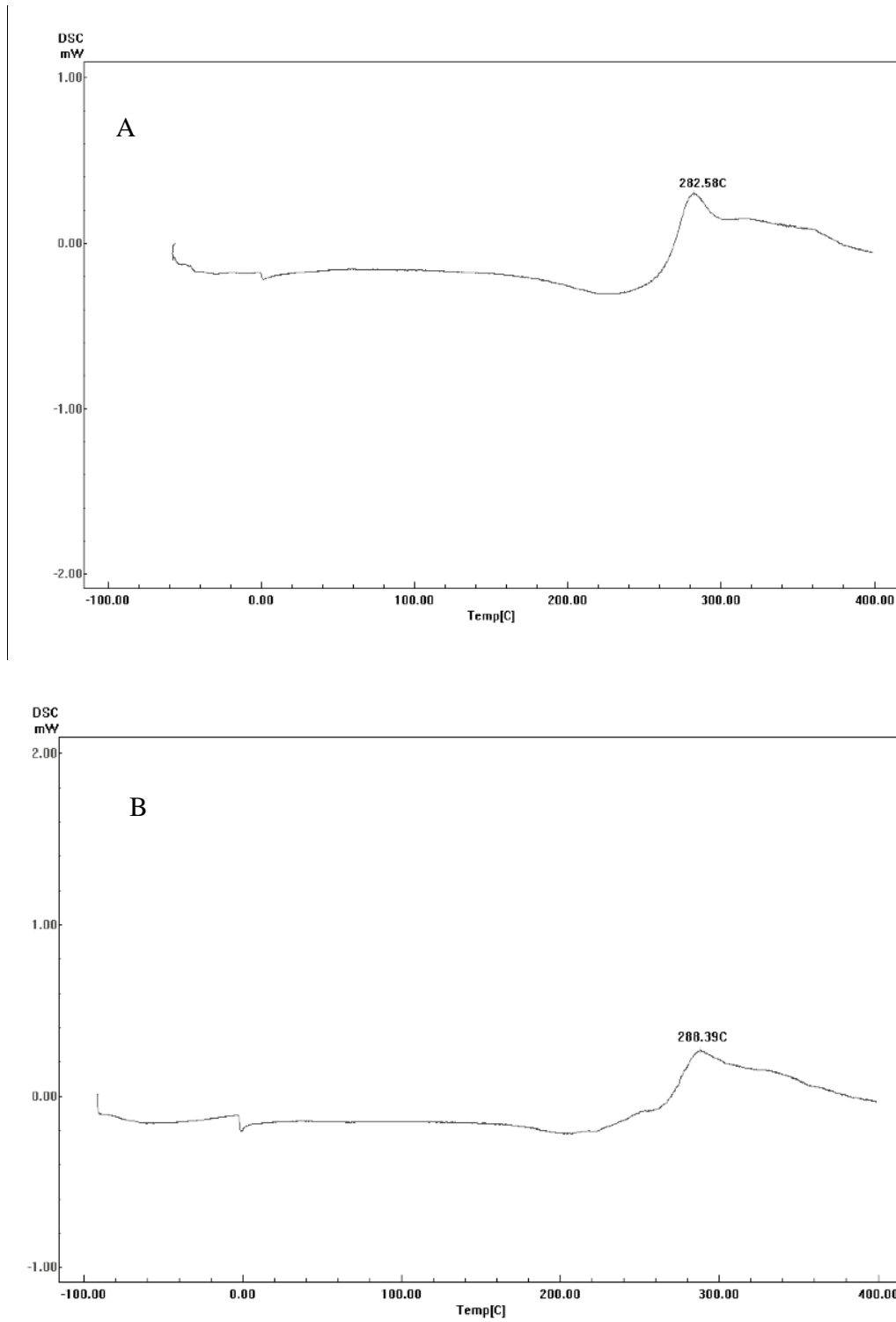
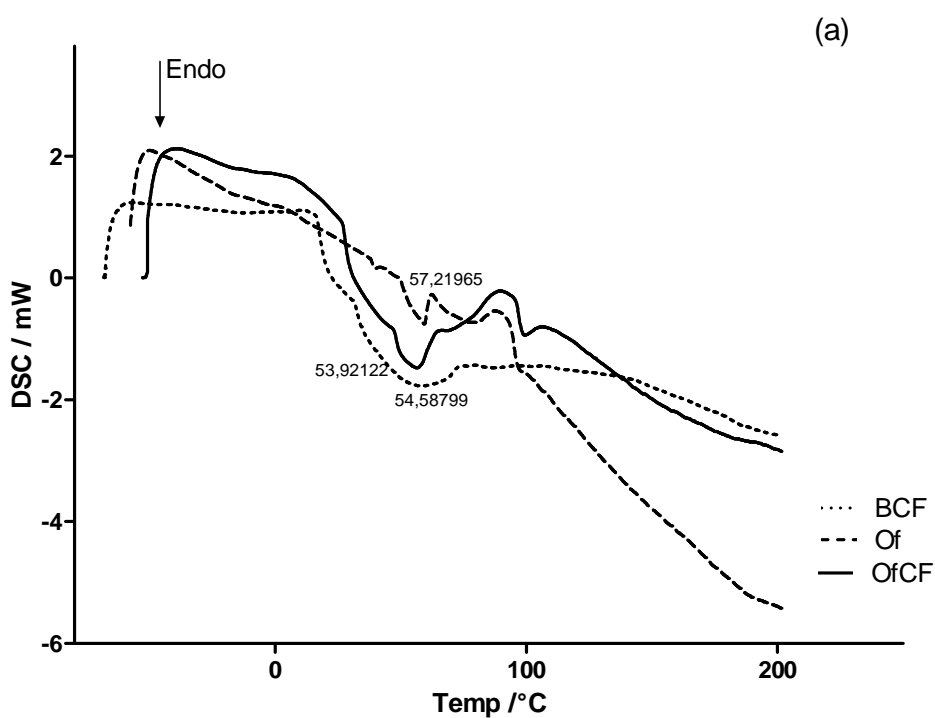


Figura 26. Análises térmicas do filme de quitosana sem o fármaco (A) e quitosana com MT (B).

Resultados e discussão

A partir da análise das curvas de DSC, observa-se que os termogramas do polímero sem o fármaco (**Figura 26A**) e com o MT (**Figura 26B**) são diferentes especificamente na região de degradação da quitosana (280-290°C). Nesta figura, há um pico de degradação exotérmico em 283°C e 288°C que corresponde à degradação da quitosana e quitosana com MT. O aumento da temperatura de degradação observado acima é proveniente da presença do MT no filme de quitosana ocasionando um empacotamento das cadeias poliméricas com o fármaco. Este dado consubstancia ao fato da diminuição da hidratação do filme com fármaco e o alargamento nas bandas observadas no espectro na região do infravermelho. Não foi possível observar o pico de endotérmico referente ao ponto de fusão do MT o que corrobora para um sistema disperso molecularmente.



Resultados e discussão

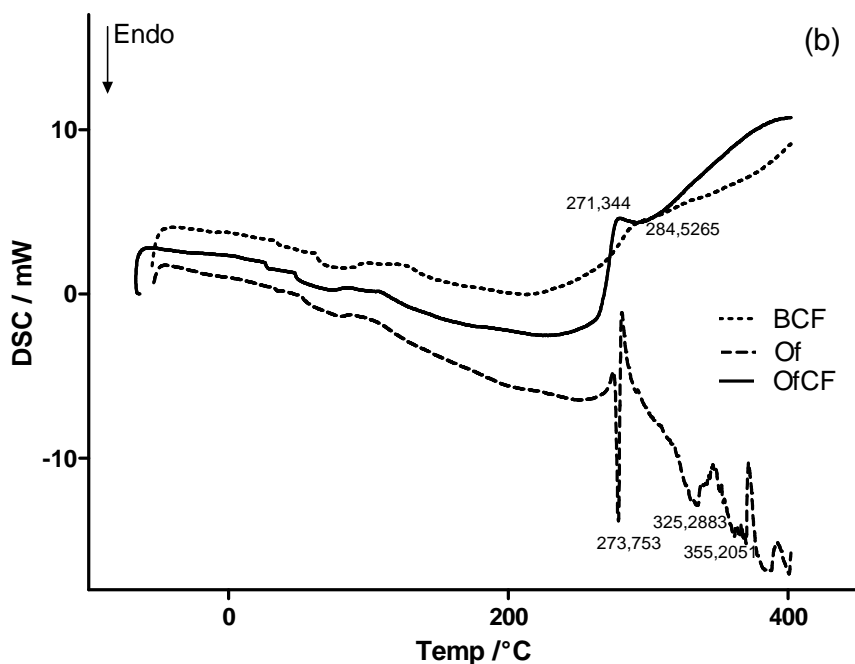


Figura 27. Análises térmicas do filme de quitosana sem o fármaco (BCF), ofloxacino (Of) e quitosana com ofloxacino (OfCF) em (a) corrida 1 e em (b) corrida 2.

De acordo com a **Figura 27**, observa-se um pico endotérmico em 54°C que está relacionado com perda de água e um pico exotérmico em 284°C provocado pela decomposição da quitosana no termograma do polímero branco, ou seja, sem o fármaco. Nota-se a diminuição da temperatura de decomposição da quitosana após a adição do ofloxacino para 271°C. O ponto de fusão do ofloxacino pode ser identificado em 273°C, entretanto, não foi visualizado no termograma do quitosana com o fármaco sugerindo que o ofloxacino está completamente disperso na matriz polimérica. Esses resultados estão de acordo com os achados do infravermelho, uma vez que o fármaco não reagiu com a matriz polimérica.

Resultados e discussão

5.4 Teste de liberação do fármaco *in vitro*

Em relação ao teste de liberação *in vitro*, aproximadamente 85% do MT foi liberado nas primeiras duas semanas sendo o restante liberado em quatro semanas, conforme ilustrado na **Figura 28**.

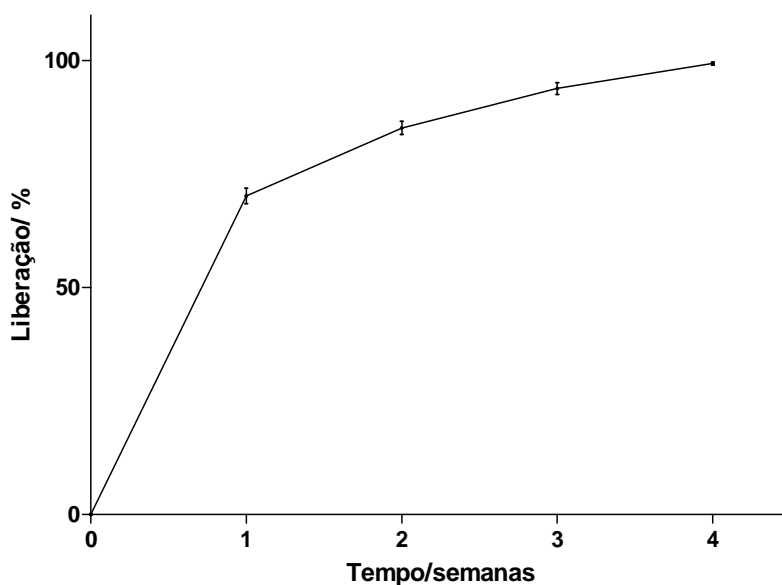


Figura 28. Perfil de liberação *in vitro* do filme de quitosana com MT.

Em relação ao ofloxacino, aproximadamente 70 % do fármaco foi prontamente liberado na primeira hora, entretanto, o restante não foi liberado permanecendo no arcabouço da matriz polimérica (**Figura 29**). Esse resultado foi diferente do observado em relação ao filme de quitosana e MT, onde praticamente todo o fármaco foi liberado. Uma maior interação entre a matriz polimérica e o fármaco como também solubilidade distinta pode explicar este fenômeno.

Resultados e discussão

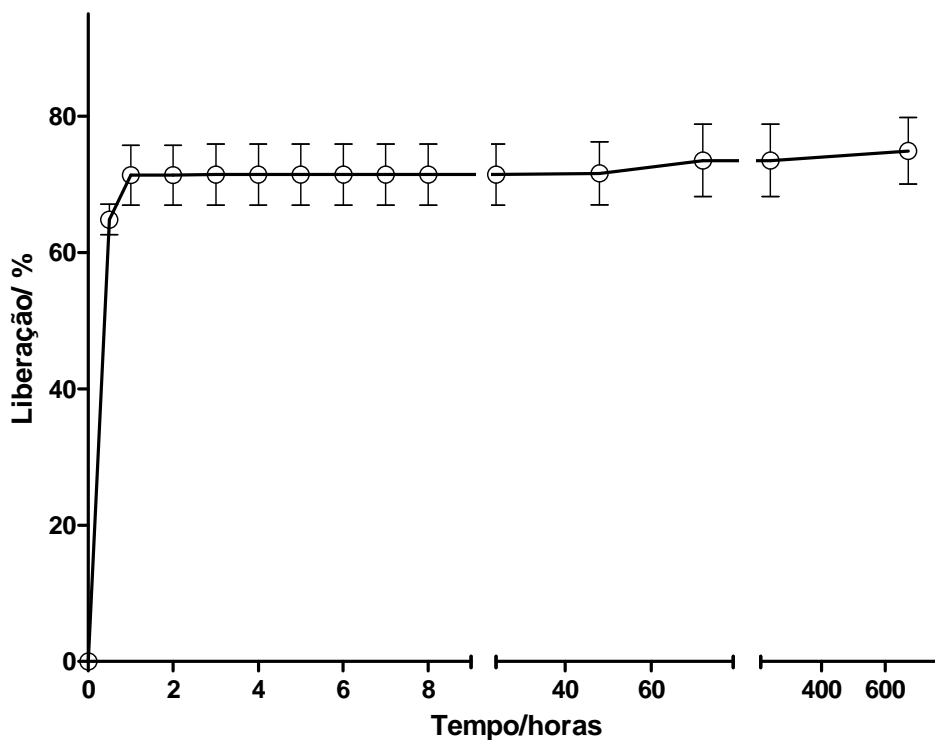


Figura 29. Perfil de liberação *in vitro* do filme de quitosana com ofloxacino.

