

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

MARCELA CRISTINA MORAIS DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DE
IMPLANTAÇÃO INTRAOCULAR CONTENDO TACROLIMUS PARA O
TRATAMENTO DE UVEÍTES CRÔNICAS**

BELO HORIZONTE

2012

MARCELA CRISTINA MORAIS DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DE
IMPLANTAÇÃO INTRAOCULAR CONTENDO TACROLIMUS PARA O
TRATAMENTO DE UVEÍTES CRÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Co-orientador (a):

Dra. Sílvia Ligório Fialho

(Fundação Ezequiel Dias - FUNED)

BELO HORIZONTE

2012

*Dedico este trabalho à minha família,
que apesar da distância, sempre
esteve comigo e confiou na minha
capacidade e determinação. Em
especial aos meus pais que fizeram o
possível e o impossível para que eu
pudesse chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por TUDO. Momentos difíceis, alegrias, distância da família, resultados, erros... “Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu...” Eclesiastes 3, v.1.

Ao professor Armando da Silva Cunha, pelas oportunidades e confiança desde o primeiro dia. Pela inspiração, por sempre mostrar que devemos almejar mais e buscar sempre e principalmente pela amizade.

À pesquisadora Sílvia Ligório Fialho, pela acolhida incomparável na Fundação Ezequiel Dias, pela confiança no meu trabalho, pelas sugestões sempre excelentes, pela garra ao enfrentar os problemas do dia a dia, pelas conversas, pela inspiração profissional e imensurável apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, meus tesouros. Às minhas irmãs Laís, Amanda e Suelen. Aos meus tios, tias e primos pela acolhida em BH nos finais de semana longe de papai e mamãe.

Ao professor Sidney Nicodemos, pelas dicas fundamentais neste trabalho. Agradeço especialmente a ajuda nas análises de microscopia eletrônica de varredura - MEV.

Ao farmacêutico Alisson Caldeira, sem ele este trabalho não teria sido o mesmo, agradeço de coração à sua contribuição.

Aos amigos da Funed: Darilson, Sr. Adil, Madalena, Márcia, Lurdinha, Cleuza, Pablo, Luciana, Ailton, Yhara, Manuela, Ana Elisa, Millena, Bruno, Maria Amélia, Stela e Guilherme. Em especial à Eliane, sua amizade foi fundamental desde o meu primeiro dia na Funed e à Nayane, pela presteza sempre, principalmente para os plantões nos finais de semana.

À todos os amigos do laboratório de tecnologia farmacêutica da FAFAR/UFMG.

Às queridas: Camila Filizzola (pelas boas e descontraídas conversas), Lorena Vieira (sem você, sua força de vontade, conversas em momentos de aflição e sua amizade, a jornada teria sido mais árdua) e à Livinha (amor de pessoa, sempre pronta a ajudar).

À Arianne, pela sua alegria, sinceridade, amizade e companheirismo.

À Gabi, não tenho palavras pra agradecer, sua amizade é fundamental.

À Bárbara, minha aluna de IC, sem você este trabalho não estaria aqui hoje, você foi fundamental. Obrigada pela companhia nos finais de semana na Funed, pela amizade e principalmente pela competência o que me fez sempre ter muita confiança em seu trabalho.

Ao Gustavo, pela contribuição na parte de estudo *in vivo*.

Ao Pedro Alcantara.

Aos professores da EFAR/UFOP pela minha formação, principalmente às professoras Dra. Tânia Márcia Sacramento Melo e Dra. Kátia Monteiro Novack, que desde os tempos de iniciação científica vêm me apoiando e acreditando nos meus sonhos.

Ao Dário, pela amizade.

À República Morena Flor, meu eterno lar em Ouro Preto, meu refúgio em finais de semana maravilhosos e que juntamente com as irmãs flores me fazem sentir bem independente de qualquer problema. Valeu pela amizade meninas.

À Lu, sem você teria desistido de tudo, amizade ETERNA.

*"Sonhe com o que você quiser.
Vá para onde você queira ir.
Seja o que você quer ser,
Porque você possui apenas uma vida
E nela só temos uma chance
De fazer aquilo que queremos.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz."*

Clarice Lispector

RESUMO

As uveítes são responsáveis por 3 a 15% de todas as causas de cegueira no mundo já que tanto a inflamação intraocular quanto as complicações decorrentes provocam perda severa da visão. O tratamento desta doença, quando ela atinge o segmento posterior do olho, tem sido um problema devido à dificuldade de acesso do fármaco ao seu alvo. O FK506 (tacrolimus) é um imunossupressor comprovadamente eficaz no tratamento das uveítes, entretanto sua administração sistêmica está associada a grandes limitações. Os implantes biodegradáveis vêm se tornando alternativas promissoras como sistemas de liberação intraocular de fármacos por permitirem a liberação dos mesmos no local de ação por um período prolongado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de implantes à base de PLGA (Do inglês - *Poly-lactide co-glycolide acid*), para a liberação de FK506 visando o tratamento das uveítes crônicas. Os implantes foram preparados por moldagem a quente de uma mistura liofilizada, contendo 90% de PLGA (75:25) e 10% de FK506. Para caracterização e avaliação dos sistemas, foram empregadas técnicas de análise térmica (DSC e TGA), FTIR e MEV. Adicionalmente, foram realizados estudos de liberação *in vitro* e *in vivo*. Foi também, desenvolvido e validado um método analítico para a quantificação do FK506 nos sistemas utilizando CLAE. Por meio dos resultados obtidos nos estudos de caracterização, observou-se estabilidade das matérias-primas na temperatura entre 100-120°C utilizada no processo de obtenção dos dispositivos e inexistência de incompatibilidade entre o fármaco e o polímero. As fotomicrografias dos implantes, obtidas por MEV, mostraram uma superfície regular e uniforme. Entretanto, durante o teste de liberação a superfície dos dispositivos se tornou porosa e irregular devido à saída do fármaco por difusão. Os perfis de liberação obtidos *in vitro* e *in vivo* mostraram, respectivamente, uma liberação de 58,20% e 99,97% em 42 dias. Não foram observadas alterações clínicas nos olhos dos animais que receberam os implantes.

Palavras-chaves: uveíte, FK506, PLGA, implantes biodegradáveis, segmento posterior do olho.

ABSTRACT

Uveitis is responsible for 3-15% of all blindness causes in the world since intraocular inflammation and related complications cause severe vision loss. The treatment of this disease, when it reaches the posterior segment of the eye, has been a problem due to the difficulty of drug access to its target. FK506 (tacrolimus) is an immunosuppressive agent with demonstrated efficacy in treating uveitis; however its systemic administration is associated with significant problems. The biodegradable implants are becoming promising alternatives as delivery systems for intraocular drug delivery as they can release the drug at the site of action for a long period of time. Therefore, the objective of this study was the development and characterization of PLGA (*Poly-lactide co-glycolide acid*) - based implants for FK506 delivery to the treatment of chronic uveitis. The implants were prepared by hot molding of a lyophilized mixture containing 90% of PLGA (75:25) and 10% of FK506. In the characterization and evaluation of systems, were employed thermal analysis (DSC and TGA), FTIR and SEM. Additionally, *in vitro* and *in vivo* release studies, were performed. It was also developed and validated an analytical method for quantification of FK506 present in the devices using HPLC. With the results obtained in the characterization studies, we observed stability of raw materials at the temperature used in the process of devices production and there was no incompatibility between the drug and the polymer. The photomicrographs of implants, obtained by SEM, showed a smooth and uniform surface. However, during the release study the surface became porous and irregular due to the output of the drug by diffusion. The *in vitro* and *in vivo* release profiles showed, respectively, a release of 58,20% and 99,97% in 42 days. It was not observed any sign of clinical alterations in the eyes of the rabbits that received the implants.

Keywords: uveitis, FK506, PLGA, biodegradable implants, posterior eye segment.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1 O OLHO.....	22
1.1 Segmento anterior.....	24
<u>1.1.1 Córnea</u>	24
<u>1.1.2 Limbo</u>	24
<u>1.1.3 Íris</u>	25
<u>1.1.4 Cristalino</u>	25
<u>1.1.5 Corpo ciliar</u>	26
1.2 Segmento posterior.....	26
<u>1.2.1 Humor vítreo</u>	26
<u>1.2.2 Retina</u>	27
<u>1.2.3 Coróide</u>	29
<u>1.2.4 Esclera</u>	30
<u>1.2.5 Nervo óptico</u>	30
2 ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR DE FÁRMACOS.....	31
2.1 Administração tópica.....	31
2.2 Administração sistêmica.....	32
2.3 Injeção Intravítrea.....	33
2.4 Vias perioculares - Difusão transescleral.....	34
2.5 Implantes intraoculares.....	36
<u>2.5.1 Implantes intraoculares não biodegradáveis</u>	38
<u>2.5.2 Implantes intraoculares biodegradáveis</u>	40
3 UVEÍTE.....	45
3.1 Aspectos fisiopatológicos.....	46
3.2 Tratamento.....	48
4 TACROLIMUS/FK506.....	50
4.1 Propriedades físico-químicas.....	50

4.2 Mecanismo de ação.....	55
JUSTIFICATIVA.....	61
OBJETIVOS.....	63
1 OBJETIVO GERAL.....	64
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
PARTE I: Validação da metodologia analítica de quantificação do FK506..	65
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
1.1 Materiais.....	66
1.2 Métodos.....	66
<u>1.2.1 Desenvolvimento do método analítico</u>	67
<u>1.2.2 Especificidade e seletividade</u>	69
<u>1.2.3 Estabilidade</u>	70
<u>1.2.4 Linearidade</u>	70
<u>1.2.5 Precisão</u>	72
<u>1.2.6 Exatidão</u>	75
<u>1.2.7 Limite de quantificação (LQ)</u>	76
<u>1.2.8 Limite de detecção (LD)</u>	76
<u>1.2.9 Robustez</u>	77
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
2.1 Desenvolvimento do método analítico.....	79
2.2 Validação do método analítico.....	81
<u>2.2.1 Especificidade e seletividade</u>	81
<u>2.2.2 Estabilidade</u>	83
<u>2.2.3 Linearidade</u>	84
<u>2.2.4 Precisão</u>	86
<u>2.2.5 Exatidão</u>	88
<u>2.2.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)</u>	89
<u>2.2.7 Robustez</u>	90
3 CONCLUSÃO.....	93
PARTE II: Desenvolvimento e caracterização de implantes intra-oculares contendo FK506.....	94
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	95
1.1 Materiais.....	95

1.2 Métodos.....	95
<u>1.2.1 Estudo da morfologia de superfície dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	96
<u>1.2.2 Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</u>	97
<u>1.2.3 Análises Termogravimétricas (TGA)</u>	98
<u>1.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourrier</u>	98
<u>1.2.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i></u>	99
2 RESULTADOS	101
2.1 Preparo dos implantes intraoculares biodegradáveis.....	101
2.2 Estudo da morfologia de superfície dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	103
2.3 Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	109
2.4 Análises termogravimétricas (TGA).....	112
2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourrier.....	114
2.6 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	118
3 CONCLUSÃO	120
PARTE III: Estudo de liberação <i>in vivo</i>	121
1 MATERIAIS E MÉTODOS	122
1.1 Materiais.....	122
1.2 Métodos.....	122
<u>1.2.1 Animais</u>	122
<u>1.2.2 Procedimento de inserção dos implantes</u>	123
<u>1.2.3 Exame Clínico</u>	124
<u>1.2.4 Análise da concentração de FK506 liberada no vítreo</u>	125
2 RESULTADOS	126
2.1 Exame Clínico.....	126
2.2 Análise da concentração de FK506 liberada no vítreo.....	128
3 CONCLUSÃO	131
CONCLUSÃO	132

PERSPECTIVA	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
ANEXO A.....	147

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura do bulbo do olho.....	23
2	Camadas da retina.....	28
3	Ilustração esquemática da injeção intravítrea.....	34
4	Ilustração esquemática das vias periorbitais de administração de fármacos.....	36
5	Mecanismo de hidrólise de PLA, PGA ou PLGA.....	43
6	Estrutura do FK506.....	51
7	Representação esquemática da isomerização cis-trans do FK506.....	53
8	Estrutura do FK506, Tautômero I e Tautômero II.....	54
9	Papel da calcineurina na célula T (A) e mecanismo de ação do FK506 (B).....	56
10	Varredura feita pelo detector DAD do cromatógrafo de uma solução de FK506 a 200,0 µg/mL.....	80
11	Influência da acidificação da fase móvel na intensidade do sinal e simetria do pico relativo ao FK506.....	80
12	Sobreposição dos cromatogramas referentes à solução padrão de FK506 e ao placebo fortificado.....	82
13	Sobreposição dos cromatogramas referentes à solução padrão de FK506, solução diluente, fase móvel e placebo fortificado.....	82
14	Sobreposição ampliada dos cromatogramas referentes ao padrão de FK506, solução diluente, fase móvel e placebo fortificado.....	83
15	Curva de calibração obtida na avaliação da linearidade.....	85
16	Fluxograma do preparo dos implantes intraoculares.....	96
17	Representação do estudo de liberação <i>in vitro</i>	100
18	Implante para estudo de liberação <i>in vitro</i> (A) e para o estudo <i>in vivo</i> (B).....	101
19	Trocar transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA).....	101
20	Fotomicrografia do implante contendo FK506 antes da execução do teste de liberação <i>in vitro</i>	103
21	Fotomicrografia do implante contendo FK506 e do implante de PLGA sem fármaco, após uma semana de execução do teste de liberação <i>in vitro</i>	104
22	Fotomicrografia do implante contendo FK506 e do implante de PLGA sem fármaco, após quatro semanas de execução teste de liberação <i>in vitro</i>	105
23	Fotomicrografia do implante contendo FK506 e do implante de PLGA sem fármaco, após oito semanas de execução do teste de liberação <i>in vitro</i>	

	106
24 Fotomicrografia da lateral do implante contendo FK506 e do implante de PLGA sem fármaco, após uma semana de execução do teste de liberação <i>in vitro</i>	107
25 Fotomicrografia da lateral do implante contendo FK506 e do implante de PLGA sem fármaco, após quatro semanas de execução do teste de liberação <i>in vitro</i>	108
26 Fotomicrografia da lateral do implante contendo FK506 e do implante de PLGA sem fármaco, após oito semanas de execução do teste de liberação <i>in vitro</i>	108
27 Curvas de DSC do FK506, do PLGA 75:25 e do implante contendo 10% p/p de FK506.....	110
28 Curvas de DSC do implante contendo 10% p/p de FK506 e da mistura física 1:10 (FK506:PLGA)	111
29 Curvas de TGA do implante contendo 10% p/p de FK506, do FK506 e do PLGA.....	113
30 Curvas de TGA da mistura liofilizada (PLGA: FK506) contendo 10% p/p de FK506.....	114
31 Espectro de FTIR do FK506.....	115
32 Espectro de FTIR do PLGA 75:25.....	115
33 Espectros de FTIR do FK506, do PLGA 75:25 e do implante.....	116
34 Espectros de FTIR do implante contendo 10% p/p de FK506 e da mistura física 1:10 - FK506:PLGA.....	117
35 Liberação acumulada do FK506 a partir dos implantes de PLGA 75:25 contendo 10% p/p de FK506.....	119
36 Localização intravítrea dos implantes.....	124
37 Exame de fundo de olho em animais da 2ª semana do estudo (A e B) e da 6ª semana (C e D)	127
38 Representação de hemorragia retiniana e descolamento da retina.....	127
39 Concentração de FK506 intravítrea liberada a partir dos implantes ao longo de 6 semanas do estudo.....	129

LISTA DE TABELAS

1	Números de onda (cm^{-1}) do espectro de infravermelho (IV) do FK506.....	52
2	Principais estudos do FK506 em oftalmologia.....	57
3	Diluições para construção das curvas analíticas para quantificação do FK506.....	71
4	Representação dos procedimentos de análise da precisão.....	74
5	Variáveis avaliadas no parâmetro robustez.....	77
6	Combinações das variáveis avaliadas no parâmetro robustez.....	78
7	Condições cromatográficas estabelecidas para a validação da metodologia analítica.....	81
8	Dados de estabilidade das amostras padrão de trabalho e placebo fortificado.....	84
9	Resultados do tratamento estatístico por análise de variância para a regressão linear.....	86
10	Estimativa do DPR_r (repetitividade) e DPR_R (reprodutibilidade) por ANOVA - Avaliação da precisão - Nível de concentração 150,0 $\mu\text{g/mL}$	87
11	Estimativa do DPR_r (repetitividade) e DPR_R (reprodutibilidade) por ANOVA - Avaliação da precisão - Nível de concentração 200,0 $\mu\text{g/mL}$	87
12	Estimativa do DPR_r (repetitividade) e DPR_R (reprodutibilidade) por ANOVA - Avaliação da precisão - Nível de concentração 250,0 $\mu\text{g/mL}$	88
13	Valores de recuperação aparente nos três níveis de concentração utilizados para avaliação da exatidão e valores de média, desvio padrão e variância para cada nível.....	89
14	Valores de concentração encontrados para C_{IB} , no tempo de retenção do FK506.....	90
15	Resultados de recuperação média de cada grupo, na avaliação do parâmetro robustez.....	91
16	Interferência de cada variável no método desenvolvido e validado, para a quantificação de FK506 em implantes oftálmicos.....	92
17	Composição da solução salina balanceada.....	100
18	Peso médio dos implantes obtidos.....	102
19	Resultado de exame clínico por meio de lâmpada de fenda e oftalmoscopia indireta (n = 12)	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
Ag-S	Antígeno S
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
APC	Do inglês - <i>Antigen-presenting cell</i>
ARVO	Do inglês - <i>Association for research in vision and ophthalmology</i>
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CMV	Citomegalovírus
CNTF	Do inglês - <i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CsA	Ciclosporina A
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DSC	Do inglês - <i>Differential scanning calorimetry</i>
EAAU	Do inglês - <i>Experimental autoimmune anterior uveitis</i>
EAU	Do inglês - <i>Experimental autoimmune uveitis</i>
EC	Do inglês - <i>European commission</i>
EIU	Do inglês - <i>Experimental inflammatory uveitis</i>
EPR	Epitélio pigmentado da retina
EVA	Do inglês - <i>Ethylene-vinyl acetate</i>
FK506	Tacrolimus
FKBP	Do inglês - <i>FK506-binding protein</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
5-FU	5-Fluorouridina
IL-2	Interleucina 2
INF- α	Interferon-alfa
IRBP	Do inglês - <i>Interphotoreceptor retinoid-binding protein</i>
I.V.	Infravermelho
LIU	Do inglês - <i>Lens induced uveitis</i>
MetOH	Metanol
NFAT	Do inglês - <i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
PCL	Poli- ϵ - caprolactona
PLA	Do inglês - <i>Poly-lactide acid</i>

PLGA	Do inglês - <i>Poly-lactide co-glycolide acid</i>
PVA	Do inglês - <i>Polyvinyl alcohol</i>
PVDF	Do inglês - <i>Polyvinylidene fluoride</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SLM	Sistema de liberação modificada
TA	Triancinolona
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Do inglês - <i>Thermogravimetric analysis</i>
TNF- α	Do inglês - <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
t-PA	Do inglês - <i>Tissue plasminogen activator</i>
TRC	Do inglês - <i>T cell receptor</i>
Treg	T reguladoras

INTRODUÇÃO

A uveíte é uma das doenças oculares mais frequentes em todo mundo. No ocidente esta doença afeta aproximadamente duzentas a cada cem mil pessoas, resultando em uma incidência estimada de vinte novos casos a cada cem mil habitantes por ano. Mais da metade de todos os pacientes com uveíte desenvolvem complicações relacionadas à doença e mais de 35% desses pacientes sofrem de perda visual severa. Acredita-se que a uveíte represente 5-10% de todos os casos de cegueira nos Estados Unidos. Essa doença e suas complicações são mais comuns nos países em desenvolvimento, nos quais a incidência chega a alcançar 714 novos casos/100.000 habitantes. Esta condição potológica ainda é responsável por até 25% dos casos de cegueira (LONDON *et al.*, 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde (2010), a uveíte ou uveoretinite é um termo geral que se refere à inflamação da retina e úvea (revestimento pigmentado vascular do bulbo do olho, consistindo da coróide, corpo ciliar e íris). Essa doença é classificada baseando-se na anatomia, como anterior, intermediária, posterior ou como panuveíte se envolve ambas as partes, anterior e posterior do olho.