5.5 Teste de eficácia *in vitro*

A presença e estabilidade do ofloxacino no filme de quitosana foram confirmadas pelos resultados da caracterização supracitados. Nesse contexto, objetivou-se investigar se esta fluorquinolona manteve o seu efeito antimicrobiano após o desenvolvimento farmacotécnico.

O filme de quitosana e ofloxacino apresentou maior halo de inibição de *Staphylococcus aureus* em comparação com o disco comercial a base de ciprofloxacino ($P < 0.001$). Entretanto, não houve diferença estatística no halo de inibição bacteriana do implante de quitosana e ofloxacino e disco estéril embebido em ofloxacino 0,3% ($P < 0.05$). O filme de quitosana sem fármaco apresentou um discreto halo de inibição bacteriano. Esses resultados estão ilustrados na **Figura 30**.

Resultados e discussão

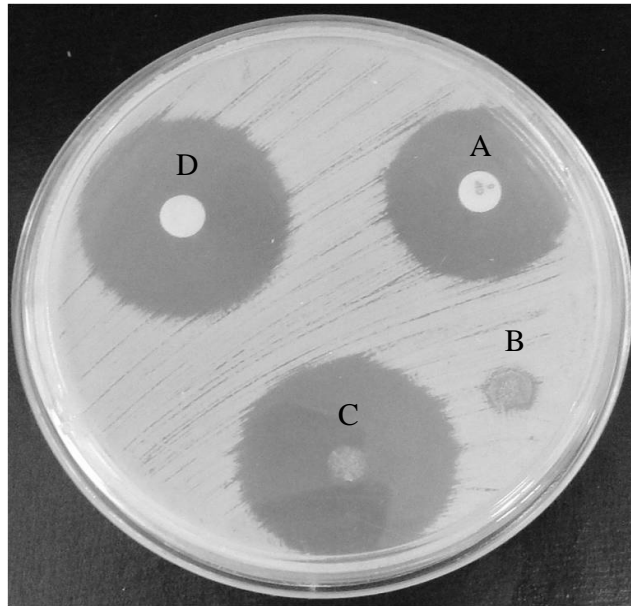


Figura 30. Fotografia da zona de inibição bacteriana. Meio de cultura com *Staphylococcus aureus* mostrando zona de inibição com (A) disco controle comercial de ciprofloxacino, (B) filme de quitosana sem fármaco, (C) filme de quitosana com ofloxacino e (D) disco estéril embebido em ofloxacino 0,3%.

Similarmente, o filme de quitosana e ofloxacino apresentou significativo halo de inibição de *Pseudomonas aeruginosa* em comparação com o disco comercial a base de enrofloxacin (P<0,0001). Entretanto, não houve diferença estatística no halo de inibição bacteriana do implante de quitosana e ofloxacino e disco estéril embebido em ofloxacino 0,3% (P<0,05). O filme de quitosana sem fármaco apresentou um discreto halo de inibição bacteriano (**Figura 31**).

Resultados e discussão

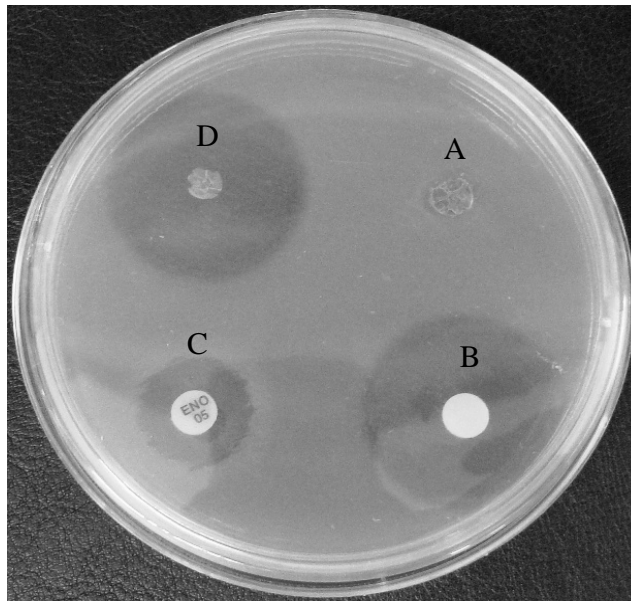


Figura 31. Fotografia da zona de inibição bacteriana. Meio de cultura com *Pseudomonas aeruginosa* mostrando zona de inibição com (A) filme de quitosana sem fármaco, (B) disco estéril embebido em ofloxacino 0,3%, (C) disco controle comercial de enrofloxacino e (D) filme de quitosana com ofloxacino.

A **Tabela 1** ilustra os valores detalhados expressos a cerca do halo de inibição obtido com o filme de quitosana sem fármaco, disco controle de ciprofloxacino ou enrofloxacino, disco estéril embebido em ofloxacino 0,3% e filme de quitosana com ofloxacino em meio com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Resultados e discussão

Tabela 1 – Comparação do halo de inibição bacteriano entre o filme de quitosana sem fármaco, disco controle comercial, disco estéril embebido em ofloxacino 0,3% e filme de quitosana e ofloxacino. Os dados são expressos em milímetros e representados como a média \pm o desvio-padrão (n=6).

| Amostra | Quitosana sem fármaco | Disco controle comercial | Disco com ofloxacino 0,3% | Quitosana e ofloxacino |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6,83 \pm 0,75 | 27,50 \pm 1,04 | 30,83 \pm 0,75 ^a | 31,83 \pm 1,47 ^a |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6,66 \pm 0,81 | 15,33 \pm 0,51 | 27,66 \pm 0,81 ^b | 28,33 \pm 0,51 ^b |

^a Disco com ofloxacino 0,3% (Oflox[®]) vs. quitosana e ofloxacino ($P < 0,05$).

^b Disco com ofloxacino 0,3% (Oflox[®]) vs. Quitosana e ofloxacino ($P < 0,05$).

As propriedades antimicrobianas da quitosana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram observadas nesse trabalho. Além do efeito bactericida, a quitosana favorece a cicatrização de feridas e apresenta propriedades hemostáticas (King et al., 1990; Cho et al., 1999; Ueno et al., 1999; Mizuno et al., 2003). Essas características não foram avaliadas neste estudo, uma vez que, optou-se por não induzir infecções nem tampouco lesões nos tecidos oculares dos coelhos. Por outro lado, Noel e colaboradores, avaliando filme de quitosana em meio com *S. aureus*, não observaram inibição do crescimento bacteriano (Noel et al., 2008).

S. aureus e *P. aeruginosa* são frequentemente envolvidas em enfermidades da córnea e conjuntiva de caninos, felinos e equinos (Whitley, 2000; Keller e Hendrix, 2005). Além dos animais domésticos, essas bactérias são comumente responsáveis por conjuntivite e ceratite em humanos (Daniell et al., 2003). Nas ceratites ulcerativas, *P. aeruginosa* provoca lesão grave com potencial de perfuração ocular e perda da visão (Whitley, 2000; Keller e Hendrix, 2005). Baseado no agente infeccioso, espectro de ação e baixa

Resultados e discussão

toxicidade, o ofloxacino representa uma boa escolha no tratamento de infecções na superfície ocular dos animais domésticos e humanos (Whitley, 2000; Daniell et al., 2003; Keller e Hendrix, 2005).

5.6 Teste de liberação do fármaco *in vivo*

5.6.1 Implantes de quitosana e maleato de timolol

Na primeira parte do experimento *in vivo* objetivou-se comparar a resposta farmacológica da apresentação comercial de referência de MT 0,5% (Timoptol[®], Merck Sharp & Dohme Farmaceutica Ltda, São Paulo, Brasil) com o polímero de quitosana com o mesmo fármaco na redução da PIO no OD de coelhos normotensos. Além disso, investigar a magnitude da redução da PIO no olho não tratado, ou seja, o OE.

Os filmes de quitosana e MT foram cortados em circunferências de 4 mm de diâmetro, 8 mg de peso e 130 µm de espessura aproximadamente. Antes de administrar os filmes no saco conjuntival é necessário hidratá-los em solução salina por 10 segundos para potencializar o processo de mucoadesão. A **Figura 32** ilustra os filmes de quitosana e MT antes e depois da hidratação.

Resultados e discussão

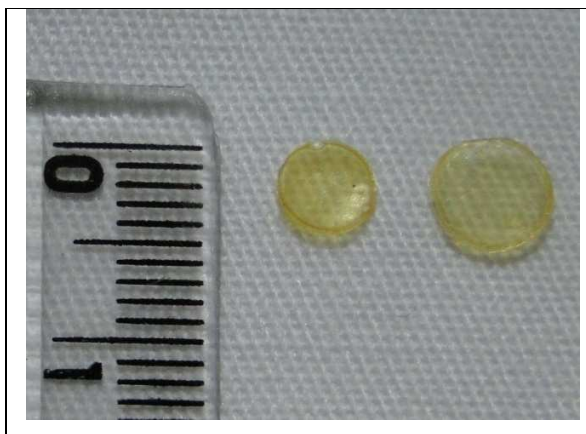


Figura 32. Fotografia dos implantes de quitosana e MT antes (esquerda) e depois (direita) da hidratação em solução salina.

A duração do experimento foi de aproximadamente 12 semanas onde quatro dos cinco coelhos retornaram aos valores de PIO iniciais e anteriores a administração dos filmes de quitosana e MT. A partir destas informações determinamos o tempo médio de liberação do MT do filme de quitosana *in vivo*. O teste de liberação *in vivo* foi realizado de forma indireta, ou seja, a partir da resposta farmacodinâmica, pois, não se determinou a quantidade do fármaco na lágrima e nos tecidos oculares.

Resposta farmacológica no olho direito (OD)

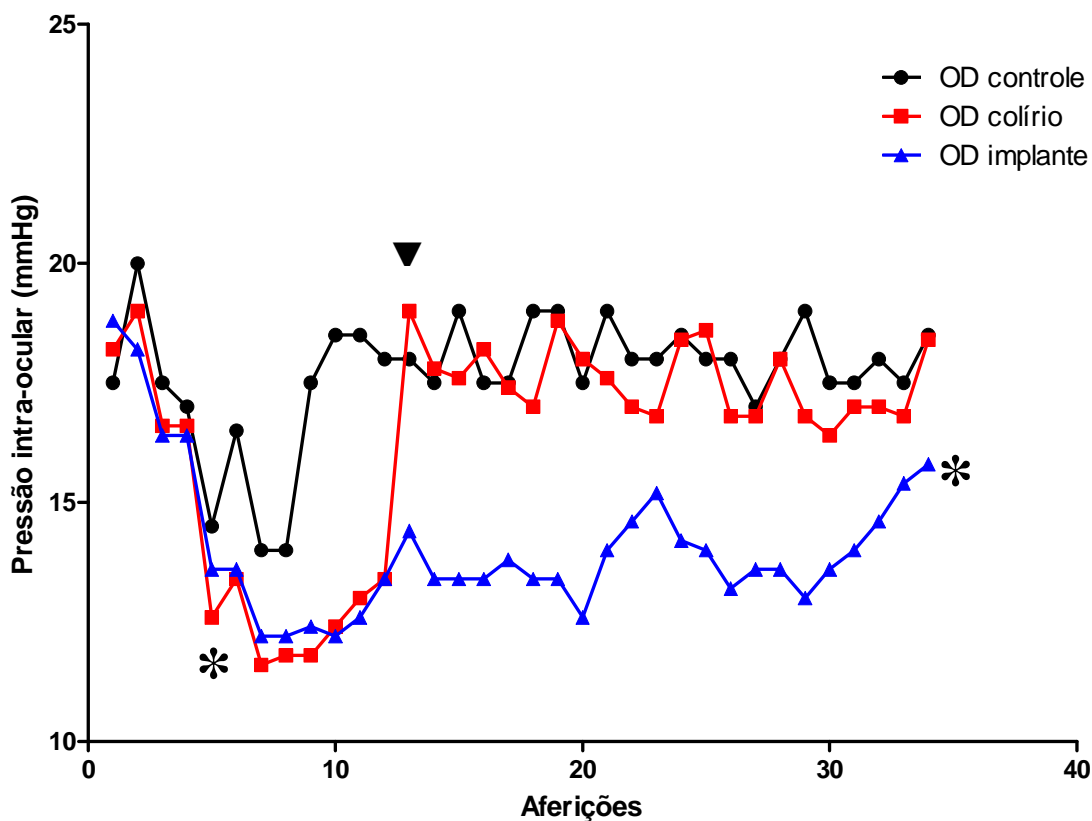


Figura 33. Gráfico ilustrando a redução da PIO no OD tratado com o colírio (Timoptol®) e administrado o filme de quitosana e MT.

A partir das informações contidas no gráfico acima (**Figura 33**) podemos concluir que houve redução da pressão no OD tratado com o colírio e com o implante de MT iniciando na quinta aferição (asterisco) até a 12ª aferição totalizando 15 dias. Após este período, não se instilou mais o colírio de MT e a PIO retornou rapidamente aos valores iniciais, ou seja, próximo aos valores do grupo controle (seta). Por outro lado, nos animais que receberam os implantes de quitosana com MT, a PIO se manteve baixa, ou seja, inferior ao grupo controle por 10 semanas, quando iniciou o retorno aos valores normais (asterisco).

A **Figura 34** ilustra informações semelhantes à figura anterior, entretanto, acrescida dos valores de desvio-padrão para cada aferição no OD.

Resposta farmacológica no olho direito (OD)

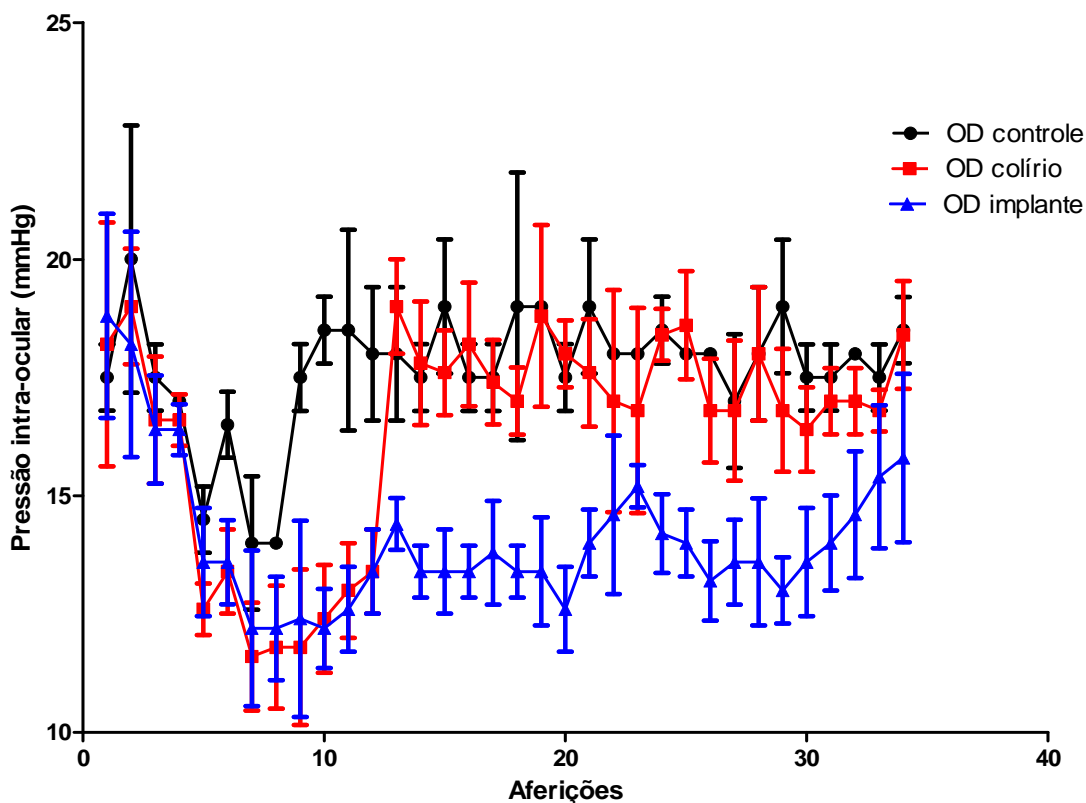


Figura 34. Gráfico ilustrando o desvio-padrão na redução da PIO no OD tratado com o colírio (Timoptol®) e administrado o filme de quitosana com o MT.

Devido a absorção sistêmica do MT este fármaco possui a capacidade de diminuir também a PIO no olho contra-lateral, ou seja, olho não tratado (OE). Portanto, o fármaco liberado do colírio assim como do implante reduziu a PIO a partir da quinta aferição (asterisco) até a 12ª aferição no OE durante 15 dias. Após este período, não se instilou mais o colírio de MT no OD e a PIO retornou rapidamente aos valores iniciais, ou seja, próximo aos valores do grupo controle (seta). Por outro lado, nos animais que receberam os implantes de quitosana com MT no OD, a PIO no OE se manteve baixa, ou seja, inferior ao grupo controle por 10 semanas, quando iniciou o retorno aos valores normais

Resultados e discussão

(asterisco). Seguem abaixo as informações referentes à resposta farmacológica na diminuição da pressão no OE (**Figura 35**).

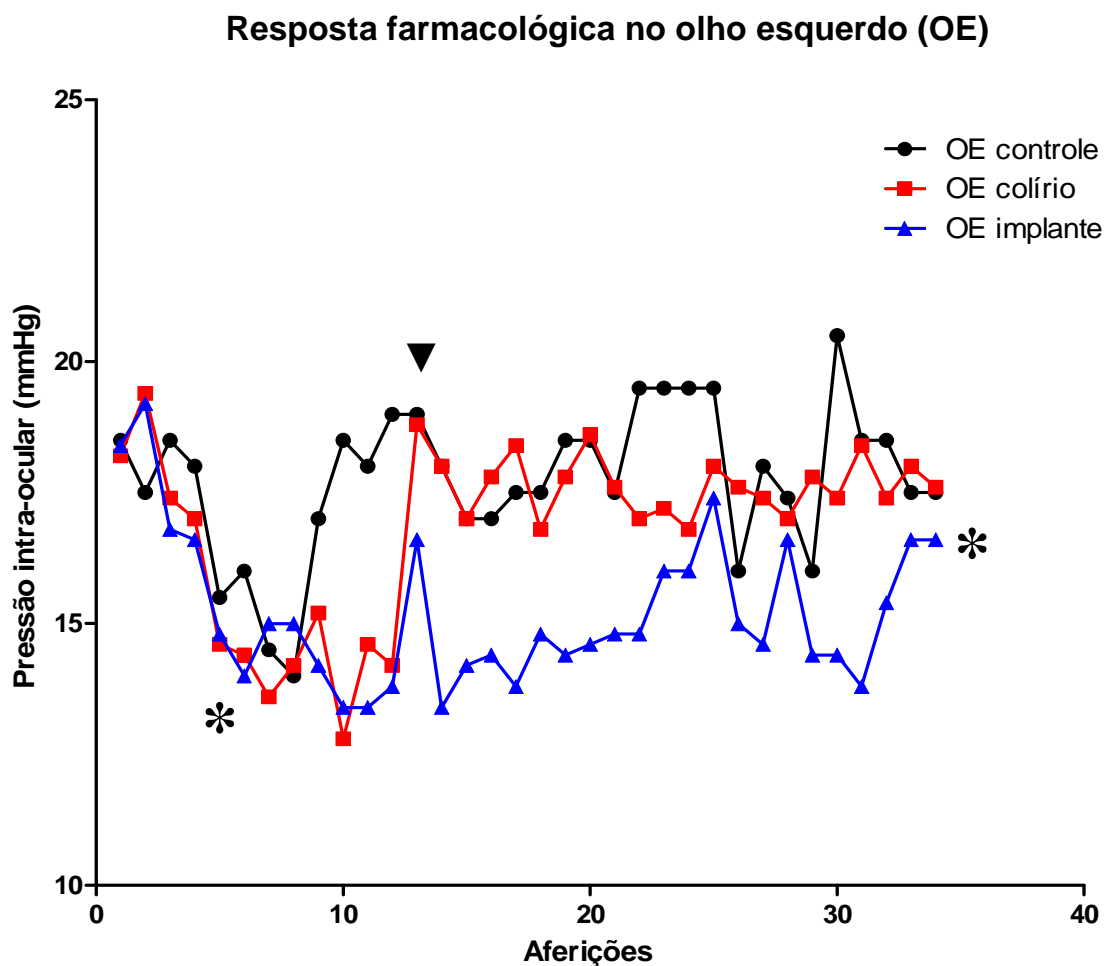


Figura 35. Gráfico ilustrando a redução da PIO no olho não tratado (OE).

Os resultados demonstrados na **Figura 35** são esperados, pois, quando o MT é instilado em um dos olhos, diminui a pressão de ambos. Estas informações estão de acordo com os estudos de Zimmerman e colaboradores (1979), Wilkie e Latimer (1991) e Dunham e colaboradores (1994) (Zimmerman et al., 1979; Wilkie e Latimer, 1991; Dunham et al., 1994). Portanto, após a instilação do colírio contendo o fármaco e administração do sistema contendo quitosana com MT no OD houve redução da PIO em ambos os olhos.

Resultados e discussão

A figura abaixo (**Figura 36**) ilustra informações semelhantes à figura anterior, entretanto, acrescida dos valores de desvio-padrão para cada aferição no olho esquerdo.

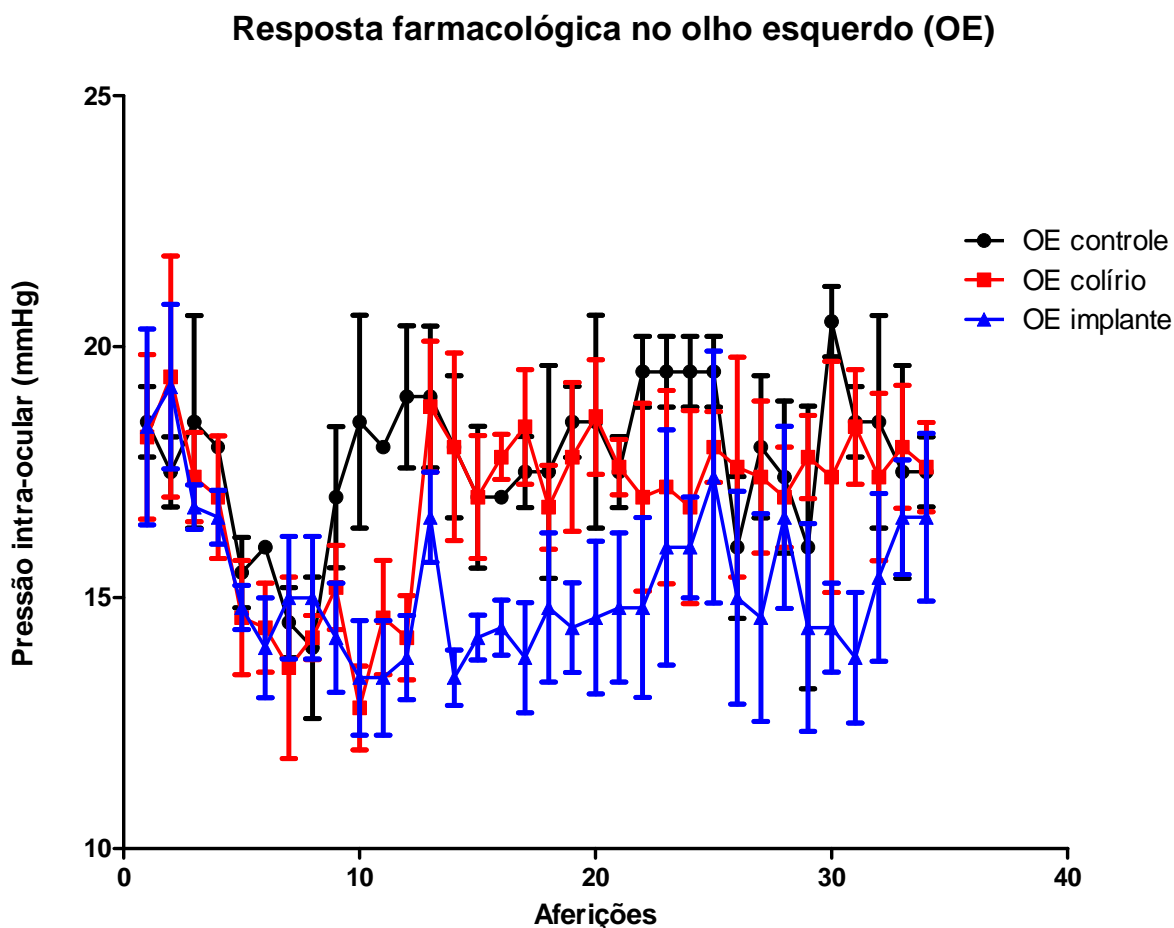


Figura 36. Gráfico ilustrando o desvio-padrão na redução da PIO no olho não tratado (OE).

Não houve diferença estatística entre a magnitude da redução da PIO no OD dos animais tratados com apresentação comercial e o filme de quitosana e MT entre a quinta e a 12ª aferição ($P < 0,05$). Observou-se redução média da PIO dos coelhos tratados com o polímero de quitosana e MT até a 10ª semana, portanto, ocorreu liberação do fármaco na superfície ocular até este período. De forma similar, não houve diferença estatística na

Resultados e discussão

intensidade da redução da PIO no OE decorrente dos dois tratamentos no OD no período em questão ($P < 0,05$). Como 85% do fármaco foi liberado no final da segunda semana totalizando em quatro semanas *in vitro*, conclui-se que o filme de quitosana e MT libera mais lentamente *in vivo* que *in vitro* (em condição “sink”).

Após o exame clínico geral e oftalmológico não se observou sinais de incomodo ocular como hiperemia conjuntival, lacrimejamento, ulcerações corneanas e prurido periorcular nos grupos 2 e 3 correspondentes ao tratamento. (Figura 37 e 38). O corante a base de fluoresceína não evidenciou lesão na córnea demonstrando ainda integridade do sistema lacrimal. Não houve diferença na quantidade de ingestão de alimento nem tampouco no ganho de peso entre os grupos de animais tratados com a apresentação comercial convencional e nos administrados com filme de quitosana e MT.



Figura 37. Fotografia de olho de coelho com filme de quitosana e MT. Notar olho calmo sem sinais de incômodo ou irritação ocular.