O tratamento da uveíte varia conforme a etiologia e a localização anatômica da inflamação. A terapia visa principalmente a supressão da reatividade imune aberrante e a manutenção da integridade do sistema de defesa do hospedeiro pelo maior tempo possível com conseqüente prevenção das complicações na visão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Ainda de acordo com este último autor, dentre os fármacos utilizados na terapia da uveíte estão os imunossuppressores, sendo a CsA (ciclosporina A) o agente de primeira escolha.

Outro imunossupressor, o FK506 (tacrolimus), também apresenta eficácia comprovada, por estudos clínicos, no tratamento de uveítes quando administrado pela via sistêmica e experimentalmente pela via intraocular através de injeções intravítreas (HOGAN *et al.*, 2007; OH-I *et al.*, 2007a; ZHANG *et al.*, 2010). Ele apresenta potência superior além de ter menor incidência de efeitos adversos quando comparado com a CsA (PETERS *et al.*, 1993; MOCHIZUKI *et al.*, 1993; SLOPER *et al.*, 1999; KILMARTIN *et al.*, 1998).

Entretanto, o tratamento de doenças do segmento posterior do olho é limitado pela dificuldade no transporte de doses efetivas de fármacos para o vítreo, retina e coróide. Os fármacos aplicados topicamente são pouco absorvidos por causa da baixa permeabilidade dos tecidos oculares externos e ao lacrimejamento (BOOTH *et al.*, 2007; GAUDANA *et al.*, 2010)

Embora a administração sistêmica seja capaz de transportar fármacos para o segmento posterior do olho, as barreiras hematoaquosa e hematorretiniana dificultam a absorção e, normalmente, são necessárias doses elevadas, as quais estão geralmente associadas a potenciais efeitos adversos. Injeções intravítreas são capazes de transportar fármacos para o segmento posterior do olho, mas é uma técnica invasiva, pouco tolerada pelos pacientes e apresenta riscos de infecções oculares e danos aos tecidos (FIALHO, 2003; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

Visando a obtenção de níveis terapêuticos adequados de fármacos no segmento posterior do bulbo do olho por longos períodos, sistemas de liberação poliméricos implantados diretamente no vítreo estão sendo investigados para o tratamento de várias doenças vítreo-retinianas. Esses implantes podem ser preparados a partir de diferentes polímeros, os quais podem ser, biodegradáveis ou não-biodegradáveis (FIALHO, 2003).

Diante dos fatos discutidos, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de sistemas poliméricos de implantação intraocular contendo FK506 para o tratamento de uveítes crônicas.

REVISÃO DA LITERATURA

1 O OLHO

De acordo com a SBO (Sociedade Brasileira de Oftalmologia) 2012, o olho é um órgão par, situado em cada uma das órbitas, no nível que separa o crânio da face. Sua função básica é captar a luz originada nos objetos que nos cercam fazendo-a ser focalizada no plano posterior do globo. No plano posterior é transformada em impulsos eletromagnéticos, transmitidos pelo nervo óptico e vias ópticas, até os centros visuais cerebrais. Nestes centros, se dá a percepção visual, com o reconhecimento da imagem e a localização do objeto focalizado. Aparentemente, o olho tem a forma esférica e por isto é também chamado de globo ocular. O olho, resumidamente, tem três túnicas, uma lente e dois fluidos. As três túnicas são de fora para dentro:

A externa ou fibrosa, com duas porções:

Anterior, transparente que é a córnea; e

Posterior, opaca que é a esclerótica ou esclera.

A média ou vascular, com três porções:

Íris;

Corpo ciliar; e

Coróide.

A interna ou neurosensorial, que é a retina. Nesta, destaca-se:

Mácula: região central altamente diferenciada; e

Nervo óptico: condutor dos estímulos para o cérebro.

No interior do olho, tem-se o cristalino ou lente. Ela funciona de maneira dinâmica, pois ao mudar sua forma para mais arredondada permite a focalização no plano da retina, dos raios que iriam ser focalizados atrás dela. Adiante do cristalino está o primeiro fluido, que pelo seu aspecto tem o nome de humor aquoso. Este fluido preenche dois espaços: um entre a íris e a córnea, chamado câmara anterior e o outro, entre a íris e cristalino, a câmara posterior. Estes espaços se comunicam através da pupila, orifício circundado pela íris. Através da pupila, passam os raios luminosos, na direção da retina. Atrás do cristalino, entre este e a retina temos a câmara vítrea, preenchida por uma substância com consistência de gel, chamada de vítreo ou humor vítreo. O olho, anatomicamente, pode ainda se dividir em segmento anterior e posterior (SBO, 2012). Suas principais estruturas estão representadas na **Figura 1**.

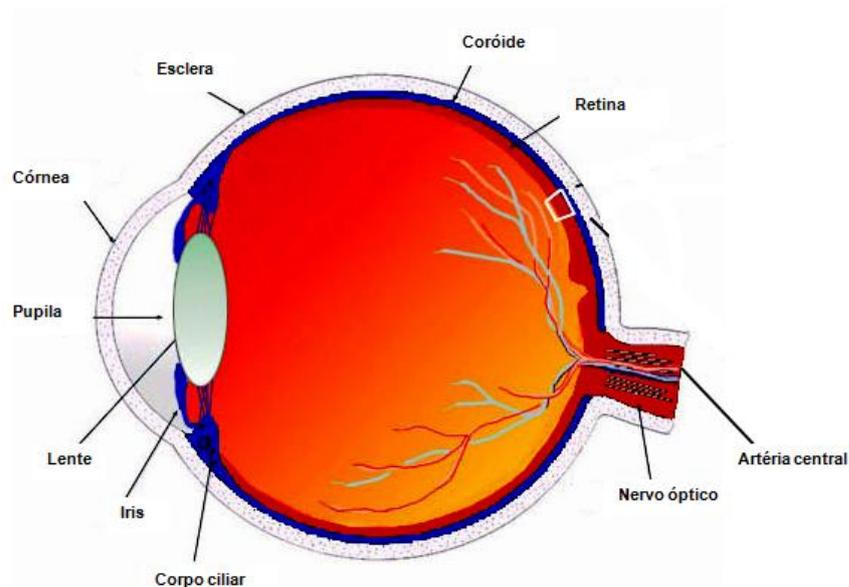


Figura 1 - Estrutura do bulbo do olho (Fonte: adaptação de HEEGAND, 1997).

1.1 Segmento anterior

1.1.1 Córnea

A córnea é um tecido avascular e transparente, que assegura os dois terços do poder de refração do olho. É a região mais curva da túnica fibrosa. Ela transmite as radiações de comprimento de onda compreendido entre 310 nm (UV) e 2500 nm (IV). Constitui uma barreira anatômica e fisiológica protetora das estruturas internas do olho. A resistência mecânica da córnea se deve à substância própria, que representa em média, 90% da espessura corneana. A substância própria é constituída de fibrilas de colágeno organizadas em estruturas cristalinas, separadas por proteoglicanos. As fibrilas de colágeno, assim como os proteoglicanos, são sintetizadas e renovadas pelos ceratócitos. A organização espacial das fibrilas de colágeno e a uniformidade do diâmetro das fibrilas evitam a difração dos raios luminosos e permitem a passagem da luz visível incidente através humor aquoso (DANTAS, 2011).

1.1.2 Limbo

O limbo é uma zona de transição composta de elementos da córnea e da esclera. O limbo é importante como marco cirúrgico e também devido a sua composição celular incomum e à presença de células-tronco dos tecidos conjuntivais e episclerais fortemente aderentes acima do mesmo. É a partir desta região que um novo epitélio corneano é derivado, e devido ao alto teor de antígeno presente nas células deste tecido, é de grande importância nas mudanças imunológicas que ocorrem na esclera e na córnea durante a inflamação (DANTAS, 2011).

1.1.3 Íris

A íris é a porção colorida do olho, que impede o espalhamento da luz dentro do bulbo. É a parte mais anterior da camada média, que também inclui o corpo ciliar e a coróide. A superfície anterior da íris é o estroma, uma estrutura pouco organizada contendo melanócitos, vasos sanguíneos, músculos lisos e nervos simpáticos e parassimpáticos. As diferenças individuais na cor da íris refletem a variação no número de melanócitos localizados no estroma. Essa variação individual no número de melanócitos pode ser uma consideração importante para a distribuição ocular dos fármacos em virtude de sua ligação à melanina. Outro papel importante da íris é que ela controla o tamanho da pupila, pois está conectada com fibras musculares que relaxam e contraem de acordo com uma resposta autônoma à variação da luz recebida (LLOYD *et al.*, 2001). Através deste controle no tamanho da pupila, ela é capaz de regular a quantidade maior ou menor de luz que deve impressionar a retina (DANTAS, 2011).

1.1.4 Cristalino

O cristalino ou lente tem a forma biconvexa com diâmetro de aproximadamente 10 mm e um centro com espessura de 3-4 mm. Ela focaliza a passagem da luz até a retina. A sua flexibilidade permite a visão de objetos próximos e distantes, propriedade denominada acomodação visual (DYCE *et al.*, 1997). Esse efeito é atribuído à capacidade da deformação elástica da lente que através da contração dos músculos ciliares focaliza os raios luminosos e os direciona para a mácula. Com a idade, a perda da capacidade de acomodação origina a presbiopia (também conhecida como "vista cansada") que necessita da utilização de lentes corretivas convergentes para ocorrência da visão de perto (LLOYD *et al.*, 2001; DANTAS, 2011).

1.1.5 Corpo ciliar

É a porção intermediária da camada média, localizado atrás da íris e adiante da coróide. É responsável pela formação do humor aquoso, importante para a nutrição do segmento anterior e regulador da pressão intraocular. É fundamental no processo de acomodação visual através do músculo ciliar. A parte anterior do corpo ciliar é denominada *pars plicata* e a parte posterior, *pars plana*. O músculo ciliar está organizado em camadas longitudinal externa, radial média e circular interna. A contração coordenada desse aparelho de músculos lisos pelo sistema nervoso parassimpático provoca o relaxamento das zônulas que suspendem o cristalino, permitindo que ele se torne mais convexo e se desvie ligeiramente para frente. Tal processo conhecido como acomodação, permite a focalização de objetos próximos (GOODMAN & GILMAN, 2006; SBO, 2012).

1.2 Segmento posterior

1.2.1 Humor vítreo

O humor vítreo é uma substância composta por aproximadamente 98% de água, seu volume é de cerca de 4,0 mL e tem relativa ausência de células originadas de tecidos adjacentes e que poderiam causar mudanças degenerativas e proliferativas no mesmo. O vítreo contém também, fatores com atividades biológicas, que podem influenciar a função de células e enzimas no próprio vítreo e talvez nos tecidos adjacentes (DANTAS, 2011).

Essa estrutura está em contato direto com a retina, corpo ciliar e porção posterior da lente. O humor vítreo é capaz de promover estabilidade, devido a sua grande viscosidade, aos componentes posteriores do olho, atenuando o estresse que pode ser gerado à retina devido aos súbitos movimentos. Esta observação é justificável

quando se considera que a primeira etapa no processo de descolamento da retina é sua separação do humor vítreo (LLOYD *et al.*, 2001).

1.2.2 Retina

A retina é a parte do olho sensível à luz. Seus componentes funcionais se dispõem em camadas, de fora para dentro (**Figura 2**), da seguinte maneira:

- 1) camada pigmentar;
- 2) camada de bastonetes e cones que se projeta na camada pigmentar;
- 3) camada nuclear externa contendo os corpos celulares dos bastonetes e cones;
- 4) camada plexiforme externa;
- 5) camada nuclear interna;
- 6) camada plexiforme interna;
- 7) camada ganglionar;
- 8) camadas de fibras do nervo óptico; e
- 9) membrana limitante interna.

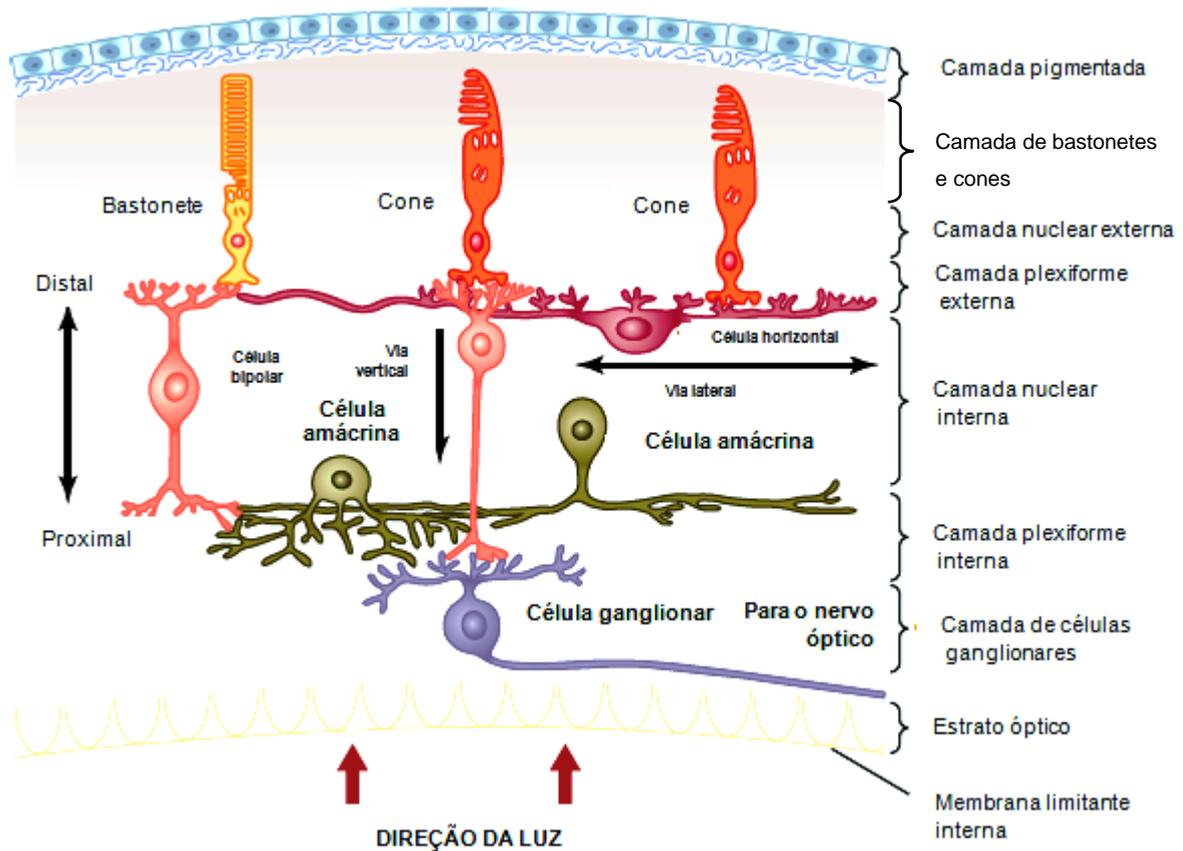


Figura 2 - Camadas da retina (Fonte: adaptação de GUYTON *et al.*, 2006).

Depois que a luz atravessa as estruturas refringentes do olho e então atravessa o humor vítreo, ela atinge a retina a partir de sua camada mais interna, ou seja, atravessa primeiramente as células ganglionares e depois a camada plexiforme e nuclear internas antes de finalmente chegar à camada de bastonetes e cones que delinea a borda externa. Os bastonetes e cones contêm substâncias químicas que se decompõem com a exposição à luz e, no processo fotoquímico da visão, excitam as fibras do nervo óptico. A substância química sensível à luz nos bastonetes é chamada rodopsina e as substâncias químicas fotossensíveis nos cones são os chamados pigmentos dos cones ou pigmentos coloridos. Esses pigmentos coloridos têm composições apenas discretamente diferentes daquelas da rodopsina. Os bastonetes são responsáveis pela visão em preto-e-branco em condições de baixa luminosidade e os cones são responsáveis pela visão em cores (GUYTON *et al.*, 2006).

Em relação ao suprimento sanguíneo da retina, ele pode ser resumido da seguinte forma: para as camadas internas ele é derivado da artéria central da retina, que entra no bulbo do olho através do centro do nervo óptico e depois se divide para suprir toda a superfície retiniana interna (**Figura 1**). Deste modo, as camadas internas da retina têm seu próprio suprimento sanguíneo, independente das outras estruturas do olho. No entanto, a camada mais externa da retina é aderente à coróide, que também é um tecido altamente vascularizado que se situa entre a retina e a esclera. Essas camadas externas da retina, especialmente os segmentos externos dos bastonetes e cones dependem, para sua nutrição, da difusão de oxigênio a partir dos vasos da coróide (GUYTON *et al.*,2006).

1.2.3 Coróide

A coróide se estende do corpo ciliar ao nervo óptico. Ela é mais espessa na região posterior e gradualmente se torna mais fina ao se aproximar da região anterior. Encontra-se firmemente ligada à esclera, na região do nervo óptico, onde as artérias ciliares posteriores e os nervos ciliares penetram no olho. Esta estrutura fornece nutrientes para as células da retina, uma vez que é altamente vascularizada. A retina e a coróide são separadas pela membrana de *Bruch* (LLOYD *et al.*, 2001; COLTHURST *et al.*, 2000). Outra função da coróide é a regulação do calor na retina, ela dissipa este calor que é acumulado pela ação da luz no epitélio pigmentado, defendendo assim o olho de condições extremas de temperatura do meio ambiente (DANTAS 2011).

1.2.4 Esclera

A esclera humana é uma estrutura que executa várias funções importantes para a integridade visual. Microscopicamente pode ser dividida em: episclera, substância própria escleral (estroma) e lâmina fusca. A esclera produz um firme substrato para os delicados conteúdos intraoculares, protegendo-os de lesões. Sua opacidade assegura que a dispersão interna da luz não afete a imagem da retina. Adicionalmente, a esclera também facilita a rotação do olho, sem distorção significativa em torno de 180°, através dos músculos extraoculares. A forma do olho é, em parte, mantida pela presença dos conteúdos intraoculares e da pressão intraocular. Entretanto, a esclera tem que ser suficientemente rígida para fornecer condições relativamente constantes, de forma que, quando o olho se mover, a pressão intraocular não flutue e afete a visão (DANTAS, 2011).