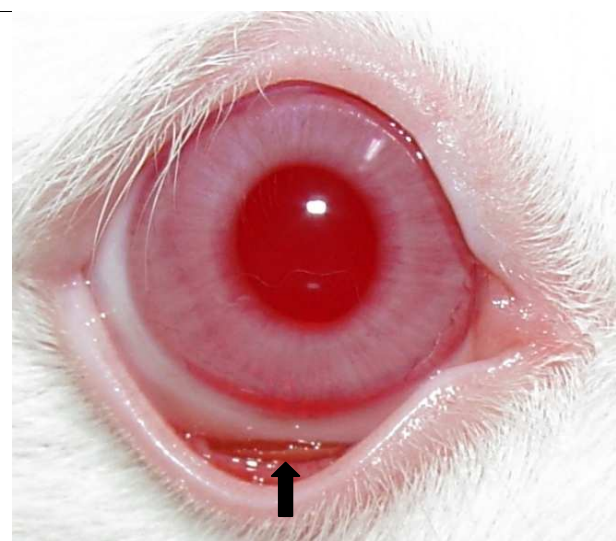
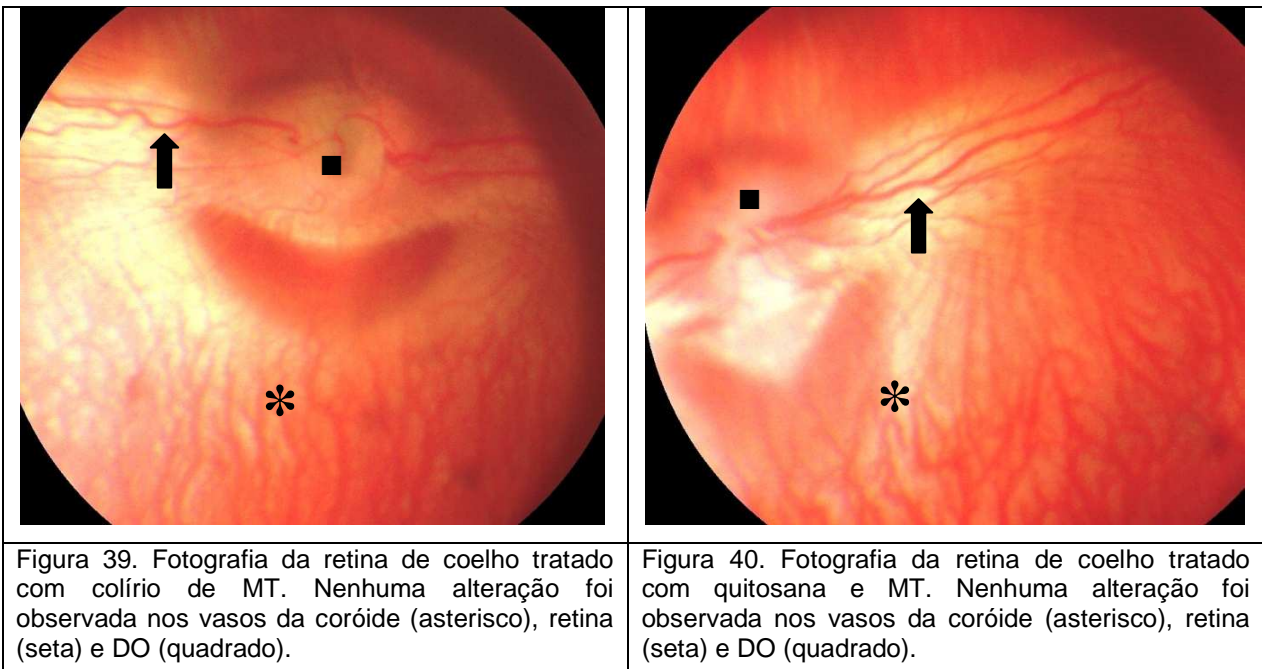


Figura 38. Fotografia do mesmo olho da figura anterior. Notar o implante no saco conjuntival ao puxar ventralmente a pálpebra inferior (seta).

Grunwald observou que o MT aumenta o fluxo sanguíneo da retina em olhos normotensos e hipertensos (Grunwald 1990a; Grunwald, 1990b). Entretanto, outros autores relataram diminuição do fluxo sanguíneo da retina e DO durante o tratamento com o mesmo fármaco (Schmetterer et al., 1997; Yoshida et al., 1998). Apesar de não existir consenso,

Resultados e discussão

o aumento da irrigação da retina e DO é um aspecto fundamental do tratamento do glaucoma, uma vez que, diminui os processos isquêmicos responsáveis pelo déficit visual de pacientes com glaucoma. No presente trabalho, não foram observados alterações no padrão vascular da coróide, retina e DO dos animais tratados com MT à oftalmoscopia direta, indireta, biomicroscopia com lâmpada em fenda e retinoscopia (**Figura 39 e 40**). Novos estudos envolvendo metodologias específicas como fluxometria por laser doppler são necessários para avaliar o efeito do tratamento com implante de quitosana no fluxo vascular do segmento posterior do olho de coelhos. Estes resultados estão mais detalhados em Fulgêncio e colaboradores (2012).



5.6.2 Implantes de quitosana e ofloxacino

Na segunda parte do experimento *in vivo* objetivou-se determinar a concentração do ofloxacino na lágrima de coelhos hígidos, ou seja, sem oftalmopatias submetidos ao

Resultados e discussão

tratamento com apresentação comercial de referência contendo ofloxacino 0,3% (Oflox[®], Allergan, São Paulo, Brasil) e polímero de quitosana e mesmo fármaco.

Os filmes de quitosana e ofloxacino foram cortados em circunferências de 5 mm de diâmetro com 7 mg de peso e 110 μ m de espessura aproximadamente (**Figura 41**). Antes de administrar os filmes no saco conjuntival foi necessário hidratá-lo em solução salina por 20 segundos para facilitar o processo de mucoadesão.



Figura 41. Fotografia do implante de quitosana e ofloxacino antes da hidratação em solução salina.

A determinação da concentração do ofloxacino na lágrima dos animais foi determinada por um método bioanalítico especificamente desenvolvido para esse fim. O método consiste na aplicação da técnica de CLAE acoplada a um DM para analisar as amostras de lágrimas dos animais colhidas. A metodologia foi validada segundo requisitos da ANVISA para métodos bioanalíticos (RDC 899 de 2003) e sua aplicação permitiu dosar a quantidade de ofloxacino que foi liberada da apresentação comercial e pelo filme de quitosana (Byrro et al., 2012).

Resultados e discussão

A **Tabela 2** ilustra com detalhes a concentração de ofloxacino na lágrima dos coelhos tratados com o colírio a base de ofloxacino 0,3% e com o implante de quitosana e ofloxacino. O pico de concentração do antimicrobiano (C_{max}) para os animais que receberam o implante foi de $1095,54 \pm 121,59$ ng/mL, em 0,5 h. A concentração mínima quantificável (C_{min}) ocorreu em 120 h e foi de $12,78 \pm 1,39$ ng/mL. A área sob a curva de concentração *versus* tempo é de $13524,09 \pm 2263,81$ ng*h/mL. O pico de concentração do ofloxacino (C_{max}) para os animais que receberam o colírio até 7 h foi de $121,09 \pm 10,84$ ng/mL, em 0,5 h. A concentração mínima quantificável (C_{min}) ocorreu em 7 h e foi de $12,61 \pm 1,78$ ng/mL. A área sob a curva de concentração *versus* tempo é de $191,36 \pm 16,60$ ng*h/mL.

Quando se compara a eficácia dos dois tratamentos, observa-se que não há diferença estatística na concentração do ofloxacino na lágrima dos coelhos 2 h após a instilação do colírio a base de ofloxacino 0,3% ($35,13 \pm 5,26$ ng/mL) e nos animais tratados com os implantes, 72 h após a administração do mesmo ($33,60 \pm 3,23$ ng/mL) ($P=0,4544$). De forma similar, não há diferença estatística na concentração do ofloxacino na lágrima dos coelhos 7 h após a instilação do colírio a base de ofloxacino 0,3% ($12,61 \pm 1,78$ ng/mL) quando comparado com os animais tratados com os implantes, 72 h após a administração do mesmo ($12,78 \pm 1,39$ ng/mL) ($P=0,8336$) (**Tabela 2**).

Resultados e discussão

Tabela 2 – Concentração do ofloxacino na lágrima de coelhos tratados com 50µL de ofloxacino 0,3% (Oflox[®]) e filme de quitosana e ofloxacino.

| Tempo | Colírio a base de ofloxacino 0,3% | Filme de quitosana e ofloxacino |
|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| N | 6 | 12 |
| 0,5 h | 121,09 ± 10,84 | 1095,54 ± 121,59 |
| 2 h | 35,13 ± 5,26 ^a | 801,50 ± 114,01 |
| 4 h | 14,20 ± 1,97 | - |
| 5 h | - | 521,43 ± 148,84 |
| 7 h | 12,61 ± 1,78 ^b | - |
| 10 h | - | 372,59 ± 87,58 |
| 16 h | - | 201,04 ± 59,66 |
| 24 h (Dia 1) | - | 127,65 ± 35,50 |
| 48 h (Dia 2) | - | 65,96 ± 14,76 |
| 72 h (Dia 3) | - | 33,60 ± 3,23 ^a |
| 96 h (Dia 4) | - | 20,72 ± 1,99 |
| 120 h (Dia 5) | - | 12,78 ± 1,39 ^b |
| (C_{max} µg/mL) | 121,09 ± 10,84 | 1095,54 ± 121,59 |
| (C_{min} µg/mL) | 12,61 ± 1,78 | 12,78 ± 1,39 |
| AUC_(0,5-7h) | 191,36 ± 16,60 | - |
| AUC_(0,5-120h) | - | 13524,09 ± 2263,81 |

^a Ofloxacino 0,3% (Oflox[®]) vs. filme de ofloxacino $P=0,4544$.

^b Ofloxacino 0,3% (Oflox[®]) vs. filme de ofloxacino $P=0,8336$.

A **Figura 42** ilustra as curvas de liberação obtidas pela concentração do ofloxacino na lágrima de coelhos submetidos ao tratamento com colírio a base de ofloxacino 0,3 % e implante de quitosana e ofloxacino durante 120 h ou cinco dias. No sexto dia, a concentração do ofloxacino na lágrima de sete dos 12 olhos com implantes (58,3%) e, no sétimo dia, em cinco animais (41,6%) estava abaixo de 10 ng/mL. Nestes casos foi

Resultados e discussão

possível afirmar que havia o fármaco na lágrima, entretanto, não foi possível quantificá-lo. Através desta informação, concluiu-se que os implantes de quitosana e ofloxacino liberaram o fármaco pelo menos cinco dias *in vivo*. Ao contrário do primeiro experimento, o teste de liberação foi realizado de forma direta, ou seja, determinando a quantidade do fármaco na lágrima.

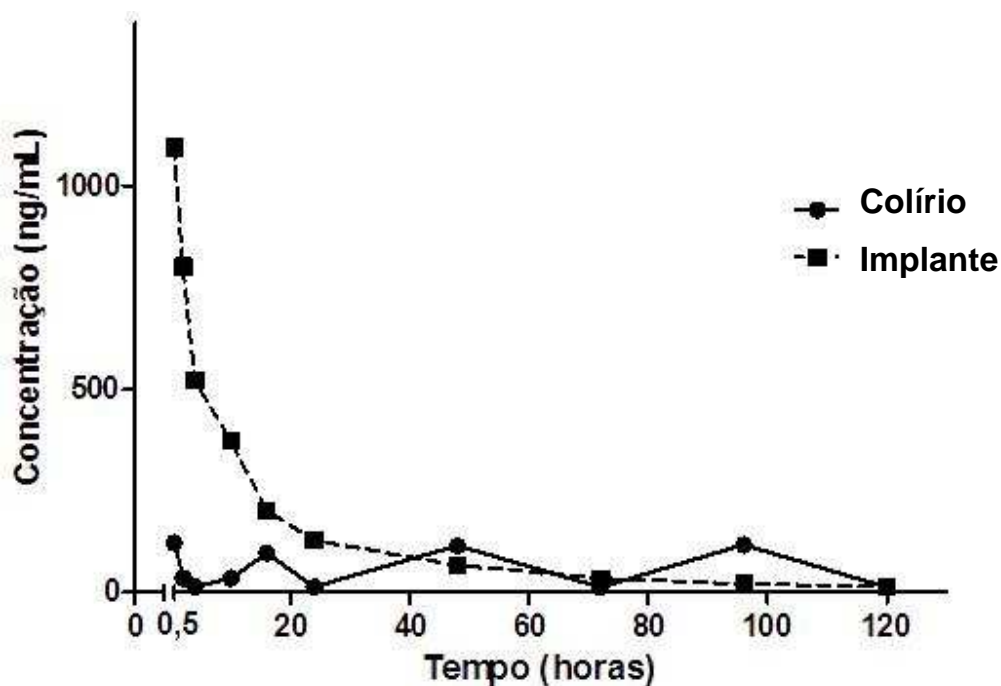


Figura 42. Curvas da concentração média do ofloxacino na lágrima de coelhos tratados com ofloxacino a 0,3% (colírio) e implante de quitosana e ofloxacino (implante).

Foi necessária a imersão em solução salina de 10 e 20 segundos para os implantes de MT e ofloxacino, respectivamente, antes da administração no saco conjuntival dos coelhos. Este processo é importante para potencializar o processo de mucoadesão e evitar lesão na superfície ocular, tanto na córnea quanto na conjuntiva. Entretanto, sem a imersão, os implantes podem causar ulceração na mucosa decorrente da capacidade de absorver água ou ainda não aderir corretamente na mucosa. Por outro lado, prolongado tempo de imersão torna os implantes frágeis e de difícil manipulação.

Resultados e discussão

Após a administração, o filme de quitosana com ofloxacino formou um gel dispersando sobre o saco conjuntival (**Figura 43**). Este fenômeno foi observado anteriormente em um estudo que avaliou implante de quitosana e ofloxacino em coelhos (Di Colo et al., 2002). Não foi possível determinar a causa, porém, provavelmente, está relacionada com aspectos específicos na interação entre o ofloxacino, matriz polimérica e a mucosa conjuntival. Estudos futuros fazem-se necessário para avaliar este fenômeno e determinar as possíveis causas.

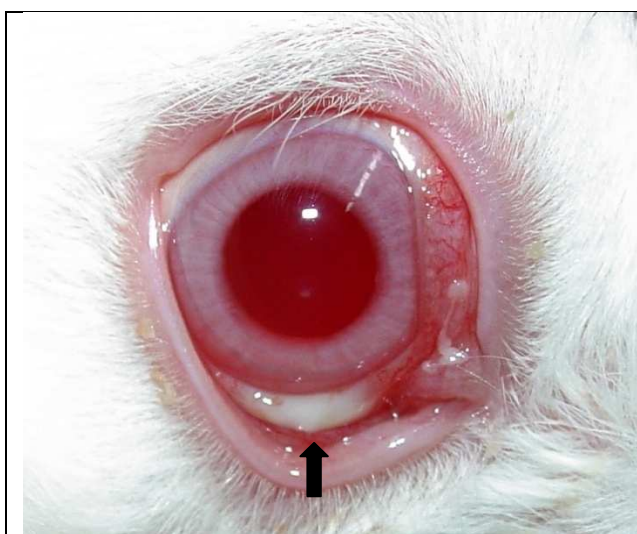


Figura 43. Fotografia de olho de coelho com implante de quitosana e ofloxacino no saco conjuntival (seta).