1.2.5 Nervó óptico

O nervo óptico é um nervo mielinizado que leva os impulsos da retina para o sistema nervoso central. As fibras mielinizadas são oriundas das células ganglionares da retina. É composto de (1) parte intraocular, visível como disco óptico de 1,5 mm na retina; (2) parte intraorbitária; (3) parte intracanalicular; e (4) parte intracraniana. O nervo é envolvido pelas meninges contínuas ao cérebro. Por não possuir núcleo no tronco encefálico é um trato cerebral especializado (GOODMAN & GILMAN, 2006; DANTAS, 2011).

2 ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR DE FÁRMACOS

2.1 Administração tópica

O tratamento de doenças que acometem o vítreo e a retina tem sido um problema devido à dificuldade de acesso a essas estruturas (PEYMAN & GANIBAN, 1995; SILVA *et al.*, 2010; SHAH *et al.*, 2010).

De acordo com Shah *et al.* (2010), a via tópica é a via de administração mais utilizada para viabilizar fármacos para ação intraocular, entretanto é prejudicada por muitos componentes do segmento anterior do olho, incluindo o epitélio da córnea, a conjuntiva e a esclera. Adicionalmente, em comparação com as outras formas de administração, haverá, após aplicação, uma maior distância para difusão do fármaco até o seu local de ação no segmento posterior do olho. É importante considerar também a natureza acelular do vítreo, que impacta de forma negativa a farmacocinética e a distribuição das moléculas administradas. Além disso, processos fisiológicos como a produção de lágrimas, o metabolismo nos tecidos oculares e a ligação dos fármacos às proteínas teciduais também interferem na aplicação tópica.

A forma farmacêutica mais empregada na administração ocular tópica de medicamentos são os colírios, que devido aos motivos já descritos anteriormente, resultam em concentrações mais elevadas nos tecidos do segmento anterior do olho (córnea, conjuntiva, esclera, humor aquoso e corpo ciliar) e apresenta efeito terapêutico mínimo na região posterior (coróide, humor vítreo e retina), que, geralmente, é mantido com aplicações freqüentes da formulação (JARVINEN *et al.*, 1995; SHAH *et al.*, 2010).

2.2 Administração sistêmica

A administração sistêmica de medicamentos é outro método de acesso de fármacos, ao segmento posterior do olho. Entretanto, medicamentos administrados por essa apresentam dificuldade em atingir o segmento posterior do olho devido, principalmente, às barreiras hematoaquosa e hematorretiniana, que dificultam a entrada de substâncias da circulação sanguínea para a retina. Apenas uma pequena dose de alguns fármacos ultrapassa estas barreiras. Dessa forma, doses repetidas e algumas vezes elevadas são necessárias para a manutenção da concentração em níveis terapêuticos dentro do olho, o que pode ocasionar sérios efeitos adversos ao paciente (HUGHES *et al.*, 2005; OGURA, 2001).

De acordo com Barar *et al.* (2008), a barreira hematorretiniana é dividida em interna e externa, compostas respectivamente pelo EPR (epitélio pigmentado da retina) e pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos. O EPR contém várias bombas de efluxo incluindo a glicoproteína P e a proteína associada à multirresistência a drogas, o que reduz a permeabilidade de vários compostos no vítreo.

Outra limitação da administração sistêmica de medicamentos é a diminuição do tempo de ação e da potência do fármaco, que ocorrem em consequência da distribuição para outros tecidos e degradação (por exemplo, o metabolismo hepático) antes que ele alcance seu alvo. Interações medicamentosas podem também ocorrer, quando os pacientes possuírem condições patológicas coexistentes (SHAH *et al.*, 2010).

2.3 Injeção Intravítrea

A injeção intravítrea (**Figura 3**) tem sido a via de administração mais empregada para a obtenção de concentrações adequadas de fármacos no vítreo e na retina. No entanto, a rápida circulação sanguínea na retina promove diminuição da meia-vida dos fármacos nesses locais, reduzindo rapidamente suas concentrações a níveis subterapêuticos. Para que os níveis se mantenham dentro da faixa terapêutica, são necessárias injeções repetidas no interior da cavidade vítrea, as quais podem causar desconforto para o paciente, hemorragia vítrea, endoftalmite, catarata e descolamento da retina (FIALHO, 2003).

Apesar de a injeção intravítrea disponibilizar fármacos diretamente no humor vítreo, a distribuição dos mesmos não é uniforme. Moléculas pequenas podem se distribuir rapidamente pelo vítreo, enquanto que a difusão de moléculas maiores é lenta. Essa distribuição também depende, além da massa molecular do fármaco administrado, da condição fisiopatológica, pois esta pode modificar a composição do humor vítreo (URTTI, 2006; GUADANA *et al.*, 2010).

Ainda de acordo com os últimos autores, a meia-vida dos fármacos no vítreo, como já citado anteriormente, pode determinar a eficácia terapêutica. Após a injeção intravítrea, o fármaco é eliminado tanto pela chamada via anterior quanto pela posterior. A via de eliminação anterior envolve a difusão do fármaco através do vítreo para o humor aquoso pelos chamados “espaços zonulares”. Uma vez presente no humor aquoso, a molécula é eliminada através do *turnover* deste e do fluxo sanguíneo do trato uveal. Já a via de eliminação posterior, requer a permeação do fármaco através da barreira hematorretiniana o que necessita de permeabilidade passiva ótima ou mecanismos de transporte ativo. Como resultado, o caráter hidrofílico e maior massa molecular tendem a aumentar a meia-vida de fármacos no humor vítreo.

A administração de medicamentos por injeção intravítrea, no tratamento da uveíte, possui importante papel, pois minimiza algumas limitações das outras vias de administração. Dentre essas, podem ser citadas: a dificuldade no controle da inflamação ocular e os efeitos adversos decorrentes do uso prolongado de imunossupressores e/ou antiinflamatórios. OH-I *et al.* (2007a), demonstrou que a injeção intravítrea de FK506 foi efetiva na supressão da EAU (do inglês - *Experimental Autoimmune Uveitis*) em olhos de ratos, mesmo após o início da doença, sem a ocorrência de efeitos adversos.

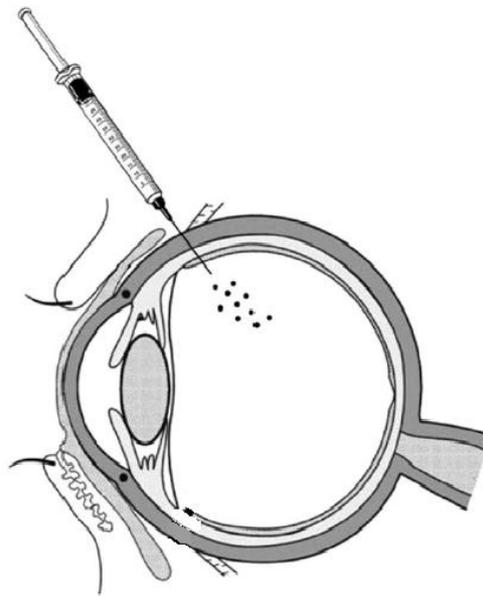


Figura 3 - Ilustração esquemática da injeção intravítrea (Fonte: THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

2.4 Vias periorculares - Difusão transescleral

Dentre as vias periorculares para administração de fármacos no segmento posterior do olho se encontram: a retrobulbar, a peribulbar, a subtenoniana e a subconjuntival (**Figura 4**). Essas vias permitem a deposição de moléculas na superfície externa da esclera, minimizando o risco de endoftalmite e dano na retina como pode ocorrer com a administração por injeção intravítrea. A via subconjuntival e a subtenoniana são amplamente utilizadas no estudo da liberação transescleral de fármacos devido às suas proximidades com a esclera (THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

Diversos pesquisadores utilizam a via de administração transescleral de medicamentos como primeira escolha para que se obtenham concentrações terapêuticas no vítreo, na retina e coróide (AMBATI & ADAMIS, 2002; WEIJTENS *et al.*, 2000).

De acordo com Thrimawithana *et al.* (2011), a escolha por esta via de administração de fármacos é em parte, devido aos seguintes fatores: à grande área superficial da esclera e ao alto grau de hidratação que a torna propícia para difusão de compostos solúveis em água. Essa região do olho é também hipocelular e, portanto, tem poucas enzimas proteolíticas ou proteínas que possam degradar ou se ligar ao fármaco. Outra vantagem dessa via de administração é o fato de que a permeabilidade escleral não diminui de forma significativa com o envelhecimento o que permite que essa via seja frequentemente escolhida para o tratamento de doenças crônicas em idosos, como a retinopatia diabética e a DMRI (degeneração macular relacionada à idade) (OLSEN *et al.*, 1995).

Shah *et al.* (2010) afirmam que embora o método transescleral elimine alguns dos inconvenientes das forma de administração intravítrea, ele também possui desvantagens. Dentre elas está a necessidade do fármaco de atravessar várias camadas de tecido o que pode diminuir a biodisponibilidade do mesmo. Com essa diminuição, são necessárias doses elevadas para que a medicação seja eficaz.

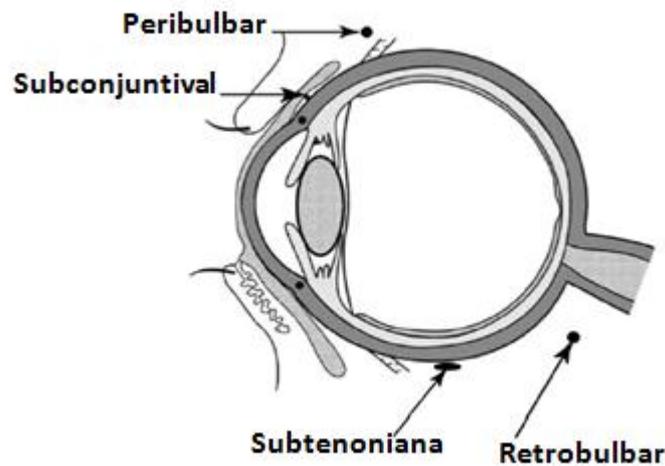


Figura 4 - Ilustração esquemática das vias perioculares de administração de fármacos (Fonte: THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

2.5 Implantes intraoculares

Como consequência das desvantagens já descritas tanto para a via ocular tópica, quanto para a sistêmica e também para as injeções peri e intraoculares, o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas se tornou necessário em oftalmologia. Uma variedade de sistemas de liberação controlada e ou sustentada de fármacos estão sendo estudados, entre eles, destacam-se os implantes intraoculares.

O primeiro sistema de liberação sustentada para administração intraocular de fármaco, foi desenvolvido por Michelson *et al* (1979). O dispositivo continha o fármaco gentamicina e era como uma minibomba osmótica para implantação subconjuntival para o tratamento de endoftalmites. Este sistema foi implantado em ratos por meio de incisão do bulbo do olho e a liberação de 0,01 mg de fármaco por mL de corpo vítreo em um período de quatro dias e meio foi observada. Posteriormente, outros implantes foram sendo desenvolvidos objetivando o tratamento de retinite causada por CMV (citomegalovírus), endoftalmites, vitreoretinopatia proliferativa, retinites virais e uveítes, apresentando resultados

satisfatórios quanto ao perfil de liberação controlada de fármacos (PEYMAN & GANIBAN, 1995; COLTHURST *et al.*, 2000).

Os implantes intraoculares são sistemas de liberação controlada de fármacos preparados a partir de diferentes polímeros reconhecidamente biocompatíveis, biodegradáveis ou não-biodegradáveis. As estruturas dos implantes intraoculares podem ser de dois tipos: matriciais (sistemas monolíticos) e reservatórios. No sistema matricial, o fármaco se encontra disperso na matriz polimérica, sendo liberado a partir da degradação polimérica e dos canais e poros formados na matriz. No sistema reservatório, o fármaco se encontra disperso ou solúvel em uma cavidade, sendo liberado a partir da degradação da membrana que reveste a cavidade (DASH & CUDWORTH II, 1998; FIALHO, 2003; YASUKAWA *et al.*, 2005).

Implantes preparados a partir de sistemas poliméricos podem ser aplicados em diferentes regiões do olho. Ordenando-se as regiões da mais superficial a mais profunda, temos: região subconjuntival, região subtenoniana, esclera e o interior do bulbo do olho (câmara anterior e humor vítreo). Em geral, quanto mais profunda a região, mais delicado o procedimento e mais eficaz a concentração do fármaco no vítreo e na retina (ATHANASIOU *et al.*, 1996; KIMURA & OGURA, 2001).

Existem vários fatores a serem considerados no desenvolvimento de sistemas de liberação intraocular implantáveis. Os implantes devem ser quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalergênicos e não devem provocar respostas inflamatórias no local em que serão aplicados. Adicionalmente, as características químicas e físicas do material não devem ser modificadas pelo tecido local (DASH & CUDWORTH II, 1998).

2.5.1 Implantes intraoculares não biodegradáveis

Os polímeros comumente utilizados no processo de manufatura destes implantes são: o silicone, o álcool polivinílico (PVA) e o poli (etileno-co-acetato de vinila) (EVA) (BOURGÉS *et al.*, 2006; YASUKAWA *et al.*, 2005; DASH e CUDWORTH II, 1998; SMITH *et al.*, 1992). Geralmente ocorre uma liberação controlada e de maior duração em relação àquela obtida com os implantes biodegradáveis. A difusão lenta do fármaco através da matriz polimérica é que proporciona sua liberação controlada.

A principal desvantagem desse tipo de dispositivo é a necessidade de remoção, após completa liberação do fármaco, por processos cirúrgicos (YASUKAWA *et al.*, 2001). (BOUGERS *et al.*, 2006; YASUKAWA *et al.*, 2005; FIALHO *et al.*, 2003).

Atualmente, dois implantes intravítreos não biodegradáveis estão em uso clínico o Vitrasert[®] (Bausch & Lomb, EUA) e o Retisert[®] (Bausch & Lomb, EUA). O Vitrasert[®] contém ganciclovir para o tratamento de retinite por CMV e o Retisert[®] a fluocinolona acetonida para o tratamento de uveíte crônica posterior não infecciosa (THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

Musch *et al.* (1997), demonstrou uma diferença significativa entre o grupo de pacientes tratados com implantes de ganciclovir (Vitrasert[®] - Bausch & Lomb, EUA) e aquele que recebeu tratamento via intravenosa. O tempo médio para progressão da doença no primeiro grupo foi 2x superior em relação ao último que recebeu o tratamento sistêmico (196 dias versus 71, respectivamente).

O Retisert[®] (Bausch & Lomb, EUA) é um sistema do tipo reservatório que libera o fármaco (fluocinolona acetonida) por até dois anos e meio. Os estudos clínicos desse medicamento mostraram uma diminuição significativa na recorrência da doença em pacientes que receberam o sistema (de 51,4% para 6,1% após implantação) e também a diminuição da necessidade de co-terapia com outros fármacos. No entanto, o dispositivo aumentou a pressão intraocular e a progressão

de catarata em 51,1% dos olhos tratados, necessitando de medicação anti-hipertensiva e 9,9% dos pacientes necessitando de cirurgia (JAFFE *et al.*, 2006).

Vários outros implantes não biodegradáveis estão em estudo clínico e dentre estes se encontram: o Iluvien[®] (Alimera Science, EUA e pSivida, EUA), o I-vation[™] e um novo sistema de encapsulação de células, o NT-501 (Neurotech, USA). O Iluvien[®], também conhecido como Medidur[®], é um implante na forma de bastão contendo fluocinolona acetonida e está em fase III de estudo clínico para o tratamento de edema macular diabético. Ao contrário do Retisert[®] (Bausch & Lomb, EUA), o Iluvien[®] pode ser inserido no vítreo utilizando uma agulha de calibre 25 e espera-se uma liberação de fluocinolona por até três anos (KANE *et al.*, 2008).

O I-vation[™] (SurModics, EUA) é uma nova tecnologia que possui uma bobina helicoidal de titânio com a finalidade de aumentar a área superficial para a liberação do fármaco. A bobina é revestida com TA e polímeros não biodegradáveis e espera-se a liberação do fármaco por pelo menos dois anos. Este dispositivo se encontra em fase I de estudo clínico para o tratamento também do edema macular diabético (KUNO *et al.*, 2010).

O implante NT-501 (Neurotech, USA) contém células do EPR, geneticamente modificadas para secretarem o CNTF (do inglês - *Ciliary neurotrophic factor*). Este fator de crescimento inibe a degeneração dos fotorreceptores. O implante, que consiste de uma membrana semipermeável selada, é suturado sobre a esclera por meio de um *loop* de titânio. Este dispositivo permite o influxo de oxigênio e nutrientes para as células que se encontram em seu interior e o CNTF secretado pelas células do EPR pode se difundir para o exterior. Como as células são encapsuladas, o dispositivo também impede a resposta imune do hospedeiro contra as mesmas. Atualmente, o NT-501 está em ensaio clínico de fase II para o tratamento de DMRI não-exudativa e retinite pigmentosa e representa o único tipo de implante para liberação de proteína (KUNO *et al.*, 2010; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

Mesmo diante das vantagens apresentadas pelos implantes produzidos com polímeros não biodegradáveis, tais como melhor controle na cinética de liberação do fármaco, facilidade de produção e esterilização, nosso grupo tem trabalhado no desenvolvimento de sistemas confeccionados com biomateriais biodegradáveis. Busca-se nesse caso, eliminar o maior inconveniente encontrado com o uso de polímeros não biodegradáveis que é a necessidade de remoção do sistema após completa liberação do fármaco veiculado.

2.5.2 Implantes intraoculares biodegradáveis

Este tipo de implantes é constituído por polímeros biodegradáveis. Tais polímeros podem ser definidos como aqueles que sofrem degradação macromolecular in vivo, por ação de enzimas, microrganismos ou células. O processo de biodegradação envolve quebra de cadeia e modificações da massa molecular e da solubilidade do polímero. Processos biológicos, físicos e químicos, podem atuar na biodegradação. Esse tipo de dispositivo não necessita de remoção após o tratamento, mas podem levar a perfis de liberação não desejável do fármaco que pode ser atribuída à extensa degradação da matriz polimérica (BOUGERS *et al.*, 2006).

Vários polímeros podem ser utilizados na produção desses sistemas. Polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos estão sendo estudados, mas apenas alguns são biocompatíveis. De acordo com Oréfice *et al.* (2006), a biocompatibilidade de polímeros envolve normalmente quatro fenômenos: (1) processos de concentração de biomacromoléculas junto à superfície dos materiais (adsorção), logo após a implantação destes no corpo; (2) resposta local do tecido à presença do biomaterial (observada na forma de respostas inflamatórias e imunológicas); (3) efeito do ambiente corpóreo no material (visualizado, por exemplo, pelo estabelecimento de processos de degradação do polímero); e (4) resposta do corpo como um todo à presença do biomaterial (percebida através do aparecimento de tumores, alergias, infecções generalizadas etc).

Dentre os polímeros biodegradáveis naturais, podem ser citados: aqueles à base de proteínas, como as albuminas bovina e humana, o colágeno e a gelatina, entretanto eles apresentam uso restrito por conterem pureza questionável e, em alguns casos, atividade antigênica significativa. Já os sintéticos, representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poliacrilamidas, têm apresentado crescente interesse na aplicação como sistemas de liberação de fármacos. Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a PCL (poli- ϵ -caprolactona), o PLA (do inglês - *poly-lactide acid*) e os diferentes tipos de PLGA (do inglês - *poly-lactide-co-glycolide acid*) (JAIN, 2000; FIALHO *et al*, 2003; BOUGERS *et al.*, 2006). São chamados poliésteres uma vez que são constituídos de monômeros unidos por ligações do tipo éster em sua cadeia polimérica, tais ligações são propensas à hidrólise e são chamadas ligações hidroliticamente lábeis (NAIR & LAURENCIN, 2007).

O PLA, que é constituído pelo monômero ácido láctico, possui importante papel na área biomédica. Dentre suas aplicações estão: em sistemas de liberação de fármacos, em suturas do tipo absorvíveis e implantes/próteses médicas. São vários os motivos deste destaque, entre eles, a facilidade de obtenção da molécula de ácido láctico, ela pode ser eficientemente produzida por fermentação a partir de fontes renováveis como o amido e vários açúcares. Além disso, o PLA possui alto ponto de fusão (175°C) e elevado grau de transparência. Este polímero, assim como o PLGA, possui versatilidade sintética, pode ser sintetizado via polimerização de moléculas de ácido láctico ou por abertura e polimerização do dímero cíclico deste ácido (TOKIWA & CALABIA, 2006; NAIR & LAURENCIN, 2007).

O PLGA, constituído por duas unidades monoméricas diferentes (ácido láctico e ácido glicólico), também possui o mesmo destaque do PLA na área biomédica. Este polímero é comercialmente disponível em diferentes proporções de ácido láctico e ácido glicólico. Sabe-se que seu tempo de degradação está diretamente relacionado com esta proporção. Estima-se que o PLGA 50:50, ou seja, 50% de ácido láctico e 50% de ácido glicólico, degrada em aproximadamente 1-2 meses, o 75:25 em 4-5 meses e o 85:15 leva um maior tempo para se degradar, 5-6 meses (TOKIWA & CALABIA, 2006).

Algumas outras características do PLGA, como a velocidade de degradação, também dependem da proporção entre ácido lático e glicólico em sua estrutura. De acordo com Fialho (2003), quanto maior a proporção de ácido lático, maior a hidrofobicidade do polímero, já que absorve menos água, e conseqüentemente, menor será a velocidade de degradação.

Outros fatores responsáveis por alterações no período de degradação dos polímeros biodegradáveis são: tamanho e forma da superfície do sistema; morfologia dos componentes do sistema (amorfo, semicristalino, cristalino); local de implantação e mecanismo de hidrólise (FIALHO *et al.*, 2003; NAIR & LAURENCIN, 2007).

A Tg (temperatura de transição vítrea) do PLA e dos diferentes tipos de PLGA se encontra acima da fisiológica (37°C) e, nessa condição, eles se encontram na forma cristalina. Desse modo, a cadeia se apresenta como uma estrutura relativamente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa e permitindo que sejam formulados como sistemas de liberação de drogas (JAIN *et al.*, 1998). Essa característica é, também, um fator determinante da velocidade de degradação dos polímeros já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, o polímero que apresenta maior Tg, geralmente se degrada mais lentamente.

Além de serem biodegradáveis, os produtos do metabolismo do PLA e do PLGA são naturais e são, portanto, eliminados pelo ciclo de Krebs. A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão, por meio de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando o ácido lático e o glicólico (**Figura 5**). Esses ácidos são eliminados na forma de gás carbônico e água através do ciclo de Krebs.

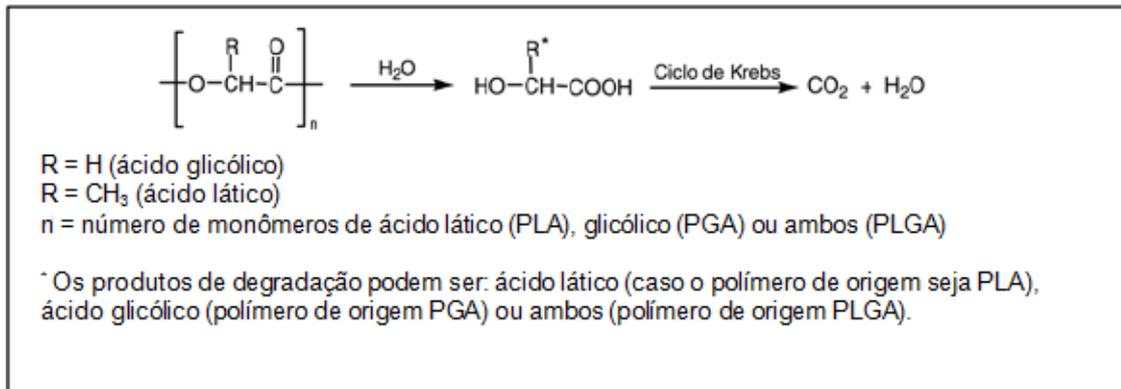


Figura 5 - Mecanismo de hidrólise de PLA, PGA ou PLGA (Fonte: FIALHO *et al.*, 2003).

Os implantes intraoculares obtidos com os polímeros supracitados, podem se apresentar na forma de bastão, discos ou membranas. São três, os métodos de obtenção desses sistemas; a moldagem, a extrusão e a preparação de filmes. No método de moldagem, a mistura de pós (contendo o polímero e o fármaco) é colocada em um molde desenvolvido na forma do implante e podem ser utilizados, durante o preparo, aquecimento e pressão. Já no método da extrusão, a mistura de pós é propulsionada continuamente pelo equipamento, passando por regiões de alta temperatura e pressão, onde ela é fundida e compactada na forma final do implante. A preparação de filmes pode ser realizada por meio de fusão e pressão da mistura de pós ou por adição da solução. O método de adição da solução é o mais utilizado, e, nele, os componentes são dissolvidos em um solvente apropriado formando uma solução que é, então, lançada sobre uma superfície lisa e não-adesiva. O solvente se evapora, e o filme formado é retirado da superfície (FIALHO *et al.*, 2003).

Os implantes intraoculares biodegradáveis podem ser aplicados no tratamento de diversas condições patológicas: retinite por CMV, uveítes e vitreoretinopatia proliferativa.

Para o tratamento de edema macular secundário à uveítes e a outras condições patológicas, já é utilizado na prática clínica um implante com matriz de PLGA contendo dexametasona, conhecido como OsurdexTM (Allergan, Inc, Irvine, CA). No estudo clínico de fase II desse dispositivo, os pacientes foram divididos em três grupos que receberam diferentes tratamentos: um grupo recebeu o implante

contendo 350 µg de dexametasona, outro recebeu o mesmo implante contendo 700 µg do fármaco e um grupo controle que não recebeu tratamento. Todos os pacientes (306) possuíam edema macular originados a partir de diferentes condições: edema macular diabético (54,3%), oclusão da veia da retina (32,7%), uveíte (4,4%) e síndrome de Irvine-Gass em 8,6%. Os resultados desse estudo demonstrou melhorias na acuidade visual e na espessura da retina em pacientes tratados com o medicamento (KUPPERMANN *et al.*, 2007).

Ainda com o objetivo de tratar a uveíte, implantes contendo o agente imunossupressor CsA, têm sido estudados. Dong *et al.* 2006, desenvolveu e avaliou um implante constituído do polímero PGLC (do inglês - *glycolide-co-lactide-co-caprolactone polymer*) e CsA (2,0 mg). Os níveis terapêuticos de CsA no humor vítreo foram mantidos por mais de quatorze semanas após a implantação intravítrea e os efeitos anti-inflamatórios foram observados nos olhos tratados com os implantes. Foi observada também, uma redução de toxicidade sistêmica nos coelhos que receberam o dispositivo, comparada aos animais que receberam o tratamento sistêmico com a CsA. Saliba (2007), também desenvolveu e caracterizou implantes contendo CsA obtendo resultados promissores para o tratamento da uveíte posterior.

Outro implante intraocular biodegradável constituído de uma combinação de fármacos (5-FU/5-fluorouridina, TA/triancinolona acetona e o t-PA/ do inglês - *tissue plasminogen activator*) dispersos em uma matriz polimérica de PLGA, foi desenvolvido para o tratamento da vitreoretinopatia proliferativa. Com 7 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro, consistia em três segmentos cilíndricos, cada um contendo um dos fármacos. A TA e a 5-FU foram liberadas ao longo de quatro semanas e o t-PA por um período de duas semanas. Este tipo de sistema demonstra o benefício de permitir a liberação de mais de um princípio ativo a partir de um único implante (HSU, 2007).

3 UVEÍTE

De acordo com o IUSG (do inglês- *International Uveitis Study Group*) (2012), a uveíte consiste de um grupo de doenças caracterizadas por inflamação intraocular que ameaçam a visão e que acometem primariamente o trato uveal (íris, corpo ciliar e coróide), embora possa ocorrer inflamação dos tecidos adjacentes (retina, nervo óptico e humor vítreo).

Pouco se conhece sobre o processo fisiopatológico da uveíte, entretanto quando nenhuma relação com agentes infecciosos pode ser identificada, a autoimunidade tem sido apontada como causa desta doença. Muitos casos são considerados idiopáticos enquanto outros fazem parte do processo de alguma outra doença sistêmica. Entre as condições sistêmicas que podem estar associadas à uveíte está a sarcoidose, a esclerose múltipla e a doença de Behçet. Agentes infecciosos, tais como o vírus do Herpes, o *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Treponema pallidum* também são causas reconhecidas da uveíte (CASPI, 2010; IUSG, 2012).

Ainda de acordo com o IUSG (2012), a uveíte ocorre principalmente na faixa etária entre 20-50 anos, e pode afetar um ou ambos os olhos. A maioria dos pacientes apresentam uveíte em fase profissional ativa, o que justifica o importante impacto socioeconômico decorrente desta doença. Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo anual para o tratamento desta condição patológica pode chegar a 242,6 milhões de dólares (HESSELLINK *et al.*, 2004; IUSG, 2012).

A uveíte pode ser classificada, anatomicamente, em uveíte anterior, intermediária, posterior ou panuveíte quando mais de um compartimento anatômico estiver envolvido. A uveíte anterior acomete a câmara anterior do olho e geralmente é de causa idiopática, mas pode estar associada com doenças sistêmicas como a artrite reumatoide, a doença de Behçet, as espondiloartropatias e a síndrome de Blau que inicialmente se manifesta como uveíte anterior não-granulomatosa. Já a uveíte intermediária acomete o vítreo e está associada com graus variáveis de edema

macular e também é, frequentemente, de origem idiopática. A uveíte posterior afeta a retina e a coróide e pode estar associada com doenças sistêmicas, doenças infecciosas ou pode ocorrer em associação com outras síndromes oculares como a coriorretinopatia (COMMODARO *et al.*, 2011).

Outra classificação das uveítes é a anatomopatológica, que auxilia no seu diagnóstico. De acordo com esta classificação, a uveíte pode ser granulomatosa e não-granulomatosa. A uveíte granulomatosa é caracterizada pela tendência a formação de nódulos na íris e precipitados ceráticos (acúmulo de células na face posterior da córnea), já a uveíte não-granulomatosa tem pequena ou nenhuma tendência à formação de nódulos e precipitados ceráticos (DIMANTAS *et al.*, 2003).

De acordo com o seu curso clínico, as uveítes podem ainda ser classificadas como agudas ou crônicas. As uveítes cuja inflamação permanece por semanas ou poucos meses, e que terminada a crise esta inflamação desaparece, são chamadas uveítes agudas. Nas uveítes crônicas a inflamação dura meses ou anos, sem seu desaparecimento completo entre os períodos de exacerbação (DIMANTAS *et al.*, 2003).

3.1 Aspectos fisiopatológicos

A etiologia e patogênese da uveíte não estão totalmente esclarecidas. De acordo com Caspi (2010), uma deficiência na tolerância central ou periférica, leva indivíduos saudáveis a reconhecerem, através de células T específicas, o antígeno retinal. Após esse reconhecimento essas células podem se tornar ativas e efectoras. O número dessas células T e a afinidade de seu TCR (do inglês - *T cell receptor*) para o antígeno retinal são determinados pela efetividade da eliminação de células auto-reativas, processo este que ocorre no timo e que pode predispor à uveíte.

Há vários modelos experimentais que auxiliam na compreensão de todo o processo patológico e no desenvolvimento de novas terapias. Entre os modelos experimentais

de uveíte estão o EAU (do inglês - *Experimental Autoimmune Uveitis*), EIU (do inglês - *Experimental Inflammatory Uveitis*), LIU (do inglês - *Lens-Induced Uveitis*) e o EAAU (do inglês - *Experimental Autoimmune Anterior Uveitis*). Embora nenhum modelo reproduza totalmente o amplo espectro da uveíte em humanos, o modelo EAU compartilha muitas de suas características e mecanismos com a uveíte humana (SRIVASTAVA *et al.*, 2010; CASPI, 2010; COMMODARO *et al.*, 2011).

A inflamação ocular no modelo EAU é induzida pela imunização com antígenos retiniais como: o Ag-S (antígeno S), conhecido como arrestina e utilizado principalmente em ratos. Além da arrestina, existem outros antígenos retiniais que podem ser utilizados para indução de uveíte experimental. Entre eles se encontram a recoverina que é uma proteína ligante de cálcio também utilizada para modelos em ratos; a rodopsina uma proteína de membrana de células fotorreceptoras da retina (os bastonetes) e o IRBP (do inglês - *interphotoreceptor retinoid-binding protein*) utilizados também em ratos (COMMODARO *et al.*, 2011).

Após o processo de imunização ocorrem ativação e proliferação de linfócitos, iniciando uma adesão focal dessas células em vênulas pós-capilares da retina, seguidas por um aumento na expressão de moléculas de adesão, o que leva ao recrutamento de células para o olho, um passo fundamental para o desenvolvimento da doença. A intensa migração de células leva ao aparecimento de danos estruturais na retina (COMMODARO *et al.*, 2011),

Muitos tipos de células, estão associados com o desenvolvimento de uveíte auto-imune e, recentemente, foi demonstrado que células Treg (T reguladoras) CD4+ CD8+ desempenham uma papel importante na auto-imunidade ocular. (CASPI *et al.*, 1988; GRAJEWSKI *et al.*, 2006; KEINO *et al.*, 2007; CASPI, 2010).

O mecanismo de ação das células Treg citadas anteriormente não é bem compreendido, mas sabe-se que envolve o contato célula-célula e em algumas situações, citocinas imunorreguladoras como a IL-10 e o TGF- β (CASPI, 2010). Sakaguchi & Sakaguchi (2005), afirmam que as células Treg surgem de células T maduras cujos TCR's possuem uma afinidade por antígeno próprio que é

relativamente alta, mas não o suficiente pra desencadear sua deleção. As células Treg depois de ativadas podem suprimir células T ativadas de várias especificidades.

As células T capazes de reconhecer antígenos da retina são ativadas na periferia por estímulos microbianos, aqueles que são estruturalmente semelhantes aos antígenos da retina e apresentados pelas APC's (do inglês - *antigen-presenting cells*) periféricas. Após ativação, as células T, como já dito anteriormente, adquirem funções efetoras. As APC's dentro da retina, ainda não foram identificadas, embora existam outras células, como as dendríticas, que poderiam atuar como APC's neste local. Após ativação periférica e migração para os tecidos oculares, as células T impulsionam o processo inflamatório pela secreção de citocinas e quimiocinas, ativando a vascularização da retina e promovendo recrutamento de leucócitos da circulação. São estes leucócitos recrutados, os neutrófilos, monócitos e células T policlonais inespecíficas, que fornecem mediadores finais para o dano tecidual (CASPI, 2010).

Enquanto os mecanismos naturais de regulação definem o limite de susceptibilidade à doença (GRAJEWSKI *et al.*, 2006), a resolução da mesma depende de mecanismos de regulação induzidos. Está bem estabelecido que as células T expostas aos antígenos na presença de TGF- β adquirem uma função de regulação que lhes permite suprimir a função efetora de outras células T (HORWITZ *et al.*, 2008).

3.2 Tratamento

O tratamento da uveíte depende da etiologia e da localização anatômica da inflamação. Os objetivos do tratamento são: a prevenção das complicações da visão, a redução do desconforto, diminuição da intensidade da resposta inflamatória preservando o sistema imune do paciente e se possível, a remoção da causa primária (SMET *et al.*, 2011).

Os grupos de fármacos utilizados no tratamento das uveítes são os midriáticos e cicloplégicos, os imunossupressores de primeira linha (antiinflamatórios não-esteróides e esteroidais), os imunossupressores de segunda linha de tratamento (Não-citotóxicos: ciclosporina, tacrolimus, azatioprina, micofenolato e metotrexato. Citotóxicos: clorambucil e ciclofosfamida) e os antivirais (SMET *et al.*, 2011).

Os corticosteróides são os fármacos de primeira escolha para o tratamento das uveítes. São utilizados na forma tópica, periocular ou sistêmica. No entanto, como as uveítes são doenças crônicas existem casos severos nos quais o corticosteróide não é capaz de controlar o processo inflamatório e nos quais surgem efeitos colaterais devido ao tratamento prolongado e às doses elevadas (CHOUDHARY *et al.*, 2006). Nessas situações, é necessária a co-administração sistêmica de imunossupressores de segunda linha, os inibidores de células T.

Os imunossupressores de segunda linha, escolhidos para a co-administração com os corticosteróides são a CsA, o FK506 e o micofenolato. A associação imunossupressores de primeira e segunda linha leva à remissão da doença e dos efeitos adversos associados à terapia a longo prazo e com altas doses de corticosteróides (HOGAN *et al.*, 2007).

Mais recentemente, a eficácia dos agentes biológicos, como os fármacos anti-TNF- α (infliximabe, etanercept e o adalimumabe) têm sido demonstrada por vários estudos. Estes estudos indicam que tais agentes possam ser muito úteis em pacientes refratários, ou seja, resistentes à terapia convencional, entretanto eles podem levar à graves efeitos colaterais. Dentre eles pode-se citar a susceptibilidade à tuberculose e ao desenvolvimento de doença desmielinizante, susceptibilidade esta, decorrente da imunossupressão (HALE & LIGHTMAN, 2006; IMRIE & DICK, 2007; LOPEZ-GONZALEZ *et al.*, 2009; SUHLER *et al.*, 2009; OKADA, 2010).

Os mecanismos de ação dos agentes biológicos são incertos, mas sugere-se que envolva a supra-regulação das células Treg e a resposta imune sistêmica, o que

explica porque o infliximabe intraocular não tem sido uma abordagem terapêutica de sucesso (PULIDO *et al.*, 2010).

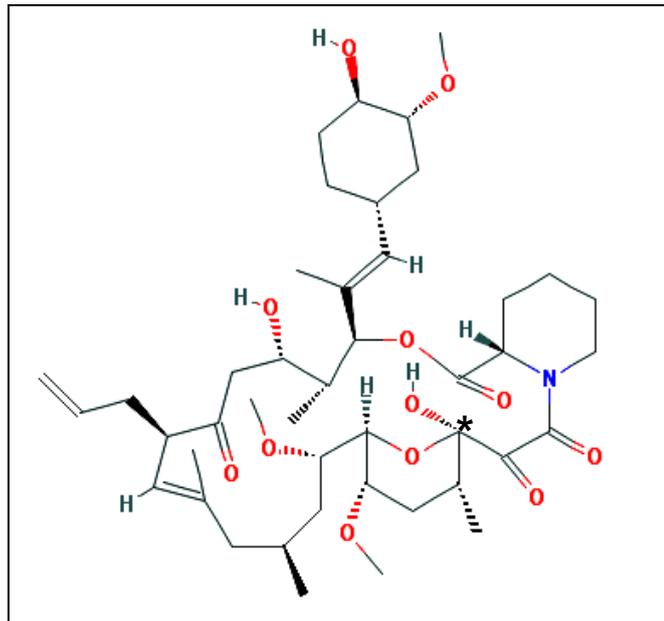
Ainda com ênfase nos agentes biológicos, o INF- α (interferon alfa) apresentou capacidade de induzir a remissão da uveíte em pacientes com doença de Behçet e da uveíte refratária aos outros tratamentos (imunossuppressores de primeira e segunda linha) (DEUTER *et al.*, 2009; SOBACI *et al.*, 2010; PAIRE *et al.*, 2010). O mecanismo de ação deste agente parece ser a indução de células Treg, efeito prolongado e que permanece após a interrupção do tratamento. Entretanto o INF- α pode ter efeitos colaterais significativos e pode induzir retinopatia e neurite óptica (SCHULMAN *et al.*, 2003; KOTTER *et al.*, 2010).