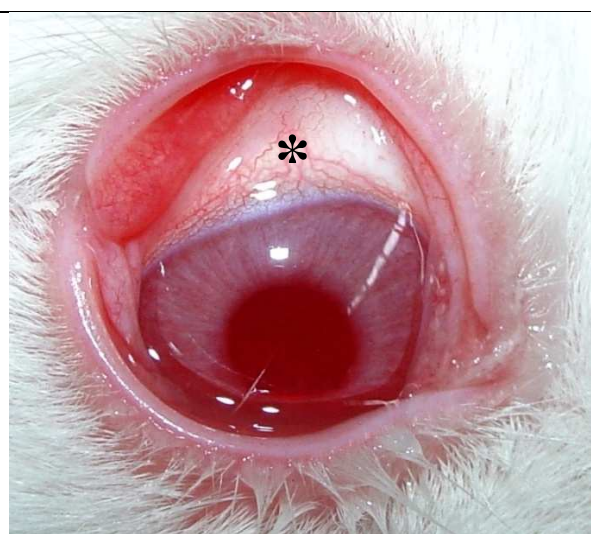


Figura 44. Fotografia de olho de coelho com hiperemia conjuntival e lacrimejamento discretos (asterisco).

Dois coelhos (16,6%) apresentaram hiperemia conjuntival e lacrimejamento discretos no OD com resolução espontânea em 48 h não apresentando recidivas (**Figura 44**). Excetuando essas alterações, não se observou sinais de incomodo ocular como ulcerações corneanas e prurido periocular. Os animais tratados com os filmes de quitosana mantiveram os olhos abertos e calmos durante o experimento e não foram aparentemente distinguíveis do grupo que recebeu colírio de ofloxacino. Além disso, corante a base de fluoresceína não evidenciou ulceração na córnea e demonstrou patência do sistema lacrimal. Não houve diferença na quantidade de ingestão de alimento nem tampouco no ganho de peso entre os grupos de coelhos tratados e não tratados.

Resultados e discussão

Os implantes conjuntivais apresentam muitas vantagens em relação aos intraoculares. Esses últimos podem causar déficit visual durante e após a administração com potencial de provocar várias enfermidades oculares (Jaffe et al., 2006; Kappel et al., 2006). Catarata, endoftalmite, hemorragia vítrea, descolamento de retina e variações na PIO são as principais complicações relatadas com o uso de implantes intraoculares (Jaffe et al., 2006; Kappel et al., 2006; Debra et al., 2007). É necessária prática e treinamento em microcirurgia para aprender e dominar a técnica para administração segura do mesmo dentro do olho. Além disso, anestesia geral é essencial para segurança do paciente potencializando a taxa de sucesso nas aplicações dos implantes. Por outro lado, os implantes intraoculares aumentam a biodisponibilidade com liberação prolongada de fármacos no segmento posterior do olho diminuindo os efeitos adversos e aumentando a taxa de sucesso quando comparados com os tratamentos convencionais (Fialho et al., 2008).

Neste estudo, nenhuma contenção física ou farmacológica como tranquilização, sedação ou anestesia geral foi utilizada para a administração dos implantes. Os filmes de quitosana foram facilmente aplicados puxando a pálpebra inferior ventralmente e expondo o saco conjuntival, após administração de colírio anestésico.

Sistemas de liberação de fármacos no olho objetivam manter a concentração satisfatória do mesmo e por tempo prolongado durante a terapêutica oftálmica (Urtti, 2006; Regnier, 2007). Assim, permite uma liberação mais constante dos fármacos evitando grandes oscilações decorrentes das instilações de colírios. Isto é de grande valia quando se trata de fármacos causadores de efeitos sistêmicos graves como o MT, pois, sendo esse um beta-bloqueador, a sua absorção sistêmica por meio do sistema lacrimal e pela conjuntiva é responsável por sérias complicações cardiorrespiratórias que pode levar a óbitos.

Durante a terapia convencional, há elevada concentração do fármaco imediatamente após a instilação do colírio que diminui rapidamente em alguns minutos (Urtti, 2006). De fato, este fenômeno foi observado neste trabalho, pois, após a administração do colírio de ofloxacino, a concentração do mesmo diminui abaixo dos níveis terapêuticos, antes de uma nova instilação. Assim, implantes contendo antimicrobianos são capazes de reduzir

Resultados e discussão

significativamente a carga bacteriana no local de administração, diminuir a resistência bacteriana e minimizando as complicações do tratamento sistêmico como as complicações renais e hepáticas (Mansour et al., 2010).

No presente estudo, o ofloxacino preservou seu poder bactericida após o desenvolvimento farmacotécnico, evidenciado por meio do estudo de eficácia *in vitro*. Além disso, o filme de quitosana e ofloxacino liberou o fármaco de forma decrescente durante cinco dias sem apresentar oscilações cíclicas da concentração como observado com os animais que receberam o colírio. Entretanto, cinco dias ou 120 h, é um período curto de tempo para tratamento de infecções oculares superficiais podendo causar infecções persistentes e resistência aos antibióticos.

A metodologia de produção do filme de quitosana é similar ao relatado por Rodrigues e colaboradores (2009) que desenvolveram implantes destinados a liberação de dexametasona. Os autores descreveram filmes de quitosana de uma e duas camadas que liberaram *in vitro* 85% do fármaco em oito horas e de 28 dias, respectivamente. A incorporação de uma segunda camada prolongou significativamente o tempo de liberação *in vitro* do fármaco (Rodrigues et al., 2009). Portanto, o desenvolvimento de um filme de quitosana e ofloxacino com duas camadas poderia prolongar substancialmente a liberação do fármaco promovendo cura total das infecções oculares superficiais. Nesse contexto, existem expectativas promissoras para o desenvolvimento de implantes com bicamada seguros, eficazes e com liberação prolongada de antimicrobianos.

5.7 Avaliação histopatológica

Para certificar a ausência de toxicidade tecidual, foi realizado estudo histológico do bulbo ocular e seus anexos do OD de todos os coelhos. As **Figuras 45, 46, 47 e 48** apresentam fragmentos da conjuntiva bulbar e palpebral de coelhos tratados com colírios de MT e com implantes de MT. Não foram observadas alterações significativas nos tecidos estudados, principalmente nas estruturas de contato direto com o filme de quitosana como a mucosa palpebral e mucosa conjuntival. O epitélio e células adjacentes estavam

Resultados e discussão

normais constituindo o arcabouço característico de cada estrutura com ausência de sinais de toxicidade celular e vascular.



Figura 45. Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com colírio de MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes. (seta) HE. 25x.

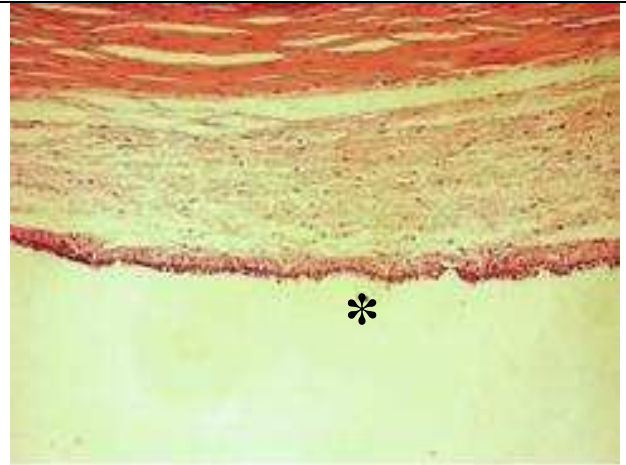


Figura 46. Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com filme de quitosana e MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes. (asterisco) HE. 25x.



Figura 47. Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com colírio de MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes. (seta) HE. 25x.

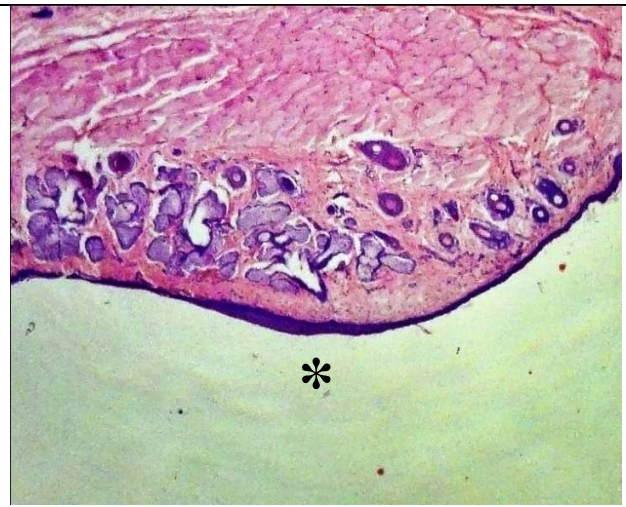


Figura 48. Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com filme de quitosana e MT. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes (asterisco) HE. 25x.

Esses resultados estão de acordo com a avaliação oftalmológica onde nenhuma alteração clínica foi identificada nos animais tratados. O uso prolongado de MT pode produzir

Resultados e discussão

alterações morfológicas na conjuntiva de coelhos como aumento da densidade das fibras de colágeno (Mietz et al., 2001). Essa alteração não foi observada nesse trabalho, provavelmente devido ao curto tempo de tratamento em relação a longa terapia relatada por Mietz e colaboradores (2001). Como citado anteriormente, os animais tratados com MT não apresentaram alterações histológicas no calibre dos vasos da coróide, retina e DO observados por outros pesquisadores (Grunwald, 1990a; Grunwald, 1990b; Schmetterer et al., 1997; Yoshida et al., 1998).

Em relação à avaliação histológica dos animais tratados com colírio de ofloxacino e implante de quitosana e ofloxacino, nenhuma alteração foi observada nas estruturas oculares nem tampouco nos tecidos em direto contato com o implante como a conjuntiva bulbar e palpebral (**Figuras 49, 50, 51 e 52**). As amostras oriundas dos dois coelhos que apresentaram hiperemia conjuntival de resolução espontânea foram cuidadosamente avaliadas e não apresentaram alterações celulares e vasculares. Considerando que os implantes de quitosana e MT permaneceram em contato com a mucosa palpebral e bulbar por 10 semanas e não provocaram alterações microscópicas, é esperado que o implante de quitosana e ofloxacino, sete dias no olho, também não apresentasse lesões histológicas.

Resultados e discussão

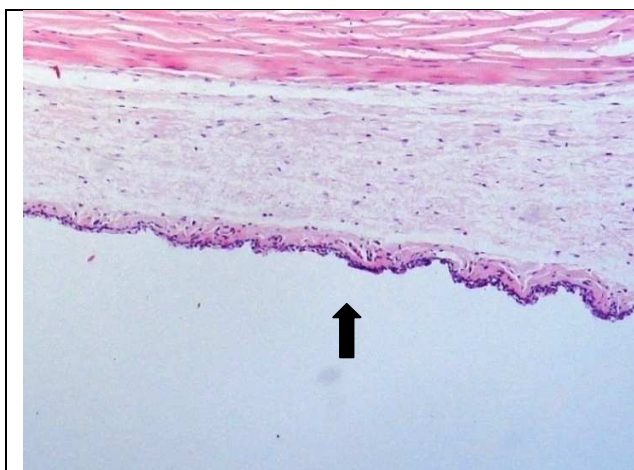


Figura 49. Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com colírio de ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes. (seta) HE. 25x.



Figura 50. Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho tratado com filme de quitosana e ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes. (asterisco) HE. 25x.



Figura 51. Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com colírio de ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes. (seta) HE. 25x.

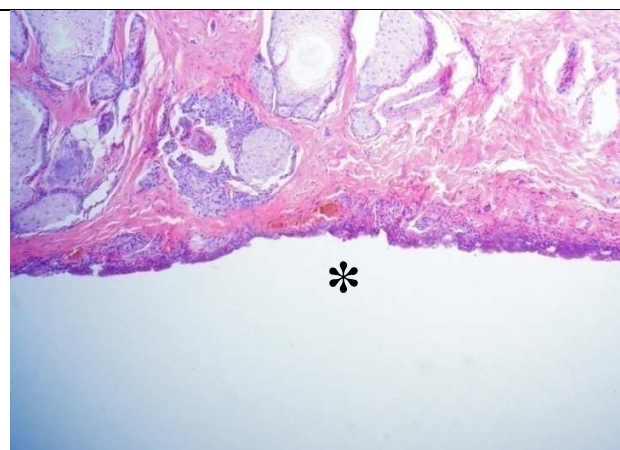


Figura 52. Fotomicrografia de pálpebra de coelho tratado com filme de quitosana e ofloxacino. Notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes (asterisco) HE. 25x.

Os resultados da histologia estão de acordo com Alpar e Groves (2006) e Laranjeira e Fávere (2009) que destacaram as características biofarmacêuticas da quitosana como baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade que lhe confere uma excelente qualidade como material no desenvolvimento de implantes de uso oftalmológico (Alpar e Groves, 2006; Laranjeira e Fávere, 2009). Devido a essas e outras propriedades favoráveis, o interesse da quitosana e seus derivados em sistemas de liberação de fármacos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Embora existam

Resultados e discussão

diferenças entre o olho do coelho e o olho humano, há uma boa correlação entre processos irritativos entre ambos, ou seja, muitas vezes, substâncias que não provocam alterações nos coelhos provavelmente não provocarão no homem (Freeberg et al., 1986; Salamanca et al., 2006).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o método de desenvolvimento dos sistemas de quitosana contendo MT e ofloxacino não alterou as características físico-químicas desses fármacos, portanto, preservando suas atividades farmacológicas. Observou-se, posteriormente, que o implante de MT e ofloxacino desenvolvidos foram capazes de promover a liberação dos fármacos por 10 semanas e cinco dias nos olhos de coelhos hígidos, respectivamente. Não houve diferença estatística na comparação da terapia convencional com os implantes inovadores propostos. Nenhum sinal importante de incômodo ocular e lesão tecidual foi observado nos animais à semiotécnica oftalmológica e estudo histopatológico.