Outro agente biológico de interesse no tratamento das uveítes é o rituximabe, um anticorpo monoclonal anti-CD20. Assim como o INF- α , seus efeitos se estendem após o término do tratamento. O rituximabe é efetivo em doenças geralmente mediadas por células T, o que sugere que seu mecanismo de ação seja a inibição da interação células B-células T. O seu perfil de efeitos colaterais, comparado àquele dos outros agentes biológico, é considerado bom (TAPPEINER *et al.*, 2007; TAYLOR *et al.*, 2009; DAVATCHI *et al.*, 2010; HEILIGENHAUS *et al.*, 2011).

4 TACROLIMUS/FK506

4.1 Propriedades físico-químicas do FK506

Quimicamente, o FK506 é uma lactona macrolídea. Sua estrutura química é incomum, pois contém um hemicetal mascarado (uma α,β -dicetoamida) incorporado a um anel de 23 membros (**Figura 6**). Sua fórmula e massa molecular são $C_{44}H_{69}NO_{12}H_2O$ e 822,05 g/mol, respectivamente. O FK-506 geralmente se apresenta na sua forma monohidratada o que justifica a molécula de água apresentada na sua fórmula (KINO *et al.*, 1987; TANAKA *et al.*, 1987).



**FIGURA 6 - Estrutura do FK506. Fonte: Adaptado de Wallemacq & Reding, 1993.
Legenda - * Carbono do hemicetal**

O FK506 é uma molécula neutra e hidrofóbica. É pouco solúvel em água, foi encontrado na literatura duas faixas de solubilidade para o FK506, 1-2 $\mu\text{g/mL}$ e 4-12 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, é muito solúvel em metanol, clorofórmio, acetato de etila, éter e acetona (KINO *et al.*, 1987; TAMURA *et al.*, 2001).

De acordo com a classificação biofarmacêutica, o FK506 se encontra na classe II (alta permeabilidade e baixa solubilidade), apresentando problemas de solubilidade em meio aquoso e também nos veículos e excipientes utilizados no desenvolvimento de diversas formulações. O valor do seu coeficiente de partição ($\log P$) é de aproximadamente 3,5 (TAMURA *et al.*, 2001).

O ponto de fusão se encontra na faixa entre 127-130°C. No estado sólido o FK506 é estável por pelo menos seis meses em temperaturas entre 24°- 40°C. Em solução metanólica, o fármaco possui estabilidade por quatro semanas a -20°C, por duas semanas a 5°C e aproximadamente por uma semana à 24°C (VENKATARAMANAN *et al.*, 1987).

Sua estrutura química foi elucidada por Tanaka *et al.* (1987), com o auxílio de varias técnicas: espectroscopia de massa, ressonância magnética nuclear, análises de raios-X, ozonólise e hidrólises ácida e alcalina.

O seu espectro de infravermelho com transformada de fourrier (FTIR) indica a presença de grupos hidroxila, carbonila e grupo amida (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Números de onda (cm^{-1}) do espectro de infravermelho (IV) do FK506. Fonte: Adaptação de Yamashita *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2010.

Atribuições	Número de onda (cm^{-1})
Estiramento OH	3450
Estiramento C=O de éster e cetona	1740, 1725 e 1693
Estiramento C=O de cetoamida e estiramento C=C	1637
Estiramento C-O de éster	1194
Estiramento C-O-C	1176 e 1094
Estiramento C-H de alcanos	2800

Em relação a propriedades estruturais, o FK506 exhibe características diferenciadas de muitos outros compostos. Nele, ocorrem dois tipos de heterogeneidade conformacional e que foram documentadas através de estudos de ressonância magnética nuclear. Primeiramente, foi observada uma isomerização cis-trans (**Figura 7**) envolvendo a ligação amida e sua restrição rotacional. Este tipo de isomerização é observado para o FK506 quando as análises de cromatografia líquida de alta eficiência são executadas utilizando colunas à baixas temperaturas. No estado sólido o FK-506 predomina na sua conformação cis (NAMIKI *et al.*, 1993).

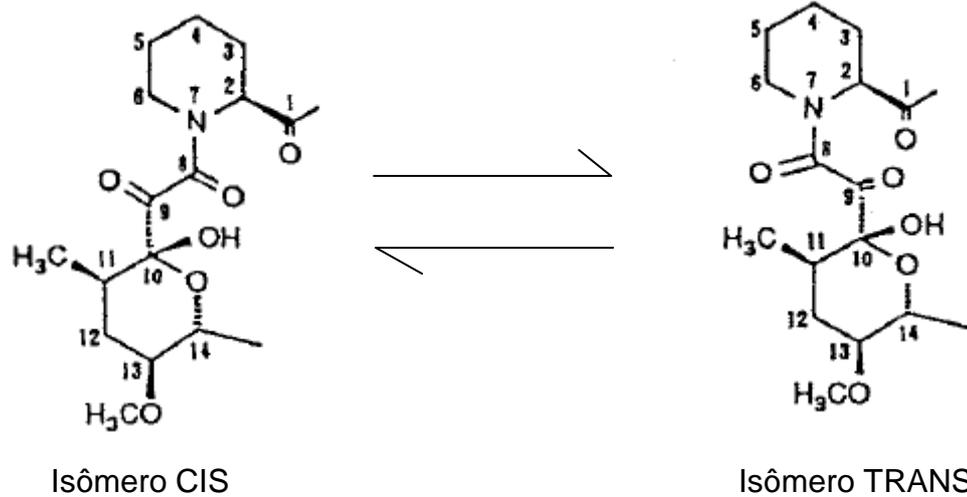


FIGURA 7 - Representação esquemática da isomerização cis-trans do FK506. Fonte: Adaptado de NAMIKI *et al.*, 1993.

A segunda heterogeneidade conformacional documentada por Mierke *et al.* (1991) e Namiki *et al.* (1993), para o FK506 é que em solução aquosa ele epimeriza para o tautômero I (cis) que é convertido no tautômero II (cis-trans) alcançando um equilíbrio que contém as três formas (**Figura 8**).

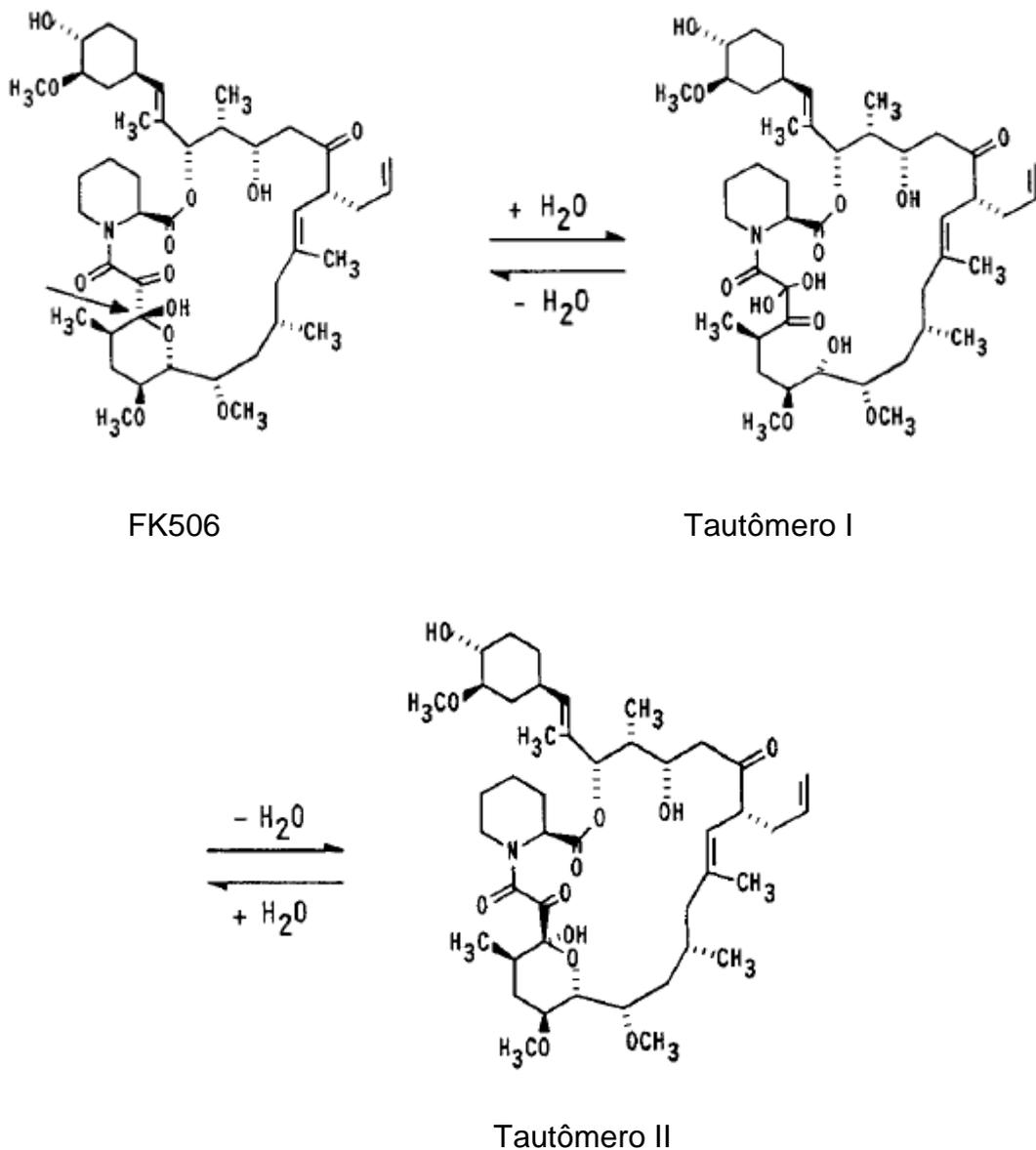


FIGURA 8 - Estrutura do FK506, Tautômero I e Tautômero II. A seta na estrutura do FK506 indica o centro de epimerização. Fonte: Adaptado de NAMIKI *et al.*, 1993.

A atividade imunossupressora do FK506 não é afetada por sua heterogeneidade conformacional e está associada com a conversão cis-trans, que *in vivo*, ocorre através da ligação do fármaco à sua proteína ligante no interior do linfócito T, a FKBP ou imunofilina (ROSEN *et al.*, 1990; VAN DUYNE *et al.*, 1991).

4.2 Mecanismo de ação

O FK506 é um imunossupressor isolado e purificado dos metabólitos do fungo *Streptomyces tsukubaensis* e freqüentemente usado em transplantes de órgãos. Ele é capaz de modular a atividade de células T CD4+ pela inibição da produção de IL-2. O mecanismo envolvendo as células T CD4+ e a produção de IL-2 está presente no processo fisiopatológico da uveíte o que justifica a eficácia do FK506 no tratamento desta condição patológica (MURPHY *et al.*, 2005).

O FK506 apresenta um mecanismo de ação semelhante ao da CsA, entretanto é mais potente e capaz de causar efeitos adversos significativamente menores (HOGAN *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2011). Molecularmente (**Figura 9**), o FK506, se liga a uma classe de proteínas ligantes denominadas FKBP's (do inglês - *FK506-binding proteins*) ou imunofilinas. A proteína FKBP predominante no linfócito é uma proteína citosólica de aproximadamente 12 KDa, a FKBP-12. O FK506 forma um complexo com sua proteína ligante, Ca²⁺/Calmodulina e calcineurina. O complexo formado inibe a calcineurina e ela não é mais capaz de desfosforilar o NFAT (do inglês - *Nuclear factor of activated T cells*) de células T, um fator de transcrição que ativa o gene da IL-2 e de outras citocinas inflamatórias. Assim, não havendo ativação do NFAT, não ocorre produção de IL-2 e, conseqüentemente, a ativação da célula T (SHAW *et al.*, 1995; ZHAI *et al.*, 2011).

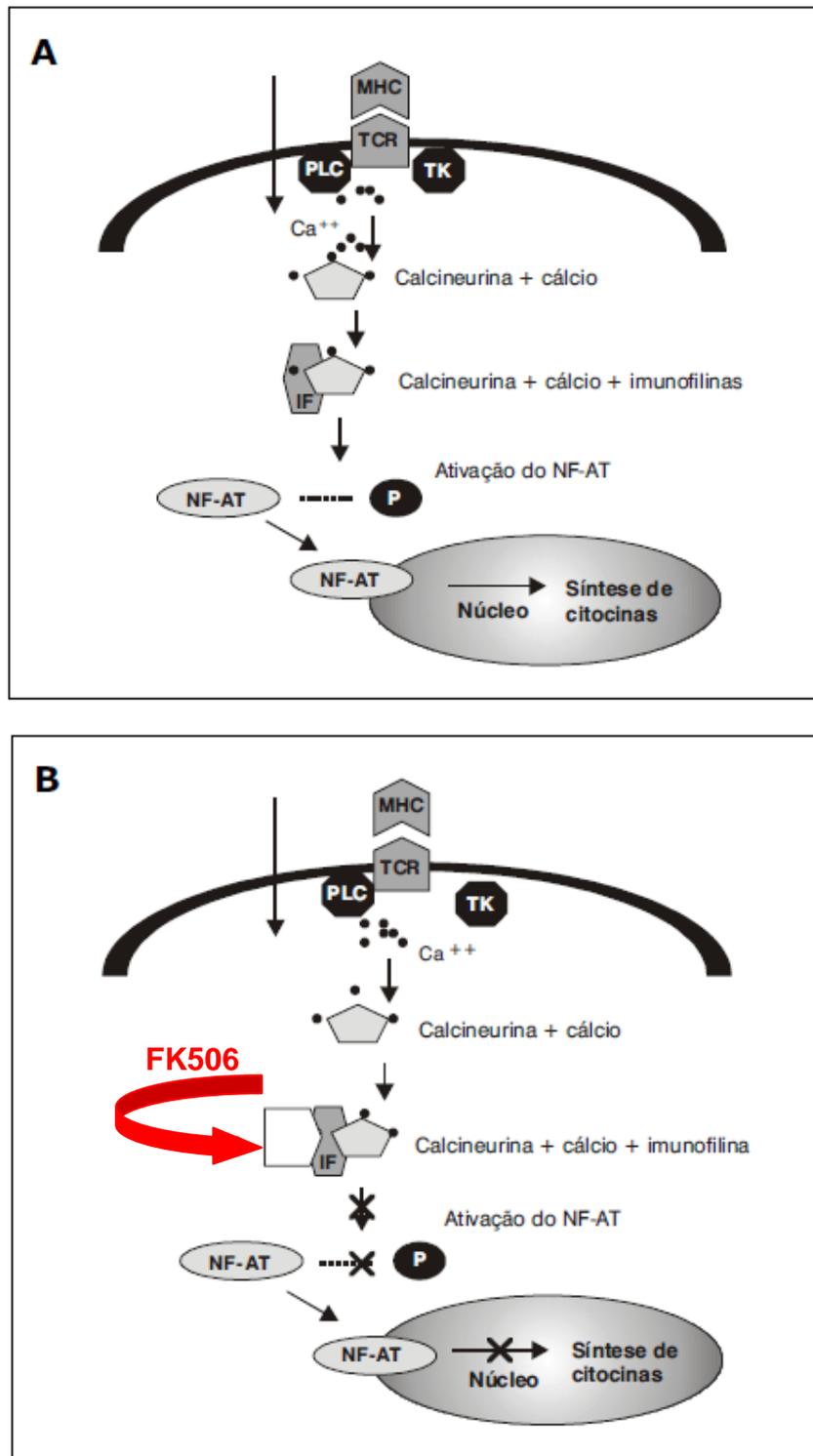


FIGURA 9 - Papel da calcineurina na célula T (A) e mecanismo de ação do FK506 (B). Fonte: Adaptação de Castro, 2006.

Em 1989, Kobayashi *et al.*, reportaram pela primeira vez que o FK506 suprimia a rejeição de córnea em coelhos transplantados. Desde então, o uso deste fármaco tem sido de especial interesse em oftalmologia.

Alguns estudos (**Tabela 2**) têm demonstrado as vantagens da utilização do FK506 (associado ou não aos corticosteróides) no tratamento de uveítes e outras doenças oculares, que possuem uma base imunológica.

TABELA 2 - Principais estudos do FK506 em oftalmologia. Fonte: Zhai *et al.*, (2011).

Doença	Possíveis Mecanismos	Dados Pré-clínicos	Dados Clínicos
<i>Rejeição de transplante de Córnea</i>	Redução de citocinas pro inflamatórias; Redução de linfócitos T ativados; Redução de marcadores de apoptose.	Okada <i>et al.</i> , 1996; Hikita <i>et al.</i> , 1997; Fei <i>et al.</i> ; 2008.	Sloper <i>et al.</i> , 2001; Joseph <i>et al.</i> , 2007; Dhaliwal <i>et al.</i> , 2008; Liang <i>et al.</i> , 2009.
<i>Doenças inflamatórias conjuntivais e da córnea</i>	Redução de citocinas pro inflamatórias; Redução de linfócitos T ativados.	-	Vichyanond <i>et al.</i> , 2004; Fei <i>et al.</i> , 2004;, Ohashi <i>et al.</i> , 2010; Rikkers <i>et al.</i> , 2003; Nivenius <i>et al.</i> , 2007; Zribi <i>et al.</i> , 2009; Virtanen <i>et al.</i> , 2006; Attas-Fox <i>et al.</i> , 2008; Xie <i>et al.</i> , 2006.
<i>Uveítes</i>	Efeito neuroprotetor; Supra-regulação de moléculas relacionadas à neuroproteção; Redução da expressão de genes relacionados às respostas inflamatórias.	Sakurai <i>et al.</i> , Oh-I <i>et al.</i> , 2007a; Oh-I <i>et al.</i> , 2007b.	Fujino <i>et al.</i> , 1991; Mochizuki <i>et al.</i> , 1992; Mochizuki <i>et al.</i> , 1993; Ishioka <i>et al.</i> , 1994;, Hogan <i>et al.</i> , 2007.
<i>GVHD (Doença do enxerto - - versus-hospedeiro)</i>	Desconhecidos	-	Tichelli <i>et al.</i> , 1996; Kerty <i>et al.</i> , 1999; Ogawa <i>et al.</i> , 2001; Ahmad <i>et al.</i> , 2002; Tam <i>et al.</i> , 2009.

Joseph *et al.* (2007), mostraram o benefício da administração de tacrolimus, na dose de 2,0 g por dia; em pacientes de alto risco que foram submetidos à transplante de córnea. A dose administrada foi suficiente para obter níveis plasmáticos de 1,0-12,0 mg/L e o tratamento teve a duração de 18 meses após o procedimento cirúrgico. Houve diminuição do risco de rejeição e problemas com o tecido transplantado.

Em outro estudo, realizado por Stumpf *et al.* (2006), o tratamento de pacientes acometidos por ceratoconjuntivite atópica grave com o FK506, com dose necessária para atingir níveis plasmáticos de cerca 3,0 mg /L, teve resultados favoráveis, sem efeitos colaterais.

O FK506 também se mostrou eficaz em inibir a neovascularização corneana e este efeito foi atribuído à diminuição da expressão tecidual de VEGF (TURGUT *et al.*, 2011).

Turgut *et al.* (2012), investigaram o efeito do FK506, administrado por injeções intravítreas, sobre um modelo animal de vitreoretinopatia proliferativa e nos fatores de crescimento implicados na sua patogênese. Os resultados obtidos mostraram que o grupo tratado com FK506 obteve melhora clínica significativa quando comparado com o grupo que recebeu injeções intravítreas de salina (grupo controle ou não tratado). O grupo tratado também demonstrou níveis significativamente reduzidos de TGF- β (do inglês - *transforming growth factor*), PDGF (do inglês - *platelet-derived growth factor*), e FGF (do inglês - *fibroblast growth factor*), quando comparado com o grupo não tratado.

O FK506 se mostra também eficaz no tratamento da uveíte. OH-I *et al.* (2007a), avaliaram a eficácia da injeção intravítrea de FK506 no tratamento de EAU em ratos Lewis. Foram utilizadas oftalmoscopia binocular indireta e histopatologia para avaliar a inflamação intraocular, além da medida dos níveis de mediadores inflamatórios. Os resultados mostraram que nos olhos tratados com injeção do fármaco houve redução da inflamação ocular provocada pela EAU e os mediadores inflamatórios foram consideravelmente inibidos quando comparado aos olhos que receberam

tratamento controle. Não foram observados efeitos sistêmicos da administração intravítrea de FK506.

Os efeitos da injeção intravítrea de lipossomas contendo FK506 em EAU induzida em ratos, foram avaliados por Zhang *et al.* (2010). O FK506 foi capaz de reduzir a inflamação intraocular e inibir o desenvolvimento da EAU após administração da formulação. A concentração do fármaco nos fluidos oculares foi mantida por um período de pelo menos 14 dias. Não foram verificados efeitos adversos sistêmicos e nem na função retiniana.

Outros estudos avaliaram a eficácia do FK506 administrado por via sistêmica em pacientes com uveítes, mas sua efetividade foi limitada devido à incidência de efeitos adversos que incluem nefrotoxicidade, hipertensão, hiperestesia, fraqueza muscular, insônia, tremor, fotofobia, sintomas gastrointestinais e alterações no sistema nervoso central. A incidência destes efeitos adversos foi aumentada com a terapia por período prolongado, como no caso de uveíte crônica (SAKURAI *et al.*, 2003, ZHANG *et al.*, 2010).

Além da eficácia do FK506 em todas as condições citadas anteriormente, OH-I *et al.* (2007b) mostraram ainda que o FK506, administrado por injeções intravítreas, foi capaz de modular a expressão gênica de moléculas relacionadas a fatores neurotróficos na retina de olhos de ratos com indução de EAU, o que sugere uma função de neuroproteção.

A administração do FK506, pelas vias utilizadas em vários estudos, para o tratamento da uveíte apresenta várias desvantagens. As vias de administração utilizadas deveriam disponibilizar o FK506 nas porções posteriores do bulbo do olho na dose efetiva e sem ocasionar efeitos colaterais. Mas, o fármaco, devido a sua baixa solubilidade em água e elevada massa molecular (KINO *et al.*, 1987; PLEYER *et al.*, 1993), não atravessa, de forma satisfatória, as barreiras teciduais e a barreira hematorretiniana. Além disso, a administração sistêmica do tacrolimus desencadeia uma série de efeitos indesejáveis ao organismo, fatores que, muitas vezes, são os

responsáveis pelo abandono da farmacoterapia e falha no tratamento (FIALHO *et al.*, 2003).

Visto os inconvenientes da administração do FK506, por vias convencionais, para o tratamento da uveíte crônica, justifica-se a busca de novos sistemas de liberação que possibilitem a sua disponibilização de forma efetiva e segura.

JUSTIFICATIVA

A uveíte é uma doença ocular com significativa prevalência em todo mundo e possui um impacto socioeconômico importante que é decorrente do fato de que 70-90% dos pacientes acometidos pela doença encontra-se em fase profissional ativa. Quando a uveíte atinge estruturas do segmento posterior do olho, o seu tratamento é dificultado devido à restrição do acesso do fármaco ao seu alvo. As formas farmacêuticas e vias de administração ocular de medicamentos, comumente utilizadas ou ditas convencionais (administração tópica, sistêmica e intravítrea) possuem diversas limitações. Dentre elas, destacam-se a baixa adesão do paciente ao tratamento, ocorrência de efeitos adversos e os problemas relacionados à própria administração como hemorragia vítrea, endoftalmite, descolamento da retina entre outros. Nesse contexto os implantes intraoculares ganham destaque devido às suas diversas vantagens: (1) o princípio ativo liberado pelos dispositivos ultrapassa a barreira hematorretiniana, possibilitando a liberação do fármaco em níveis terapêuticos diretamente no sítio de ação; (2) possibilita a liberação do fármaco por tempo prolongado; (3) evita os efeitos colaterais associados freqüentemente às injeções intravítreas e administração sistêmica; (4) diminui a quantidade de fármaco necessária para o tratamento. Dentre os agentes terapêuticos para o tratamento da uveíte, têm-se os imunossupressores, como o FK506, que é cerca de 10-100 vezes mais potente que a CsA. Entretanto a segurança do FK506 é questionável quando sua administração é via sistêmica e o tratamento é prolongado. Portanto o desenvolvimento de implantes intraoculares biodegradáveis contendo FK506, proposto neste trabalho, é uma alternativa promissora para o tratamento da uveíte crônica e que deve ser avaliada.

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar sistemas poliméricos de implantação intraocular, obtidos a partir do copolímero PLGA 75:25, destinados à administração intraocular de FK506 para o tratamento de uveítes crônicas.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar método analítico de CLAE para quantificação do FK506 nos implantes intraoculares;
2. Desenvolver os sistemas poliméricos à base do copolímero PLGA 75:25 contendo FK506;
3. Caracterizar os sistemas desenvolvidos por meio de técnicas de análise térmica, conformacional, morfológica e de estudo de liberação *in vitro*;
4. Avaliar o perfil de liberação *in vivo* do fármaco a partir dos sistemas obtidos.

PARTE I

Validação do método analítico de quantificação do FK506

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

1. FK506 - Iffect Chemphar Co., Ltda; Shenzhen, China.
2. Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) 75:25 [PLGA 75:25; viscosidade inerente (v.i.) = 0.50 - 0.70 dl/g] Resomer[®] RG 755 S - Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co; Ingelheim, Alemanha.
3. Acetonitrila grau CLAE - Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.
4. Metanol grau CLAE- Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.
5. Água ultrafiltrada - Milli Q plus, Millipore, EUA; Billerica, Estados Unidos.

Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

1.2 Métodos

Foi utilizado nesta etapa, o cromatógrafo líquido da Merck (Modelo *Hitachi LaChrom Elite*, Rio de Janeiro, Brasil) equipado com bomba modelo L-2130, injetor automático modelo L-2200, detector DAD (do inglês - *diode array detector*) modelo L-2450 e com o programa da *Agilent* (Modelo *EZChrom Elite*, São Paulo, Brasil). Foi utilizada coluna da ACE[®] tipo C-18, fase reversa, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro e com partículas de 5µm (Modelo ACE 5C18, Aberdeen, Escócia).

O método analítico de CLAE foi empregado para determinação do teor de fármaco restante nos implantes após os testes de liberação *in vitro* e *in vivo*.

1.2.1 Desenvolvimento do método analítico

Primeiramente, foi feito o desenvolvimento do método no qual as condições experimentais foram definidas: comprimento de onda de detecção, composição e fluxo da fase móvel, tipo de fase estacionária (coluna) e tempo de corrida. Como não existe monografia do FK506 descrita nos compêndios oficiais, o desenvolvimento foi baseado na literatura encontrada para análises do fármaco em outras formas farmacêuticas e em matrizes biológicas (WARTY *et al.*, 1993; MOYANO *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2008). Além da literatura encontrada, as propriedades físico-químicas do fármaco e do excipiente da formulação (PLGA 75:25) auxiliaram para o desenvolvimento do método analítico.

Com o objetivo de determinar o comprimento de onda adequado para a detecção do fármaco, foi realizada uma varredura do FK506 no ultravioleta, utilizando o detector DAD do cromatógrafo. O padrão de FK506 foi diluído até uma concentração final de 200,0 µg/mL, sendo a varredura programada em uma faixa entre 200 a 400 nm.

Para a seleção da fase móvel preparou-se uma solução do padrão de FK506 também na concentração de 200,0 µg/mL; a amostra foi injetada no cromatógrafo duas vezes, utilizando-se uma fase móvel diferente em cada injeção. Na primeira, utilizou-se uma mistura de metanol e água e na segunda, uma mistura de metanol e tampão fosfato 0,1% p/v pH 2,5; ambas na proporção de 80:20. A primeira fase móvel foi sugerida pelo estudo realizado por Moyano *et al.* (2006) e pela polaridade do fármaco (caráter lipofílico). Já a segunda fase móvel testada, foi sugerida devido às informações descritas na literatura sobre analitos que são ácidos fracos, como o FK506. Quando se trata deste tipo de analito, é descrito que a acidificação da fase móvel dificulta a ionização das moléculas e com isso melhora a simetria do pico (SNYDER *et al.*, 1997).

Avaliaram-se três fluxos para a fase móvel escolhida; 0,8; 1,0 e 1,2 mL/min. A solução de FK506 padrão utilizada para a determinação deste parâmetro possuía concentração de 200,0 µg/mL. De acordo com Snyder *et al.* (1997), embora um fluxo mais baixo possa permitir uma melhor separação do analito, por aumentar o número de pratos teóricos (N), ele pode levar a um sinal cromatográfico pouco simétrico. Portanto, durante o desenvolvimento do método o fluxo escolhido foi aquele que proporcionou separação adequada do analito em menor tempo.

A escolha do tipo de fase estacionária baseou-se no desenvolvimento de método feito por Moyano *et al.* (2006) e também na polaridade do analito em questão, já descrita anteriormente.

O tempo de corrida das amostras foi determinado baseando-se no tempo de retenção verificado para o analito e nas possíveis variações do método durante as análises.

Após o desenvolvimento do método, visando assegurar a confiabilidade dos resultados, ele foi validado segundo os parâmetros e critérios de aceitação preconizados pela RE 899 (BRASIL, 2003): seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e robustez. Foram também utilizados alguns critérios de aceitação da EC (*European Commission*), 2002.

1.2.2 Especificidade e seletividade

A especificidade do método foi avaliada analisando-se as seguintes amostras: solução padrão de FK506 (200µg/mL), solução do placebo fortificado a 100% do fármaco (200 µg/mL de FK506 e 1,8 µg/mL de PLGA (75:25), solução diluente (Acetonitrila:Metanol - 90:10) e a fase móvel.

As soluções contendo o FK506 e/ou o PLGA (75:25), utilizadas para avaliação deste parâmetro foram preparadas da seguinte forma:

Solução padrão de FK506

Pesou-se exatamente 5,00 mg do padrão de FK506 em papel vegetal, utilizando balança analítica. Transferiu-se quantitativamente, com auxílio de 20 mL de solução diluente (Acetonitrila:Metanol - 90:10), para um balão volumétrico calibrado de 25 mL. Posteriormente, agitou-se por 10 minutos em agitador orbital. Para facilitar ainda mais a solubilização do tacrolimus, colocou-se a solução por 10 minutos em banho de ultrassom à temperatura ambiente. Finalmente, completou-se o volume com a solução diluente e homogeneizou. A concentração final obtida foi 200 µg/mL. Para a análise no cromatógrafo, filtrou-se a solução para vial, utilizando unidade filtrante de PVDF (do inglês-*Polyvinylidene fluoride*) porosidade de 0,45 µm acoplado à seringa. Realizou-se ambiente no vial, descartando os primeiros mililitros do filtrado e injetou-se 3 réplicas no cromatógrafo.

Solução do placebo fortificado a 100% do fármaco

Foram pesados 45,00 mg do placebo (PLGA 75:25) e 5,00 mg do padrão de FK506. O restante do preparo foi executado da mesma forma daquela descrita acima para a solução padrão de FK506, obtendo uma concentração final de 200 µg/mL do fármaco e 1,8 mg/mL de placebo.

Placebo puro

Pesou-se 45,00 mg do placebo (PLGA 75:25) em papel vegetal, utilizando balança analítica. O restante do preparo foi executado da mesma forma que aquela descrita para as soluções anteriores, obtendo uma concentração final de 1,8 mg/mL.

1.2.3 Estabilidade

A estabilidade das soluções utilizadas foi avaliada segundo procedimento descrito a seguir: As amostras preparadas para o teste de seletividade foram armazenadas em temperatura ambiente por 24 horas, e reinjetadas no cromatógrafo sob as mesmas condições analíticas. Os resultados da análise do padrão de FK506 e do placebo fortificado a 100% de FK506, após 24 horas de armazenamento foram comparados aos resultados dessas mesmas amostras analisadas imediatamente após o preparo.

1.2.4 Linearidade

“A linearidade é a capacidade de um método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo específico” (BRASIL, 2003).

A preparação da curva de linearidade foi realizada a partir de outras três curvas originais, elaboradas pelas análises de amostras com 25% a 150% da concentração esperada do fármaco, ou seja, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL.

Foram preparadas três soluções estoque de FK506 na concentração de 500 µg/mL: pesaram-se exatamente 50,0 mg de FK506 e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. O volume final foi completado com a solução diluente. Por meio de subseqüentes diluições da solução estoque de FK506, obteve-se as

soluções nas concentrações teóricas para a construção da curva analítica. As diluições foram executadas conforme **Tabela 3**.

Após as diluições, todas as soluções foram filtradas em membrana 0,45 µm (Durapore, Millipore®, Billerica, Estados Unidos) e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas.

Tabela 3 – Diluições para construção das curvas analíticas para quantificação do FK506

Solução	Balão volumétrico (mL)	Alíquota (mL) da solução estoque de FK506 a 500 µg/mL	Concentração teórica final (µg/mL)
25%	50	5	50
50%	50	10	100
75%	50	15	150
100%	50	20	200
125%	50	25	250
150%	25	15	300

Após a obtenção dos valores de área, foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para a análise estatística. A análise de variância da regressão pelo método citado determina se o coeficiente angular obtido é significativo e se a reta de regressão obtida é válida (SOUZA, 2007).

Ainda de acordo com Souza (2007), para a aplicação deste teste (MMQO), os resíduos (erros) de cada determinação devem ser previamente calculados e avaliados quanto à presença de *outliers* e quanto às premissas da normalidade e homocedasticidade. O MMQO só poderá ser aplicado e seus resultados considerados reais e válidos se os resíduos forem avaliados previamente.

Os *outliers* de acordo com Souza (2007) são valores extremos que são definidos como observações de uma amostra tão separadas das demais, que sugerem que possam pertencer a uma população diferente ou serem resultados de erros de medição. Antes da análise estatística pelo MMQO estes *outliers*, se existirem, devem

ser detectados. Neste trabalho foi aplicado o Teste de Resíduos Padronizados de Jackknife com esta finalidade.

Além da ausência de *outliers* para a aplicação do MMQO, os resíduos devem seguir distribuição do tipo normal, ou seja, os resíduos devem passar pela premissa da normalidade. Para avaliar esta premissa foi aplicado o Teste de Ryan-Joiner (SOUZA, 2007).

A avaliação da regressão linear pelo MMQO assume, além das premissas já citadas anteriormente, que os resíduos calculados possuem uma variação absoluta constante, ou seja, que há homocedasticidade entre os resíduos. Existem vários testes possíveis para a avaliação desta homogeneidade das variâncias e neste trabalho foi aplicado o Teste de Levene Modificado.

Após a aplicação do MMQO e determinação do coeficiente de correlação (r), este foi avaliado segundo o critério da RE 899 (BRASIL, 2003), que afirma que ele deve de no mínimo 0,99.

1.2.5 Precisão

“A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (Brasil, 2003)”.

A precisão foi estabelecida por meio de nove determinações, ou seja, três concentrações (baixa-150 $\mu\text{g/mL}$, média-200 $\mu\text{g/mL}$ e alta-250 $\mu\text{g/mL}$), com três réplicas para cada determinação. Foi avaliada a repetitividade (precisão intracorrída ou intradia), que é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. E também a reprodutibilidade parcial (precisão intercorrídas ou interdias), que é a concordância

entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (**Tabela 4**).

As amostras submetidas à avaliação da precisão foram preparadas conforme descrito a seguir:

Amostra Placebo Fortificado a 75%, preparou-se três amostras:

Pesou-se exatamente 45,00 mg do placebo e 3,75 mg do padrão de FK506 em papel vegetal, utilizando balança analítica. Transferiu-se cuidadosamente para um balão volumétrico calibrado de 25 mL, com auxílio de 15 mL de solução diluente. Agitou-se por 10 minutos em agitador orbital e colocou posteriormente por 10 minutos em banho de ultrassom à temperatura ambiente. Aferiu-se o balão com a solução diluente e homogeneizou. A concentração final de princípio ativo nesta solução foi 150 µg/mL e 1,8 mg/mL de placebo (PLGA 75:25). Para as análises no cromatógrafo, filtrou a solução para vial, utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 µm acoplado à seringa. Antes da filtração, realizou ambiente no vial, descartando os primeiros mililitros do filtrado. E finalmente, injetou-se 3 réplicas de cada amostra.

As amostras de placebo fortificado a 100 e a 150% de tacrolimus, foram preparadas da mesma forma que a descrita acima, com exceção para quantidade pesada do fármaco em cada uma delas, que foram respectivamente 5,00 e 6,25 mg.

A precisão pode ser expressa como coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR), segundo a fórmula: $DPR = DP/CMD$, em que DP = desvio padrão e CMD = concentração média determinada (BRASIL, 2003).

Assim como recomendado por Souza (2007), os dados experimentais para avaliação estatística da precisão foram obtidos das tabelas de recuperação em cada nível de concentração, após o tratamento dos *outliers* pelo Teste de Grubbs. Em seguida foram calculados os resíduos das recuperações aparentes. Os resíduos foram posteriormente avaliados quanto às premissas da normalidade (Teste de Ryan-

Joiner) e homocedasticidade (Teste de *Levene* Modificado). Após a verificação das premissas foi feita a análise de variância por ANOVA e conseqüentemente o cálculos dos DPR's.

Tabela 4 - Representação dos procedimentos de análise da precisão

	Dia 1		Dia 2	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
Analista 1	Experimento 1	---	---	Experimento 4
Analista 2	---	Experimento 2	Experimento 3	---
Equipamentos	Balança Analítica AX205 BALEE-02A Mettler Toledo HPLC DAD LaChrom Elite Merck	Balança Analítica AX205 BALEE-02A Mettler Toledo HPLC DAD LaChrom Elite Merck	Balança Analítica AT201 BALEE-03A Mettler Toledo HPLC UV/VIS LaChrom Elite Merck	Balança Analítica AT201 BALEE-03A Mettler Toledo HPLC UV/VIS LaChrom Elite Merck

De acordo com a RE 899 (BRASIL, 2003) o DPR deve ser menor que 5,0 para qualquer faixa de concentração, intra e intercorridas.