Os implantes desenvolvidos apresentam enorme aplicabilidade na medicina veterinária e humana, pois, não demandará instilações diárias freqüentes necessárias nos longos tratamentos do glaucoma e na prevenção e tratamento de infecções oculares superficiais como ceratites e conjuntivites como ocorre com medicamentos hoje disponíveis. Portanto, o sucesso no tratamento dessas oftalmopatia não dependerá da colaboração dos pacientes; e no caso da medicina veterinária da complacência dos animais e disponibilidade de tempo dos proprietários. Além disso, desvantagens da terapêutica convencional como elevada concentração no momento da instilação, rápida depuração ocular e efeitos adversos sistêmicos podem ser minimizados com estes implantes, pois, permite a liberação de fármacos de forma mais constante.

Devido ao seu caráter inovador, os resultados preliminares obtidos neste trabalho despertam expectativas promissoras na utilização de sistemas de liberação de fármacos na terapêutica oftalmológica. Além disso, fornece suporte técnico a outros estudos que encontram em andamento. Baseado na segurança e efetividade, os implantes em desenvolvimento podem substituir a terapêutica convencional no tratamento de oftalmopatias nos animais de companhia.

Contribuições para a literatura científica

7. CONTRIBUIÇÕES À LITERATURA CIENTÍFICA

7.1 Trabalhos apresentados em congresso

FULGENCIO, G. O.; REZENDE, D. L.; LARA, D. L.; YOSHIDA, M. I.; FARACO, A. A. G.; CUNHA JUNIOR, A. S. Chitosan films for prolonged delivery of timolol maleate. **34th World Small Animal Veterinary Association**, 2009, p. 188.

FULGENCIO, G. O.; VIANA, F. A. B.; FARACO, A. A. G.; CUNHA JUNIOR, A. S. Implante mucoconjuntival de quitosana e maleato de timolol para tratamento de glaucoma. **Anais do 33th Congresso Brasileiro Clínicos de Pequenos Animais**, 2012, p. 344-346.

FULGENCIO, G. O.; VIANA, F. A. B.; FRANCA, J. R.; BYRRO, R. M. D.; FARACO, A. A. G.; CUNHA JUNIOR, A. S. Avaliação de implante mucoconjuntival de quitosana e ofloxacino para tratamento de infecções oculares externas. **Anais do 33th Congresso Brasileiro Clínicos de Pequenos Animais**, 2012, p. 329-331.

7.2 Artigos científicos publicados

FULGENCIO, G. O.; VIANA, F. A. B.; RIBEIRO, R. R.; YOSHIDA, M. I.; FARACO, A. A. G.; CUNHA JUNIOR, A. S. New mucoadhesive chitosan film for ophthalmic drug delivery of timolol maleate: in vivo evaluation. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 350-358, 2012.

BYRRO, R. M. D.; FULGENCIO, G. O.; CUNHA JUNIOR, A. S.; CÉSAR, I. C.; CHELLINI, P. R.; PIANETTI, G. A. Determination of ofloxacin in tear by HPLC-ESI-MS/MS method: comparison of ophthalmic drug release between a new mucoadhesive chitosan films and a conventional eyedrop formulation in rabbit model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 544-548, 2012.

Contribuições para a literatura científica

7.3 Artigo científico submetido à publicação

FULGENCIO, G. O.; VIANA, F. A. B.; RIBEIRO, R. R.; SILVA, R. O. S.; LOBATO, F. C. F.; FRANCA, J. R.; BYRRO, R. M. D.; FARACO, A. A. G.; CUNHA JUNIOR, A. S. Development and evaluation in vivo of mucoadhesive chitosan films with ofloxacin for treatment ocular external infections.

7.4 Depósito de patente

FARACO, A. A. G.; FULGENCIO, G. O.; FRANCA, J. R.; CASTILHO, R. O.; SOBRINHO, S. C.; YOSHIDA, M. I.; RIBEIRO, T. G.; BATISTA, L. D.; FARACO, A. A. G. Filmes poliméricos hidrofílicos para liberação controlada de fármacos hidrofílicos. (2011)

Anexos

8. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; KAUR, I. P. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 155-159, 2005.

AGNIHOTRI, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Chitosan nanoparticles for prolonged delivery of timolol maleate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, p. 1254–1262, 2007.

AHMED, I.; PATTON, T. F. Importance of the noncorneal absorption route in topical ophthalmic drug delivery. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 26, p. 584-587, 1985.

ALI, Y.; LEHMUSSAARI, K. Industrial perspective in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, p. 1258-1268, 2006.

ALM, A. Prostaglandin derivatives as ocular hypotensive agents. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 17, p. 291-312, 1998.

ALPAR, H. O.; GROVES, M. J. Vaccines: ancient medicines to modern therapeutics. In: GROVES, M. J. **Pharmaceutical Biotechnology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. cap. 12, p. 307-332.

AUKER, C. R.; PARVER, L. M.; DOYLE, T.; CARPENTER, D. O. Choroidal blood flow. I. Ocular tissue temperature as a measure of flow. **Archives of Ophthalmology**, v. 100, p. 1323-1326, 1982.

BAEYENS, V.; PERCICOT, C.; ZIGNANI, M.; DESHPANDE, A. A.; KALTSATOS, V.; GURNY, R. Ocular drug delivery in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 335-361, 1997.

BARTLETT, J. D.; CULLEN, A. P. Clinical administration of ocular drugs. In: BARTLETT, J. D.; JAANUS, S. D.; **Clinical Ocular Pharmacology**. 2 ed. Boston: Butterworth Publishers, 1984. p. 365-418.

Anexos

BELLHORN, R. W. Permeability of blood-ocular barriers of neonatal and adults cats to fluorescein-labeled dextrans of selected molecular sizes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 21, p. 282-290, 1981.

BERTINO, J. S. Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role of current and future antibiotics. **Clinical Ophthalmology**, v. 3, p. 507-521, 2009.

BIGUCCI, F.; LUPPI B.; MUSENGA, A.; ZECCHI V.; CERCHIARA, T. Chitosan salts coated with stearic acid as colon-specific delivery systems for vancomycin. **Drug Delivery**, v. 15, p. 289-293, 2008.

BITO, L. Z. Prostaglandins, other eicosanoids, and their derivatives as potential antiglaucoma agents. In: DRANCE, S. M. **Glaucoma: applied pharmacology in medical treatment**. ed Orlando: Grune and Stratton, 1984: 477-505.

BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of rewsistence. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, p. 73-78, 2004.

BORNER, K.; BORNER, E. Determination of sparfloxacin in serum and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography: Biomedical Applications**, v. 579, p. 285-289, 1992.

BOURCIER, T.; THOMAS, F.; BORDERIE, V.; CHAUMEIL, C.; LAROCHE, L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. **British Journal of Ophthalmology**, v. 87, p. 234–238, 2003.

BOURGES, J. L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; FROUSSART, F.; BOCHOT, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, p. 1182-1202, 2006.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002. Brasília, 2002.

BYRRO, R. M. D.; FULGÊNCIO, G. O.; CUNHA-JÚNIOR, A. S.; CÉSAR, I. C.; CHELINI, P. R.; PIANETTI, G A. Determination of ofloxacin in tear by HPLC–ESI-MS/MS method: Comparison of ophthalmic drug release between a new mucoadhesive chitosan films and

Anexos

a conventional eye drop formulation in rabbit model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 544-548, 2012.

CAO, Y.; ZHANG, C.; SHEN, W.; CHENG, Z.; YU, L.; PING, Q. Poly (N-isopropylacrylamide) – chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 186-194, 2007.

CAWRSE, M. A.; WARD, M. A.; HENDRIX, D. V. H. Effects of topical application of 2% solution of dorzolamide on intraocular pressure and aqueous humor flow rate in clinically normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 859-863, 2001.

CHANDLER, J. W.; GILLETTE, T. E. Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. **Ophthalmology**, v. 90, p. 585-591, 1983.

CHO, Y. W.; CHO, Y. N.; CHUNG, S.; YOO, G.; KO, S. Water-soluble chitin as a wound-healing accelerator. **Biomaterials**, v. 20, p. 2139-2145, 1999.

CLSI, 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Wayne, USA. v. 31, n. 1, 169p.

DANIEL, W. J.; NOOMAN, N. E.; GELATT, K. N. Isolation and characterization of the crystallins of the normal and cataractous canine. **Current Eye Research**, v. 3, p. 911-922, 1984.

DANIELL, M.; MILLS, R.; MORLET, N. Microbial Keratitis: What's the preferred initial the therapy? **British Journal of Ophthalmology**, v. 87, p. 1167-1174, 2003.

DAVIES, N. M. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 558-562, 2000.

DAVISON, H. J.; KUONEN, V. J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, p. 71-77, 2004.

DEBRA, A. G.; DAVID, G. G.; ANTHONY, H.; DAVID, G. C.; GLENN, J. J.; PEARSON, P. A.; DALE, W. U.; TIMOTHY, L. C. Intraocular pressure in patients with uveitis treated with fluocinolone acetonide implants. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, p. 1478-1485, 2007.

Anexos

DI COLO, G. D.; BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; FIASCHI, M. P.; ZAMBITO, Y.; SAETTONE, M. F. Gel-forming erodible inserts for ocular controlled delivery of ofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 101-111, 2001a.

DI COLO, G. D.; BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; FIASCHI, M. P.; ZAMBITO, Y.; SAETTONE, M. F. Relevance of polymer molecular weight to the in vitro performances of ocular inserts based on poly(ethylene oxide). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, p. 169-177, 2001b.

DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; BURGALASSI, S.; NARDINI, I.; SAETTONE, M. F. Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 273, p. 37-44, 2004.

DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; BURGALASSI, S.; SERAFINI, M.F.; SAETTONE, M. F. Effect of chitosan on in vitro release and ocular delivery of ofloxacin from erodible insert based on poly(ethylene oxide). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 248, p. 115-122, 2002.

DOANE, M. G.; JENSEN, A. D.; DOHLMAN, C. H. Penetration routes of topically applied eye medications. **American Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 383-386, 1978.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.

DUNHAM, C. N.; SPAIDE, R. F.; DUNHAM, G. The contralateral reduction of intraocular pressure by timolol. **British Journal of Ophthalmology**, v. 78, p. 38-40, 1994.

EL-KAMEL, A. H. In vitro and in vivo evaluation of pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, p. 47-55, 2002.

FARMACOPÉIA brasileira 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. pt II.

FELT, O.; FURRER, P.; MAYER, J. M.; PLAZONNET, B.; BURI, P.; GURNY, R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. **International journal of Pharmaceutics**, v.180, p.185-193, 1999.

Anexos

FELT, O.; GURNY, R; BURI, P; BAEYENS, V. Delivery of antibiotics to the eye using a positively charged polysaccharide as vehicle. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journals**, v. 3, p. 1-7, 2001.

FIALHO, S. L.; BEHAR-COHEN, F.; CUNHA JUNIOR, A. Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 637-646, 2008.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; CUNHA JUNIOR, A. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

FREDDO, T. F.; SACKS-WILNER, R. Interendothelial junctions of the rabbit iris vasculature in anterior uveitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 30, p. 1104-1111, 1989.

FREEBERG, F. E.; NIXON, G. A.; REER, P. J. Human and rabbit eye responses to chemical insult. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 7, p. 626–634, 1986.

FREEPONS, D. Enhancing food production with chitosan seed-coating technology. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. **Chitin in nature and technology**. Ed. New York: Plenum Press, 1986. p. 129-139.

FRISHMAN, W. H.; FUKSRUMER, M. S.; TANNENBAUM, M. Topical ophthalmic β -adrenergic blockade for the treatment of glaucoma and ocular hypertension. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 34, p. 795-803, 1994.

FULGENCIO, G. O.; REZENDE, D. L.; LARA, D. L.; YOSHIDA, M. I.; CUNHA JUNIOR, A. S.; FARACO, A. A. G. Chitosan films for prolonged delivery of timolol maleate. **34th World Small Animal Veterinary Association**, 2009, p.188.

FULGENCIO, G. O.; VIANA, F. A. B.; RIBEIRO, R. R.; YOSHIDA, M. I.; FARACO, A. A. G.; CUNHA-JUNIOR, A. S. New mucoadhesive chitosan film for ophthalmic drug delivery of timolol maleate: *in vivo* evaluation. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 350-358, 2012.

Anexos

GALLE, L. E.; MOORE, C. P. Clinical Microbiology. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 236-270.

GELATT, K. N.; BROOKS, D. E.; KÄLLBERG, M. E. The canine glaucomas. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 753-811.

GELATT, K. N.; LAROCCA, R. D.; GELATT, J. K.; STRUBBE, T.; MACKAY, E. O. Evaluation of multiple doses of 4 and 6% timolol, and timolol combined with 2% pilocarpine in clinically normal beagles and beagle with glaucoma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1325-1331, 1995.

GELATT, K. N.; MACKAY, E. O. Effect of different dose schedules of travoprost on intraocular pressure and pupil size in glaucomatous Beagles. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, p. 53-57, 2004.

GELATT, K. N.; MACKAY, E. O.; GELATT, J. K.; STENGARD-OLLIES, K.; AZA, J. Effects on intraocular pressure and pupil size in glaucomatous Beagles after topical pilocarpine instilled with standard (pH5) and buffer-tip (pH7) droptainers. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 13, p. 95-104, 1997.