Entretanto, de acordo com a EC (2002), o valor do DPR_R calculado (desvio padrão de reprodutibilidade parcial, precisão interdias ou ainda precisão intercorridas) deve ser menor ou igual ao DPR_R máximo aceitável de 5%. E que o valor do DPR_r calculado (desvio padrão sob condições de repetitividade, precisão intradias ou ainda precisão intracorridas) deve ser menor ou igual ao DPR_r máximo aceitável, que é determinado a partir de 2/3 do valor do DPR_R máximo aceitável, ou seja 3,3%.

Na avaliação deste parâmetro seguiu-se o critério definido pela EC (2002).

1.2.6 Exatidão

“A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia em estudo em relação ao valor verdadeiro” (Brasil, 2003). O valor verdadeiro é a concentração teórica das soluções preparadas, que neste trabalho foram: 150,0; 200,0 e 250,0 µg/mL.

A exatidão foi estabelecida pela relação entre a concentração média analisada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, determinando a porcentagem de recuperação do analito, adicionado ao placebo (PLGA 75:25). Este parâmetro foi verificado por nove determinações, ou seja, três concentrações (baixa: 150,0; média: 200,0 e alta: 250,0 µg/mL) com três réplicas para cada determinação. Os ensaios foram realizados em um mesmo dia (exatidão intradia ou intracorrida) e em dias diferentes (exatidão interdias ou intercorridas). A RE 899 (BRASIL, 2003) não especifica uma faixa de aceitação para a recuperação do analito na avaliação de exatidão do método.

As soluções utilizadas para validação deste parâmetro foram as mesmas utilizadas para a validação do parâmetro precisão.

A estimativa das concentrações das amostras fortificadas foi determinada por meio da curva de calibração. Posteriormente foi aplicado o Teste de *Grubbs* para detecção e exclusão de *outliers*. A recuperação média foi calculada para os três níveis avaliados

1.2.7 Limite de quantificação (LQ)

“O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão” (Brasil, 2003).

A fórmula utilizada para cálculo do limite de quantificação teórico foi $C_{iA} \geq C_B + 10 S_B$ (BRASIL, 2003), sendo C_{iA} = concentração correspondente ao limite de quantificação teórico; C_B = concentração média calculada para o analito nas amostras brancas e S_B = desvio padrão das concentrações calculadas para o analito nas amostras brancas.

1.2.8 Limite de detecção (LD)

“O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas” (Brasil, 2003).

A fórmula utilizada para cálculo do limite de detecção teórico foi $C_{iA} \geq C_B + 3 S_B$ (Brasil, 2003), sendo C_{iA} = concentração correspondente ao limite de detecção teórico; C_B = concentração média calculada para o analito nas amostras brancas e S_B = desvio padrão das concentrações calculadas para o analito nas amostras brancas.

1.2.9 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (Brasil, 2003).

O parâmetro robustez foi avaliado através do Teste de Yonden Steiner descrito por Souza (2007), em que são avaliadas sete variáveis (**Tabelas 5 e 6**) do método através de oito análises de cada amostra.

Tabela 5 - Variáveis avaliadas no parâmetro robustez.

	Variável	Limites inferior e superior
A	Coluna cromatográfica	a: C18 250 mm x 4,6 mm, 5µm *A: C8 250 mm x 4,6 mm, 5µm
B	Comprimento de onda de detecção	b: 208 nm B: 212 nm
C	Fluxo de corrida	c: 0,8 mL/minuto C:1,2 mL/minuto
D	Proporção da fase móvel	d: 78:22 D: 82:18 <i>Metanol (grau HPLC): Solução ácido fosfórico 0,1% (v/v) pH 2,5</i>
E	Volume de injeção	e: 15 µL E: 25 µL
F	Temperatura do forno	f: 48° C F: 52° C
G	Unidade filtrante	g: Unidade filtrante de PVDF porosidade de 0,45µm G: Unidade filtrante de celulose regenerada porosidade de 0,45µm

* Modelo: XTerra® RP8 5µm, Waters XTerra® Columns, Milford, Estados Unidos.

Tabela 6 - Combinações das variáveis avaliadas no parâmetro robustez.

Variável	Análise							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado do teor de FK506 (%)	S	t	u	v	w	x	y	z

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Desenvolvimento do método analítico

De acordo com a varredura feita pelo detector DAD do cromatógrafo, de uma solução de FK506 a 200,0 µg/mL (**Figura 10**), o comprimento de onda escolhido para a validação do método de quantificação foi 210 nm. Este valor não se trata do máximo de absorção do fármaco, mas se demonstrou o mais adequado e no qual houve maior especificidade/seletividade do método desenvolvido. No valor máximo de absorbância do FK506 o excipiente (PLGA 75:25) também absorve, mesmo que em menor intensidade.

Testou-se duas fases móveis diferentes, sendo a primeira metanol:água e a segunda, metanol:tampão fosfato 0,1% v/v pH 2,5 . Observou-se que a fase móvel acidificada melhorou a intensidade do sinal relativo ao FK506 e a simetria do pico (**Figura 11**). Sugere-se que a acidificação da fase móvel dificultou a ionização das moléculas, o que ocorre para analitos que são ácidos fracos assim como o FK506 (SNYDER *et al.*, 1997). Com a acidificação e ionização de um menor número de moléculas do fármaco, elas foram detectadas no mesmo tempo de retenção ou em tempos de retenção muito próximos, melhorando a simetria do pico.

Avaliaram-se também três fluxos de fase móvel (0,8; 1,0 e 1,2 mL/min) e verificou-se que o mais adequado para as análises foi 1,0 mL/min, pois este foi o que permitiu melhor separação do analito no menor tempo de análise.

A **Tabela 7** resume as condições definidas no desenvolvimento do método analítico, que foram posteriormente utilizadas para a validação.

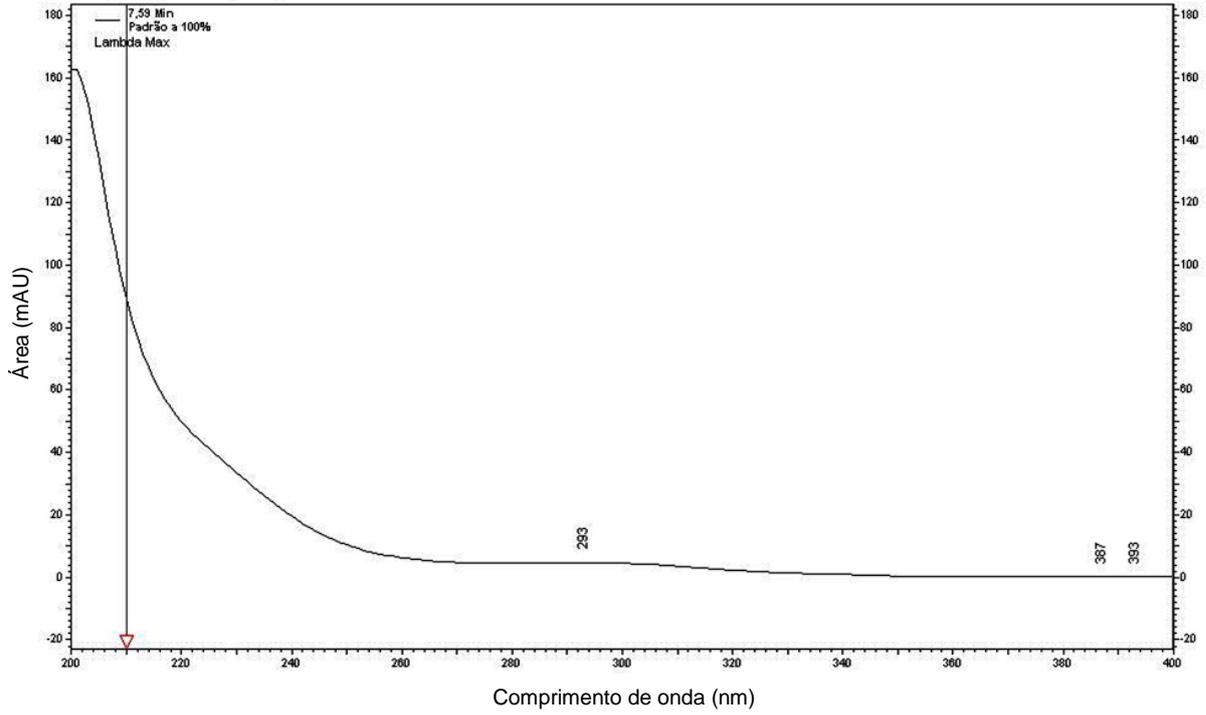


Figura 10 - Varredura feita pelo detector DAD do cromatógrafo de uma solução de FK506 a 200,0 µg/mL.

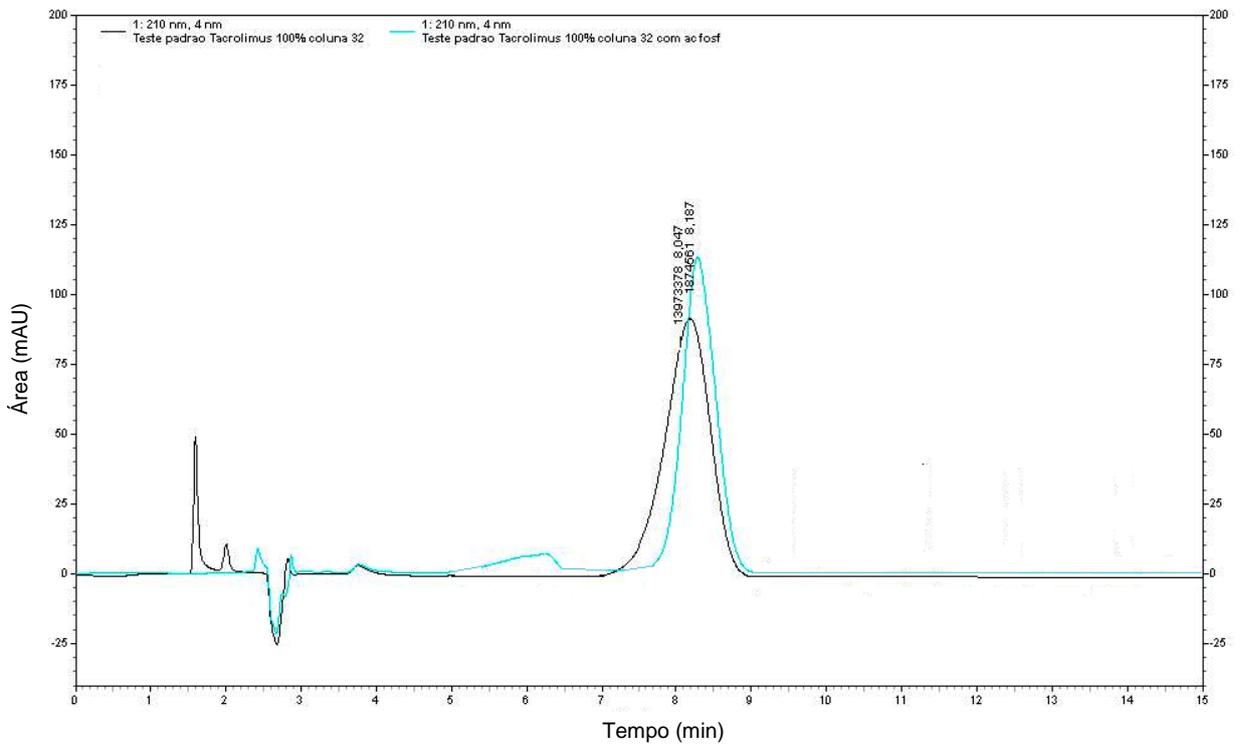


Figura 11 - Influência da acidificação da fase móvel na intensidade do sinal e simetria do pico relativo ao FK506.

Tabela 7 - Condições cromatográficas estabelecidas para a validação da metodologia analítica.

Condições	FK506
Equipamento	Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (UV/VIS com detector DAD)
Coluna	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Comprimento de onda	210 nm
Volume de Injeção	20 µL
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura da Coluna	50°C
Tempo de corrida	15 minutos
Fase móvel	Metanol (grau HPLC): Solução de ácido fosfórico 0,1% (V/V) pH 2.5 (80:20)
Solução Diluente	Acetonitrila:Metanol (90:10)

2.2 Validação do método analítico

2.2.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e seletividade do método foram avaliadas a partir das análises dos cromatogramas das seguintes soluções: do padrão de FK506, do placebo fortificado, solução diluente e fase móvel.

Ao observar a **Figura 12** pode verificar que o placebo fortificado apresentou pico com mesmo tempo de retenção, simetria e largura que o pico obtido para o padrão de FK506 levando à conclusão de que o excipiente (PLGA 75:25) da formulação do implante não interfere na seletividade do método.

A fase móvel e a solução diluente também não interferiram no método analítico (**Figura 13 e 14**).

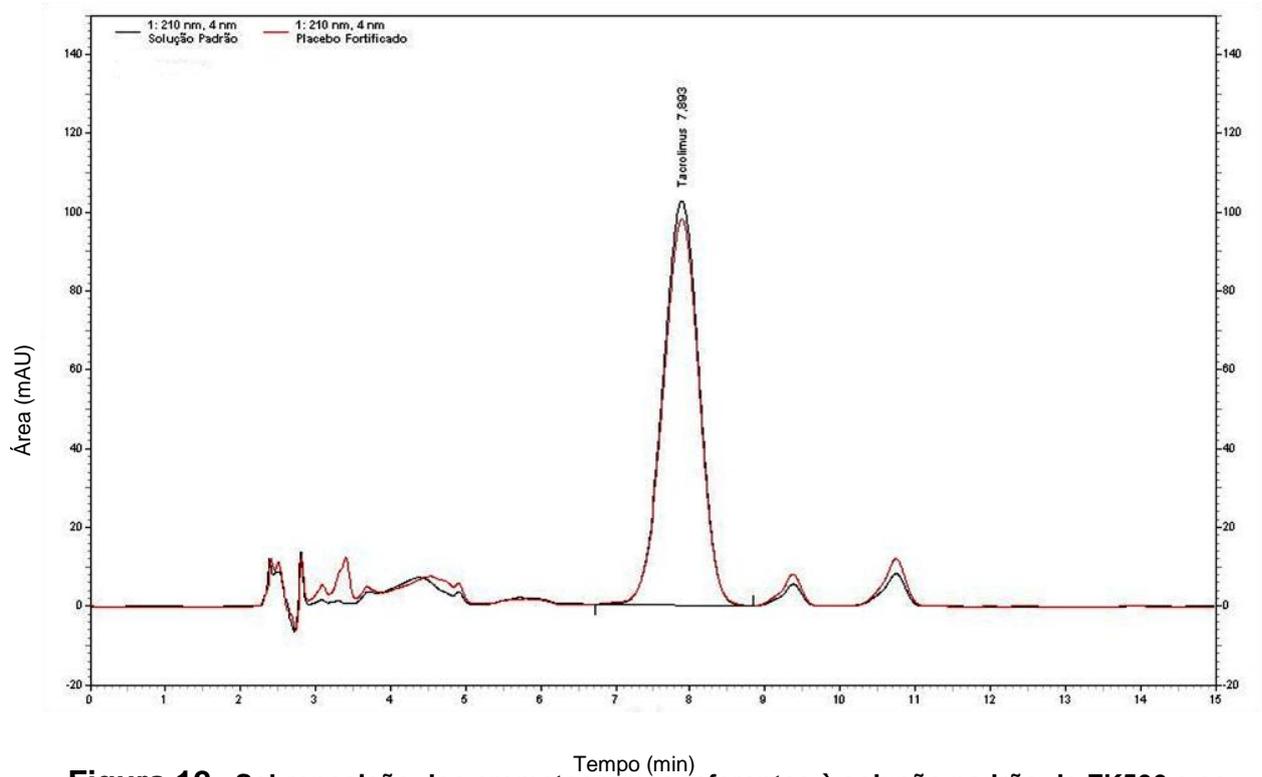


Figura 12 - Sobreposição dos cromatogramas referentes à solução padrão de FK506 e ao placebo fortificado (Preto: FK506 e vermelho: placebo fortificado).

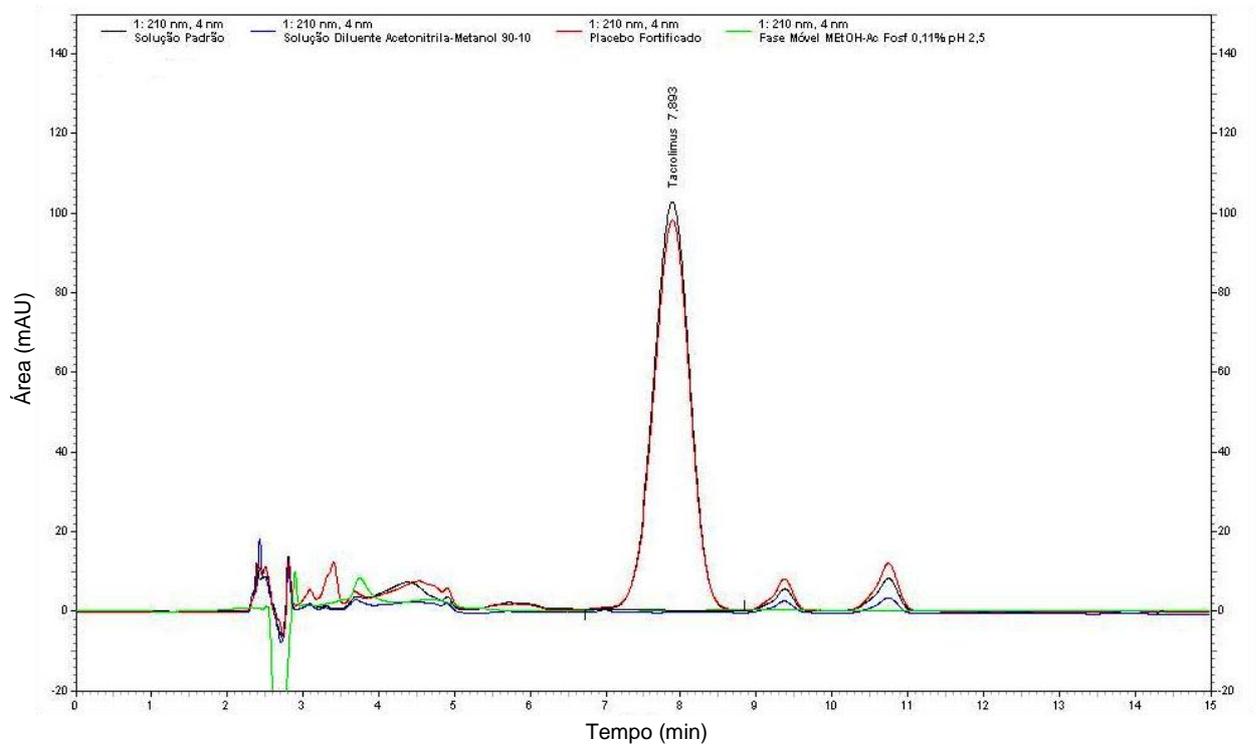


Figura 13 - Sobreposição dos cromatogramas referentes ao padrão de FK506 (preto), solução diluente (azul), fase móvel (verde) e placebo fortificado (vermelho).