GELATT, K. N.; MIYABAYASHI, T.; GELATT-NICHOLSON K. J.; MACKAY, E. O. Progressive changes in ophthalmic blood velocities in Beagles with primary open angle glaucoma. **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, p. 77-84, 2003.

GILLETTE, T. E.; CHANDLER, J. W.; GREINER, J. V. Langerhans cells of the ocular surface. **Ophthalmology**, v. 89, p. 700-711, 1982.

GIULIANO, E. A.; MOORE, C. P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 633-661.

GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, p.1713-1723, 2005.

GRASS, G. M.; ROBINSON, J. R. Mechanisms of corneal drug penetration. I: In vitro and in vivo kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 3-14, 1988a.

Anexos

GRASS, G. M.; ROBINSON, J. R. Mechanisms of corneal drug penetration. II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 15-23, 1988b.

GRAY, H. E.; WILLIS, A. M.; MORGAN, R. V. Effects of topical administration of 1% brinzolamide on normal cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, p. 285-290, 2003.

GRASS, G. M.; ROBINSON, J. R. Relationship of chemical structure to corneal penetration and influence of low-viscosity solution on ocular bioavailability. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 73, p. 1021-1027, 1984.

GREAVES, J. L.; WILSON, C. G. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, p. 349-383, 1993.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v. 48, p. 263-277, 2000.

GRUNWALD, J. E. Effects of topical timolol on the human retinal circulation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 27, p. 1713-1719, 1990a.

GRUNWALD, J. E. Effects of timolol maleate on the retinal circulation of human eyes with ocular hypertension. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 31, p. 521-526, 1990b.

GUM, C. G.; KINGSBURRY, S.; WHITLEY, R. D.; GARCIA, A.; GELATT, K. N. Effect of topical prostaglandin PGA_2 , PGA_2 isopropyl ester, $PGF_{2\alpha}$ isopropyl ester on intraocular pressure in normotensive and glaucomatous canine eyes. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 7, p. 107-116, 1991b.

GUM, C. G.; LAROCCA, R. D.; GELATT, K. N. Effects of topical timolol maleate on intraocular pressure and pupil size in normotensive and glaucomatous Beagles. **Progress on Veterinary Compendious of Ophthalmology**, v. 1, p. 141-149, 1991a.

GUM, G. G.; GELATT, K. N.; ESSON, D. W. Physiology of the eye. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 149-182.

Anexos

HEGEMAN, S. L.; BOSIN, T. R.; HARRISON, S. D. Fundamental concepts in ocular pharmacology. In: BARTLETT, J. D.; JAANUS, S. D. **Clinical Ocular Pharmacology**. 3 ed. Boston: Butterworth Publishers, 1984. p. 3-35.

HENDRIX, D. V.; NASISSE, M. P.; COWEN, P.; DAVISON, M. G. Clinical signs, concurrent diseases, and risk factors associated with retinal detachment in dogs. **Progress on Veterinary Compendious of Ophthalmology**, v. 3, p. 87-91, 1993.

HENRIKSEN, I.; GREEN K. L.; SMART, J. D.; SMISTAD G. ; KARLSEN, J. Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, p. 231-240, 1996.

HORNOF, M.; TOROPAINEN, E.; URTTI, A. Cell culture models of the ocular barriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p.207-225, 2005.

HOVDING, G. Acute bacterial conjunctivitis. **Acta Ophthalmologica**, v. 86, p. 5-17, 2008.

HURWITZ, L. M.; KAUFMAN, P. L.; ROBIN, A. L.; WEINREB, R. N.; CRAWFORD, K. SHAW, B. New developments in the drug treatment of glaucoma. **Drugs**, v. 41, p. 514-532, 1991.

HUSSY, P.; MAASS, G.; TUMMLER, B.; GROSSE, F.; SCHOMBURG, U. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase alpha primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, p. 1073–1078, 1986.

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

JÄRVINEN, K.; JÄRVINEN, T.; URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 3-19, 1995.

JÄRVINEN, T.; JÄRVINEN, K. Prodrugs for improved ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 19, p. 203-224, 1995.

Anexos

KAPPEL, P. J.; CHARONIS, A. C.; HOLLAND, G. N.; NARAYANAN, R.; KULKARNI, A. D.; YU, F.; BOYER, D. S.; ENGSTROM, R. E.; KUPPERMANN, B. D. Outcomes associated with ganciclovir implants in patients with AIDS-related cytomegalovirus retinitis. **Ophthalmology**, v. 113, p. 673-683, 2006.

KASS, M. A. Topical carbonic anhydrase inhibitors. **American Journal of Ophthalmology**, v. 107, p. 280-282, 1989.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 3-11, 2010.

KELLER, R. L.; HENDRIX, D. V. Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993-2004). **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 207-211, 2005.

KIEL, J. W.; PATEL, P. Effects of timolol and betaxolol on choroidal blood in the rabbit. **Experimental Eye Research**, v. 67, p. 501-507, 1998.

KING, G.; BINES, S.; STAREN, E. Chitosan: evaluation of a new hemostatics agent. **Current Surgery**, v. 47, p. 37-39, 1990.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LEDERER, C.; HAROLD, R. Drop size of commercial glaucoma medications. **American Journal of Ophthalmology**, v. 101, p. 691-694, 1986.

LEE, V. H. L.; ROBINSON, J. R. Topical ocular drug delivery: Recent developments and future challenges. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 2, p.67-108, 1986.

LEHR, C. M.; BOUWSTRA J. A.; SCHACHT, E. H.; JUNGINGER, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, p.43-48, 1992.

LI, J.; XU, Z. Physical characterization of a chitosan-based hydrogel delivery system. **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 91, p. 1669-1677, 2002.

Anexos

LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. Application and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, p. 370-397, 1992.

LIU, H. K.; CHIOU, G. C. Y.; GARG, L. C. Ocular hypotensive effects of timolol in cat's eyes. **Archives of Ophthalmology**, v. 98, p. 1467-1469, 1980.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1595-1639, 2005.

LUNA, L. G. Routine Staining Produces. In. _____ **Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 1ed. New York: McGraw-Hill Book Co., 1968. Cap. 4, p. 32-46.

MACMAHON, C. D.; SHAFFER, R. N.; HOSKINS, H. D. T.; HETHERINGTON, J. J. Adverse effects experienced by patients taking timolol. **American Journal of Ophthalmology**, v. 88, p. 736-738, 1979.

MALAEKEH-NIKOUEI, B.; TABASSI, S. A. S.; JAAFARI, M. R. P. Preparation, characterization, and mucoadhesive properties of chitosan-coated microspheres encapsulated with cyclosporine A. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, p. 492-498, 2008.

MANSOUR, H. M.; SOHN, M.; GHANANEEM, A.; DeLUCA, P. P. Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 3298-3322, 2010.

MAREN, T. H.; CONROY, C. W.; WYNNS, G. C.; LEVY, N. S. O. Ocular absorption, bloods levels, and excretion of dorzolamide, a topically active carbonic anhydrase inhibitor. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 12, p. 23-30, 1997.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 172, p.10-28, 2006.

MAURICE, D. M.; MISHIMA, S. Ocular pharmacokinetics. In. _____ **Handbook of experimental pharmacology**. 1ed. Springer Verlag: Berlin-Heidelberg, 1984. p. 16-119.

Anexos

MEALEY, K. Systemic absorption of topically administered drugs. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 22, p. 649-657, 2000.

MIETZ, H.; SCHLÖTZER-SCHREHARDT, U.; STRASSFELD, C. Effect of latanoprost and timolol on the histopathology of the rabbit conjunctiva. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, p. 679–687, 2001.

MISHIMA, S.; GASSET, A.; KLYCE, S. D.; BAUM, J. L. Determination of tear volume and tear flow. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 5, p. 264-276, 1966.

MIZUNO, K.; YAMAMURA, K.; YANO, K.; OSADA, T.; SAEKI, S.; TAKIMOTO, N.; SAKURAI, T.; NIMURA, Y. Effects of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 64, p. 177-181, 2003.

MOORE, C. P.; COLLINS, B. K.; FALES, W. H.; HALENDA, R. M. Antimicrobial agents for treatment of infectious keratitis in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, p. 855-862, 1995.

NELSON, W. L.; FRAUNFELDER, F. T.; SILLS, J. M.; ARROWSMITH, J. B.; KURITSKY, J. N. Adverse respiratory and cardiovascular events attributed to timolol ophthalmic solution. **American Journal of Ophthalmology**, v. 102, p. 606-611, 1986.

NOEL, P. S.; COURTNEY, H.; BUMGARDNER, J. D.; HAGGARD, W. Chitosan films. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 466, p. 1377-1382, 2008.

OFRI, R. Optics and physiology of vision. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 183-219.

OFRI, R.; DORIT, R. A. Z.; KASS, P. H.; LAMBROU, G. N.; PERCICOT, C. L. Effect of 0.12% unoprostone isopropyl (Rescula) on intraocular pressure in normotensives dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, p. 1313-1315, 2000.

OFRI, R.; NARFSTRÖM, K. Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration. **Veterinary Journal**, v. 174, p. 10-22, 2007.

Anexos

OFRI, R.; SAMUELSON, D. A.; STRUBBE, D. T.; DAWSON, W. W.; BROOKS, D. E.; GELATT, K. N. Altered retinal recovery and optic nerve fiber loss in primary open-angle glaucoma in the Beagle. **Experimental Eye Research**, v. 58, p. 245-248, 1994.

OLLIVIER, F. J.; SAMUELSON, D. A.; BROOKS, D. E.; LEWIS, P. A.; KALLBERG, M. E.; KOMÁROMY, A. M. Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, p. 11-22, 2004.

ÖNER, L., EROGLU, H., SARGON, M.F. Chitosan formulations for steroid delivery: effect of formulation variables on in vitro characteristics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, p.265–271, 2007.

PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D.; AVGOUSTAKIS, K.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 44-54, 2008.

PASCOE, P. J.; IKIW, J. E.; STILES, J.; SMITH, E. M. Arterial hypertension associated with topical ocular use of phenylephrine in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 1562-1564, 1994.

PATTON, F.; ROBINSON, R. Quantitative precorneal disposition of topically applied pilocarpine nitrate in rabbits. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 65, p. 1295-1301, 1976.

PAULSEN, F. P.; FOGEL, M.; THALE, A. B.; TILLMAN, B. N.; MENTLEIN, R. Animal model for the absorption of lipophilic substances from tear fluid by the epithelium of the nasolacrimal ducts. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 43, p. 3137-3143, 2002.

PRAUSNITZ, M. R.; NOONAN, J. S. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 87, p. 1479-1487, 1998.

RAINBOW, M. E.; DZIEZYC, J. Effects of twice daily application of 2% dorzolamide on intraocular pressure in normal cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, p. 147-150, 2000.

Anexos

RAPAPORT, D. H.; STONE, J. The area centralis of the retina in the cat and others mammals: Focal point for function and development of the visual system. **Neuroscience**, v. 11, p. 289-301, 1984.

REGNIER, A. Clinical pharmacology and therapeutics. Part 1: Drug delivery. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 4 ed. Ames: Blackwell publishing, 2007. p. 271-287.

REGNIER, A.; WHITLEY, R. D.; BENARD, P.; BONNEFOI, M. Effects of flumexin meglumine on the breakdown of the blood-aqueous barrier following paracentesis in the canine eye. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 2, p. 165-170, 1986.

RODRIGUES, L. B.; LEITE, H. F.; YOSHIDA, M. I.; SALIBA, J. B.; JÚNIOR, A. S. C.; FARACO, A. A. G. In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 23, p. 1-6, 2009.

RODRIGUEZ-PERALTA, L. The blood aqueous barriers in five species. **American Journal of Ophthalmology**, v. 80, p. 713-725, 1975.

ROLDÓ, M.; HORNOF, M.; CALICETI, P.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p.115-121, 2004.

ROULAND, J. F.; MOREL-MANDRINO, P.; ELENA, P. P.; POLZER, H.; RAJ, P. S. Timolol 0.1% gel (Nyogel 0.1%) once daily versus conventional timolol 0.5% solution twice daily: a comparison of efficacy and safety. **Ophthalmologica**, v. 216, p. 449-454, 2002.

SAETTONE, M. F.; SALMINEN, L. Ocular inserts for topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 95-106, 1995.

SALAMANCA, A. E.; DIEBOLD, Y.; CALONGE, M.; GARCÍA-VAZQUEZ, C.; CALLEJO, S.; VILA, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles as a potencial drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake, mechanism and in vivo tolerance. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, p.1416–1425, 2006.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 37-148.

Anexos

SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; CHETONI, P.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; RONCHI, C.; SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 242-249, 2006.

SASAKI, H.; ICHIKAWA, M.; KAWAKAMI, S.; YAMAMURA, K.; MISHIDA, K.; NAKAMURA, J. In situ ocular absorption of tilisolol through ocular membranes in albino rabbits. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 940-943, 1996.

SCHMETTERER, L.; STRENN, K.; FINDL, O.; BREITENEDER, H.; GRASELLI, U. Effects of antiglaucoma drugs on ocular hemodynamics in healthy volunteers. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 61, p. 583-595, 1997.

SCHOENWALD, R. D.; DESHPANDE, G. S.; RETHWISCH, D. G.; BARFKNECHT, C. F. Penetration into the anterior chamber via the conjunctival / scleral pathway. **Journal of Ocular Pharmacology Therapy**, v. 13, p. 41-59, 1997.

SHELL, J. Pharmacokinetics of topically applied ophthalmic drugs. **Survey of Ophthalmology**, v. 26, p. 207-218, 1982.

SHIVELY, J. N.; EPLING, G. Fine structure of the canine eye: cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 13, p. 713-717, 1970.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1994, p. 173.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p.1-33, 2004.

SINTZEL, M. B.; BERNATCHEZ, S. F.; TABATABAY, C.; GURNY, R. Biomateriais in ophthalmic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 358-374, 1996.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.11, p. 1556-1568, 2005.

Anexos

STUDER, M. E.; MARTIN, C. L.; STILES, J. Effects of 0.005% latanoprost solution on intraocular pressure in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 1220-1224, 2000.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p.1583-1594, 2005.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan forhealing at early phase of experimental open wounds in dogs. **Biomaterials**, v. 20, p. 1407-1414, 1999.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1131-1135, 2006.

VAN BUSKIRK, E. M. The canine eye: the vessels of aqueous drainage. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 18, p. 223-230, 1979.

VAN DER WOERDT, A.; WILKIE, D. A.; GILGER, B. C.; STRAUCH, S. M.; ORCZECK, S. M. Effects of single-and-multiple-dose 0.5% timolol maleate on intraocular pressure and pupil size in female horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p. 165-168, 2000.

VAN SANTVLIET, L.; LUDWIG, A. Determinants of eye drop size. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, p. 197-213, 2004.

VIANA, F. A. B.; FULGÊNCIO, G. O.; BORGES, K. D. A. Farmacologia Oftalmológica. In SPINOSA, H. S.; GÒRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. 5ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.705-715.

WANG, B.; CIUFFREDA, K. J. Depth-of-focus of the human eye in the near retinal periphery. **Vision Research**, v. 44, p. 1115-1125, 2004.

WARD, D. A.; ABNEY, K.; OLIVER, J. W. The effects of topical ocular application of 0.25% demecarium bromide on serum acetylcholinesterase levels in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, p. 23-25, 2003.

Anexos

WARD, D. A.; FERGUSON, D. C.; WARD, S. L.; GREEN, K.; KASWAN, R. L. Comparison of the blood-aqueous barrier stabilizing effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents in the dogs. **Progress on Veterinary Compendious of Ophthalmology**, v. 2, p. 117-124, 1992.

WHITLEY, R. D. Canine and feline primary ocular bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, p. 1151-1167, 2000.

WHO 2012. www.int/bulletin/bulletin_board/83/infocus11041/en/index.html. Acesso 06/02/2012.

WILKIE, D. A.; LATIMER, C. A. Effects of topical administration of timolol maleate on intraocular pressure and pupil size in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 432-435, 1991.

WILLIS, A. M.; ROBBIN, T. E.; HOSHAW-WOODARD, S.; WILKIE, D. A.; SCHMALL, M. Phydrochloride-0.5% timolol maleate on intraocular pressure in clinically normal horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 709-713, 2001.

WILSON, M. R.; MARTONE, J. F. Epidemiology of chronic open angle glaucoma. In RITCH, R.; SHIELDS, M. B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 3ed. St Louis: Mosby; 1996. p. 407-445.

WOLFHAGEN, F. H. J.; GROEN, F. C.; OUWENDIJK, R. J. Severe nausea and vomiting with timolol eye drops. **Lancet**, v. 352, p. 373, 1998.

YOSHIDA, A.; OGASAWARA, H.; FUJIO, N.; KONNO, S.; ISHIKO, S.; KITAYA, N.; KAGOKAWA, H.; NAGAOKA, T.; HIROKAWA, H. Comparison of short- and long-term effects of betaxolol and timolol on human retinal circulation. **Eye**, v. 12, p. 848–853, 1998.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 527-530, 2003.

ZIMMERMAN, T. J.; KASS, M. A.; YABLONSKI, M. E.; BECKER, B. Timolol maleate. Efficacy and safety. **Archives of Ophthalmology**, v. 97, p. 656–658, 1979.

New Mucoadhesive Chitosan Film for Ophthalmic Drug Delivery of Timolol Maleate: *In Vivo* Evaluation

Gustavo de Oliveira Fulgêncio,¹ Fernando Antônio Bretas Viana,¹ Raul Rio Ribeiro,² Maria Irene Yoshida,³ André Gomes Faraco,⁴ and Armando da Silva Cunha-Júnior⁴

Abstract

Purpose: Chitosan, a cationic polysaccharide biopolymer with mucoadhesive properties, presents a promising future in the prolonged ocular delivery of drugs. The present study compared the efficacy and safety of chitosan-coated timolol maleate (TM) mucoadhesive film, using a 0.5% TM commercial ophthalmic solution in a rabbit model. In addition, this study investigates the maximum release time of these implants *in vivo*.

Methods: The mucoadhesive films were prepared by means of a casting and solvent evaporation technique performed in a 2 wt% acetic acid solution and distilled water. Physical properties were characterized by release and swelling studies, differential scanning calorimetry, and attenuated total reflectance fourier transformed infrared spectroscopy (ATR-FTIR). The developed formulations were evaluated for their pharmacodynamics in ocular normotensive albino rabbits, in which the intraocular pressure (IOP) was measured by means of applanation tonometer on alternative days (13h) for 11 weeks. For 15 days, 0.5% TM commercial ophthalmic solution was administered twice a day ($n=5$) and compared to chitosan-coated TM ($n=5$). In the control group ($n=5$), saline was used twice a day. The maximum TM release time from chitosan films were also recorded. After euthanasia, the right eyes were removed from the 3 groups for histological analyses.

Results: In an *in vitro* study, TM was released over a 4-week period, in which 85% of the drug was released over the first 2 weeks. However, the film's release of TM lowered the *in vivo* IOP levels over a 10-week period. No significant difference in the lowering of IOP in rabbits treated with 0.5% TM commercial ophthalmic solution, as compared to those that received the films ($P<0.05$), could be observed. No signs of ocular discomfort or irritations could be identified upon ophthalmic examination by slit-lamp biomicroscopy. Ophthalmic structures that came in direct contact with the films revealed no alterations within the histopathological studies. Moreover, the animals showed no signs of ocular discomfort during the experimental assays.

Conclusion: These findings suggest that the TM-loaded chitosan film is safe and efficient and presents a promising future as an ocular drug delivery system in the treatment and prevention of glaucoma.

Introduction

TOPICAL β -ADRENERGIC antagonists are commonly used to lower intraocular pressure (IOP) in ocular hypertensive patients.¹ The high levels of IOP represent recognized key risk factor in the development of glaucoma²; however, glaucomatous damage also occurs when high levels of IOP are absent.³ Timolol maleate (TM) is one of the main options for the medical treatment of open-angle glaucoma.^{4,5} In general, the topical administration of this

drug must be repeated several times over 24-h periods and continued for months or even years to guarantee clinical efficacy.⁶

Drugs administered in conventional topical ophthalmologic formulation tend to present a poor bioavailability. The majority of ophthalmic preparations available today can be found in the form of aqueous solutions and suspensions. These liquid forms are quickly drained from the conjunctival sac to the nasolachrymal duct, leading to a low availability of the drug at the target site, systemic side effects, and bad

¹Department of Ophthalmology, School of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

²Center for Agricultural, Environmental, and Biological Sciences, Federal University of Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas, Brazil.

³Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

⁴School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.



Short communication

Determination of ofloxacin in tear by HPLC–ESI–MS/MS method: Comparison of ophthalmic drug release between a new mucoadhesive chitosan films and a conventional eye drop formulation in rabbit model

Ricardo Martins Duarte Byrro^{a,*}, Gustavo de Oliveira Fulgêncio^b, Armando da Silva Cunha Jr.^a, Isabela Costa César^a, Paula Rocha Chellini^a, Gerson Antônio Pianetti^a

^a Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil
^b Departamento de Oftalmologia, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2012

Received in revised form 25 April 2012

Accepted 5 May 2012

Available online 14 May 2012

Keywords:

Ofloxacin

HPLC–ESI–MS/MS

Controlled release

Tear

Ophthalmic delivery

Rabbit

ABSTRACT

Ofloxacin, second-generation fluoroquinolone derivative, is one of the most commonly used to treat and prevent superficial ocular infection in animals and human beings. However, poor bioavailability, rapid elimination, and non compliance by patients are several problems associated with ocular route. Ophthalmic controlled drug delivery offers the potential to enhance the efficacy of treatment for pathological conditions, while reducing the side effects and the toxicity associated with frequent applications. Specific analytical methods to determine drugs in eye are needed to analyze and compare the new controlled release ocular devices with those conventional eye drops. The topical eye administration of ophthalmic drugs induces lachrymation, and the tear promotes a drug wash out. Quantify drugs in tear is a good tool to study their kinetic compartment in the eye. A liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS) method for quantitation of ofloxacin in rabbits' tears was developed and validated. The tear was collected with tear strips, extracted by a liquid extraction procedure and then separated on an ACE C₁₈ column with a mobile phase composed of 0.15% aqueous formic acid and methanol (60:40, v/v). Calibration curve was constructed over the range of 10–5000 ng/ml, for ofloxacin. The mean R.S.D. values for the intra-run and inter-run precision were 5.15% and 4.35%, respectively. The mean accuracy value was 100.16%. The validated method was successfully applied to determine the ofloxacin concentration in tears of rabbits treated with a mucoadhesive chitosan films and a conventional eye drop formulation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ofloxacin (Fig. 1) is a potent orally absorbed antimicrobial agent, and belongs, with other drugs (norfloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, enoxacin, fleroxacin), to the class of fluoroquinolones. These drugs have high potency, a broader spectrum of antibacterial activity, and short selection of resistant bacteria. Many fluoroquinolones also exhibit favorable pharmacokinetic properties, permitting treatment of systemic bacterial infections [1].

Ofloxacin is not only used as systemic antibacterial agent but also is commonly applied in ophthalmic pre- or post-ophthalmic surgery. This drug is a second generation fluoroquinolone with enhanced antimicrobial activities against aerobic gram-negative and -positive bacteria. It is one of the most commonly used second generation topical fluoroquinolones due to its high potency,

low minimal inhibitory concentration, low toxicity, long half-life, and high stability [2].

It is well known that ocular bioavailability after topical instillation is extremely low compared with the other routes, including oral administration, transdermal application, vitreous injection, and implantable delivery. The ocular bioavailability is also affected by a variety of pharmaceutical factors such as formulation viscosity and the particle size of suspension. Other significant problem found due to ophthalmic administration is an induced reflex lachrymation following instillation. This means that the drug is pulsed, with a short initial period of overdosing followed by a long period of underdosing. This leads to poor bioavailability of the drug and consequently to frequent instillations in order to reach and maintain therapeutic levels [3,4].

Therefore, there is a need in ocular drug delivery to develop systems which prolong the time of drug in contact with ocular tissue. This may be achieved through the development of ocular controlled drug delivery systems. The main objective of ocular controlled drug delivery systems is to produce an extended release in

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 6967; fax: +55 31 3409 6976.
 E-mail address: ricardobyrr@bol.com.br (R.M.D. Byrro).

Anexos

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas: (documentos anexados) (se houver):

Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.

Listagem de seqüências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

| | | | | | |
|-------------------------------------|--|--------|-------------------------------------|---------------------------|---------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 11.1 Guia de Recolhimento | 1 fls. | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.5 Relatório descritivo | 12 fls. |
| <input type="checkbox"/> | 11.2 Procuração | fls. | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.6 Reivindicações | 3 fls. |
| <input type="checkbox"/> | 11.3 Documentos de Prioridade | fls. | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.7 Desenhos | 4 fls. |
| <input type="checkbox"/> | 11.4 Doc. de contrato de trabalho | fls. | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.8 Resumo | 1 fls. |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Anexo de Titulares: Anexo de Inventores, Portaria nº 042, Declarações | | | | 11 fls. |

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 32 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 25/07/2011

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Prof. Marco Aurélio Romano-Sa,
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa/UFV,
Nomeação DOU nº 4.415 / 2010

ANEXO DE INVENTORES

Título: FILMES POLIMÉRICOS HIDROFÍLICOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA

Página 1

Nome: Juçara Ribeiro Freese
Qualificação: Pesquisadora
CPF: 080725546-70
Endereço Completo: Rua Padre Leopoldo Mertens, 1020 D, Apto 102, Bairro São Francisco - Belo Horizonte - MG
CEP: 31255-200
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@cit.ufmg.br

Nome: Gustavo de Oliveira Fulgêncio
Qualificação: Pesquisador
CPF: 045677916-73
Endereço Completo: Rua Montes Claros, 1547, Apto 101, Bairro Anchieta - Belo Horizonte - MG
CEP: 30310-370
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@cit.ufmg.br

Nome: Rachel Oliveira Casêlho
Qualificação: Professora
CPF: 021582467-19
Endereço Completo: Rua Laudelina Carneiro, 855, Bairro Enseada das Garças - Belo Horizonte - MG
CEP: 31370-260
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@cit.ufmg.br

Nome: Sebastião Cronemberger Sobrinho
Qualificação: Professor
CPF: 030209753-87
Endereço Completo: Rua Martin de Carvalho, 410, Apto 501, Bairro Santo Agostinho - Belo Horizonte - MG
CEP: 30190-090
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@cit.ufmg.br

Nome: Maria Irene Yoshida
Qualificação: Professora
CPF: 264982236-20
Endereço Completo: Av. Augusto de Lima, 1105, Apto 501, Bairro Barro Preto - Belo Horizonte - MG
CEP: 30190-002
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@cit.ufmg.br

Nome: Tatiana Gomes Ribeiro
Qualificação: Pesquisadora
CPF: 065991896-01
Endereço Completo: Rua Quatro, 59, Bairro Riacho III - Belo Horizonte - MG 32285-196
CEP: 32285-196
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@cit.ufmg.br

Nome: Luciana Diniz Batista
Qualificação: Pesquisadora
CPF: 077655796-43
Endereço Completo: Rua São Bahia, 36, Centro - Pedro Leopoldo - MG
CEP: 33600-000
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430

Anexos

ANEXO DE DEPOSITANTES

Título: FILMES POLIMÉRICOS HIDROFÍLICOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA

Página 1

Nome: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Qualificação:

CNPJ / CPF / Número INPI: 21948886000183

Endereço Completo: Rua Raul Pompéia, 101, 11º andar, Bairro São Pedro, Belo Horizonte - MG

CEP: 30330-080

Telefone: (31) 3409-4774

FAX: (31) 3409-6430

E-mail: patentes@cbl.ufmg.br