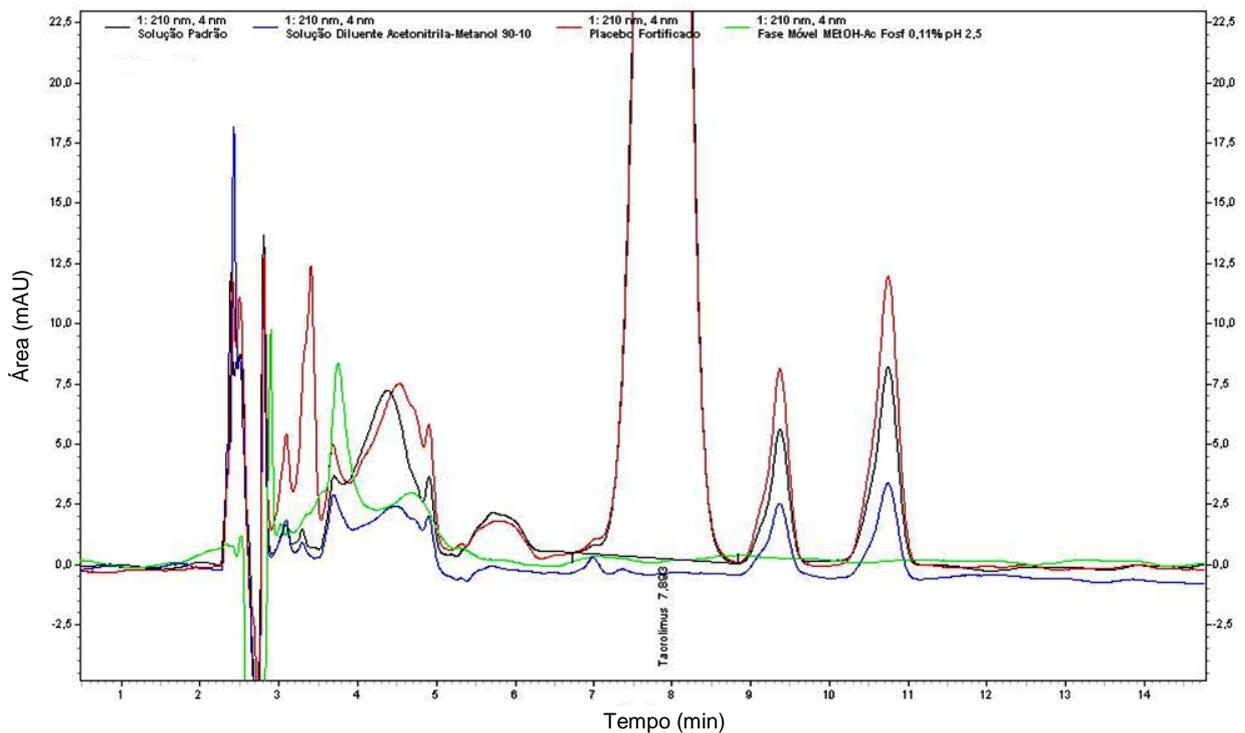


Figura 14 - Sobreposição ampliada dos cromatogramas referentes ao padrão de FK506 (preto), solução diluente (azul), fase móvel (verde) e placebo fortificado (vermelho).

2.2.2 Estabilidade

Ao observar os valores de áreas obtidos para as amostras (padrão de FK506 e placebo fortificado) imediatamente após o preparo e compará-los com aqueles obtidos depois do armazenamento por 24 horas em temperatura ambiente (**Tabela 8**), vê-se que a diferença de teor foi inferior a 2%, o que indica estabilidade das amostras avaliadas.

O resultado encontrado neste teste vai ao encontro das informações de estabilidade descritas por Venkataraman *et al.* (1987). Estes autores demonstraram que em solução metanólica o FK506 possui estabilidade por aproximadamente uma semana em temperatura ambiente.

Observa-se também (**Tabela 8**) que houve um ligeiro aumento na concentração das amostras, indicado pelo aumento das áreas após 24 horas. Supõe-se que este fato

possa ser justificado pela evaporação dos solventes constituintes da solução diluente (acetonitrila e metanol), ambos voláteis (MERCK, 2006).

Adicionalmente, na **Tabela 8**, verifica-se que o aumento na concentração foi maior para a solução do padrão de FK506 quando comparado ao da solução do placebo fortificado. Essa diferença pode ser devido a presença do polímero PLGA (75:25) na solução do placebo fortificado, o que dificultou a evaporação da solução diluente.

Tabela 8 - Dados de estabilidade das amostras padrão de trabalho e placebo fortificado.

Amostras	Áreas (mAU) da amostra logo após o preparo	Áreas (mAU) da amostra após 24 horas do preparo	Diferença de teor %
Padrão de tacrolimus	13713925,00	14063973,00	
	13894913,00	14096134,00	-1,98
	13846708,00	14118048,00	
	Média = 13818515,33	Média = 14092718,33	
	DPR = 0,69	DPR = 0,19	
Placebo Fortificado	12905786,00	13113927,00	
	13283932,00	13076550,00	-0,54
	12938402,00	13147333,00	
	Média = 13042706,67	Média = 13112603,33	
	DPR = 1,61	DPR = 0,27	

2.2.3 Linearidade

O método se mostrou linear, para o intervalo de concentração entre 50 a 300 µg/mL, conforme equação da reta $y = 58998,69117x - 24768,40000$. Esta equação foi obtida calculando-se a média dos valores de inclinação e intercepto com o eixo Y encontrado nas 3 curvas de calibração construídas. A curva média obtida está apresentada na **Figura 15**. Por meio de análise de variância (ANOVA - **Tabela 9**),

verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação encontrado para a curva média foi de 0,99817.

Para execução da análise de variância os resíduos das recuperações aparentes foram previamente calculados e avaliados. Verificou-se a inexistência de *outliers* (pelo Teste de Resíduos Padronizados de Jackknife) e que os resíduos seguiram as premissas da normalidade e homocedasticidade o que permitiu então a realização da análise de variância pelo MMQO.

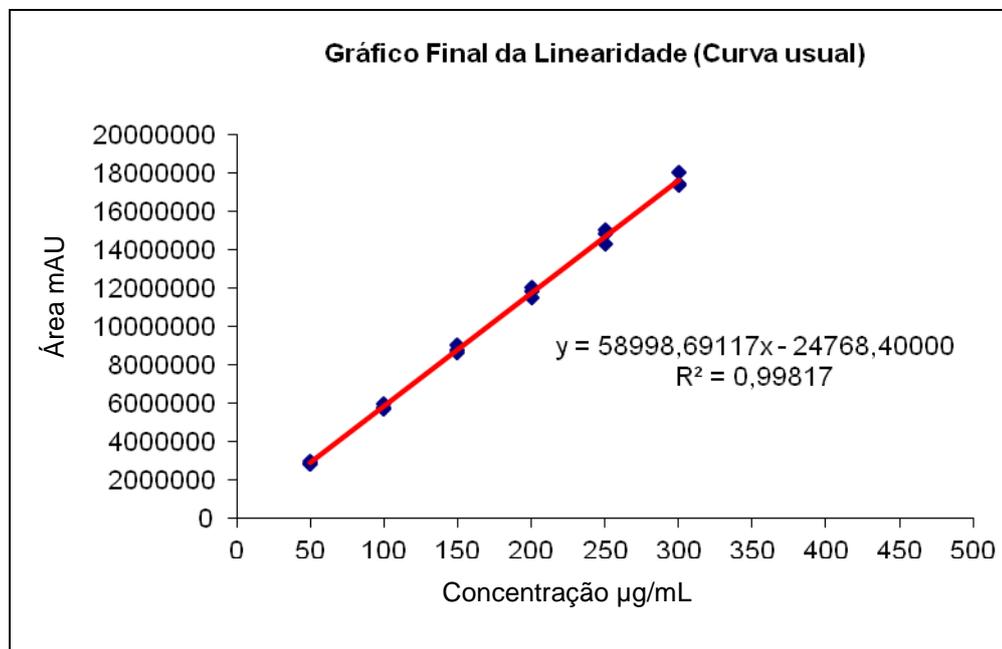


Figura 15 - Curva de calibração obtida na avaliação da linearidade

Tabela 9 - Resultados do tratamento estatístico por análise de variância para a regressão linear

FV	GL	SQ	Variância	F	p	F _c
Total	17	4,5800E+14	4,5721E+14			
Regressão	1	4,5700E+14	4,5700E+14	8707,52*	2,52E-23	4,494
Desvios de regressão	4	1,9200E+10	4,8100E+09	0,07000	9,90E-01	3,259
Erro puro	12	8,2000E+11	6,8400E+10			
Estatística de regressão e coeficientes						
R ²	0,99817					
Inclinação	58998,69117					
Intercepto	24768,40000					

*valor significativo ($\alpha=0,05$), FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, F = razão entre variâncias e F_c = F crítico.

2.2.4 Precisão

Para os três níveis de concentração avaliados (**Tabelas 10, 11 e 12**) (150, 200 e 250 µg/mL), o método foi preciso, considerando como critério de aceitação um DPR_R de 5,0 % para reprodutibilidade (precisão intercorridas ou interdias). Entretanto, considerando a repetitividade (precisão intracorrida ou intradia) com um critério de aceitação de 3,3 % (DPR_r), o método se mostrou preciso nos níveis de 150 e 250 µg/mL e não - preciso no nível de concentração de 200 µg/mL.

A ausência de precisão de acordo com a CE (2002) no nível mencionado pode ser aceitável por se tratar de determinação de teor em forma farmacêutica não convencional. E, além disso, de acordo com a especificação da RE 899 (BRASIL, 2003), que considera o DPR de 5,0 % tanto para a repetitividade quanto para a reprodutibilidade, o método é preciso nos três níveis avaliados.

Tabela 10 - Estimativa do DPR_r (repetitividade) e DPR_R (reprodutibilidade) por ANOVA - Avaliação da precisão - Nível de concentração 150,0 µg/mL

FV	GL	SQ	QM	F	p	F _c
Ensaio	3	0,012826731	0,004275577	5,662831864*	2,23E-02	4,0661806
Repetitividade	8	0,006040196	0,000755025			
Total	11	0,018866928				
Variância		Expressão		s ²	s	DPR
Repetitividade s ² _r		QM _{repetitividade}		0,00075502	0,03	2,76
Entre ensaios s ² _{EntreEnsaio}		(QM _{Ensaio} - QM _{repetitividade}) / n*		0,00117352		
Reprodutibilidade parcial s ² _R		s ² _r + s ² _{EntreEnsaio}		0,00192854	0,04	4,41

*valor significativo (α=0,05), FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio ou variância, F = razão entre variâncias e F_c = F crítico.

Tabela 11 - Estimativa do DPR_r (repetitividade) e DPR_R (reprodutibilidade) por ANOVA - Avaliação da precisão - Nível de concentração 200,0 µg/mL

FV	GL	SQ	QM	F	P	F _c
Ensaio	3	0,002790664	0,000930221	0,644823869*	6,14E-01	4,7570627
Repetitividade	6	0,008655587	0,001442598			
Total	9	0,011446251				
Variância		Expressão		s ²	s	DPR
Repetitividade s ² _r		QM _{repetitividade}		0,001442598	0,04	3,71
Entre ensaios s ² _{EntreEnsaio}		(QM _{Ensaio} - QM _{repetitividade}) / n*		0,000000000		
Reprodutibilidade parcial s ² _R		s ² _r + s ² _{EntreEnsaio}		0,001442598	0,04	3,71

*valor significativo (α=0,05), FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio ou variância, F = razão entre variâncias e F_c = F crítico.

Tabela 12 - Estimativa do DPRr (repetitividade) e DPRR (reprodutibilidade) por ANOVA - Avaliação da precisão - Nível de concentração 250,0 µg/mL

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F_c</i>	
Ensaio	3	0,011957534	0,003985845	3,782839882	5,88E-02	4,0661806	
Repetitividade	8	0,008429317	0,001053665				
Total	11	0,020386851					
Variância			Expressão		<i>s²</i>	<i>s</i>	DPR
Repetitividade s_r^2			QM _{repetitividade}		0,001053665	0,03	3,24
Entre ensaios $s_{EntreEnsaio}^2$			$(QM_{Ensaio} - QM_{repetitividade}) / n^*$		0,000977393		
Reprodutibilidade parcial s_R^2			$s_r^2 + s_{EntreEnsaio}^2$		0,002031058	0,05	4,49

*valor significativo ($\alpha=0,05$), FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio ou variância, F = razão entre variâncias e F_c = F crítico.

2.2.5 Exatidão

Para determinar a exatidão do método, calculou-se recuperação média dos três níveis de concentração avaliados (**Tabela 13**). A CE preconiza uma recuperação média entre 80-110% para concentrações ≥ 10 µg/Kg, o que ocorre na forma farmacêutica avaliada. E Souza (2007), descreve uma recuperação média de $100,0\% \pm 2$ na área farmacêutica. Portanto, de acordo com a CE (2002) e Souza (2007) o método é exato. Vale lembrar que a RE 899 (BRASIL, 2003) não especifica uma faixa aceitável para a recuperação média na avaliação do parâmetro exatidão.

Tabela 13 - Valores de recuperação aparente nos três níveis de concentração utilizados para avaliação da exatidão e valores de média, desvio padrão e variância para cada nível.

Réplicas	Níveis de concentração		
	150,0 µg/mL	200,0 µg/mL	250,0 µg/mL
	Recuperação aparente (Ri)		
1	93,94%	<i>outlier</i>	91,78%
2	94,19%	<i>outlier</i>	97,20%
3	94,96%	96,59%	97,89%
4	97,89%	99,12%	98,18%
5	98,11%	99,16%	98,26%
6	98,95%	101,08%	98,99%
7	99,59%	101,43%	101,21%
8	101,17%	103,36%	101,67%
9	101,45%	103,99%	101,88%
10	104,25%	104,77%	102,22%
11	105,40%	105,84%	106,09%
12	105,85%	108,38%	108,24%
Média	99,65%	102,37%	100,30%
S (desvio padrão)	0,041415	0,035662	0,043051
s² variância	0,001715	0,001272	0,001853

2.2.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

A seguir estão dispostos na **Tabela 14** os valores de concentração determinados para as amostras brancas (C_{iB}), no tempo de retenção do FK506. Após a determinação do valor médio de C_{iB} e do desvio padrão (S_B) para a concentração das amostras brancas, foram utilizadas fórmulas para obtenção do LQ ($C_{iA} \geq C_B + 10 s_B$) e LD ($C_{iA} \geq C_B + 3 s_B$). Sendo C_{iA} = concentração correspondente ao limite de detecção teórico; C_B = concentração média calculada para o analito nas amostras brancas e S_B = desvio padrão das concentrações calculadas para o analito nas amostras brancas. Os limites de quantificação e detecção teóricos encontrados, após os cálculos, foram de $1,516 \times 10^{-4}$ e $6,402 \times 10^{-5}$, respectivamente.

Tabela 14 - Valores de concentração encontrados para C_{iB} , no tempo de retenção do FK506.

Replicatas	Concentração (C_{iB})
1	4,62E-06
2	3,66E-05
3	1,87E-05
4	2,49E-05
5	3,71E-05
6	1,32E-05
7	4,74E-05
8	1,71E-05
9	2,29E-05
10	3,23E-05
11	4,07E-05
12	2,25E-05
N	12
C_{iB} (média)	2,650E-05
S_B (desvio padrão)	1,251E-05

2.2.7 Robustez

Como descrito na metodologia, a robustez do método foi avaliada através do Teste de Yonden Steiner, no qual são avaliadas a influência de sete variáveis no método. Através da combinação das sete variáveis propostas, originaram-se oito condições de análises diferentes. Após a realização destas oito análises para cada amostra (solução padrão de FK506 a 200,0 $\mu\text{g/mL}$ e solução do placebo fortificado a 100% do fármaco), obteve-se o teor de FK506 (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Resultados de recuperação média de cada grupo, na avaliação do parâmetro robustez.

Variável	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	B	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	D	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	F	F	F	f	f	F
G, g	G	g	G	G	g	G	G	g
Resultado do teor de FK506 (%)	s	t	U	v	w	x	y	z
	99,05	87,72	88,51	94,89	97,64	98,64	111,15	97,45

Posteriormente, com o objetivo de avaliar o impacto de cada variável no método, foram realizados cálculos adicionais, com estes, foi possível calcular o teor médio de FK506 obtido nas quatro condições de análises em que uma dada variável foi utilizada. As fórmulas a seguir foram utilizadas para o cálculo o teor médio citado anteriormente:

Variáveis **A** e **a**:

- $(s + t + u + v)/4 = 4A/4 = \mathbf{A}$
- $(w + x + y + z) /4 = 4a/4 = \mathbf{a}$

Posteriormente, utilizando uma fórmula como a apresentada a seguir, calculou-se a diferença em módulo do teor de FK506 proveniente da alteração de cada uma das variáveis. Na fórmula a seguir, mostra por exemplo a diferença entre o teor médio de FK506 proveniente das análises que utilizaram uma coluna cromatográfica do tipo C8 (variável A) e o teor médio do fármaco proveniente das análises que utilizaram uma coluna do tipo C18 (variável a). O valor obtido, ou seja, a diferença obtida; é capaz de permitir uma avaliação da interferência da coluna cromatográfica no método. Quanto maior o valor (em módulo) maior será essa interferência. Este mesmo raciocínio foi feito para a interferência das outras variáveis e os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 16**.

Variáveis **A - a**:

- $(s + t + u + v)/4 - (w + x + y + z)/4$

Tabela 16 - Interferência de cada variável no método desenvolvido e validado, para a quantificação de FK506 em implantes oftálmicos.

Variável	Resultado do teor médio de FK506 (%)	Resultado em módulo para interferência de cada variável no método
A	92,54	8,68
a	101,22	
B	95,76	2,24
b	98,00	
C	99,09	4,41
c	94,68	
D	98,84	3,92
d	94,92	
E	95,91	1,94
e	97,85	
F	97,26	0,75
f	96,51	
G	100,93	8,10
g	92,83	

Observa-se na **Tabela 16**, que as variáveis que mais interferiram no método foram: coluna cromatográfica (A e a), fluxo (C e c) e proporção da fase móvel (D e d). A partir desses resultados conclui-se que ao realizar o doseamento do FK506 em implantes intraoculares, maiores cuidados devem ser tomados em relação a estes parâmetros do método para que haja confiabilidade nos resultados de teores obtidos.

3 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido se mostrou seletivo, específico, preciso e exato, podendo-se concluir que ele é adequado para quantificação do FK506 nos implantes desenvolvidos e durante os estudos de liberação *in vitro* e *in vivo*.

PARTE II

Desenvolvimento e caracterização de implantes intraoculares contendo FK506

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

1. FK506 - Iffect Chemphar Co., Ltda; Shenzhen, China.
2. Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) 75:25 [PLGA 75:25; viscosidade inerente (v.i.) = 0.50 - 0.70 dl/g] Resomer[®] RG 755 S - Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co; Ingelheim, Alemanha.
3. Acetonitrila grau CLAE - Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.
4. Metanol grau CLAE- Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.

1.2 Métodos

Os implantes intraoculares foram produzidos a partir de uma mistura liofilizada, como descrito por Fialho *et al* (2007). A mistura apresentava-se como uma massa homogênea composta por 90% de PLGA 75:25 e 10% de FK506. Para o preparo dos implantes a partir da mistura liofilizada, primeiramente o fármaco e o polímero PLGA 75:25 foram solubilizados em quantidade suficiente da solução ACN:MetOH (90:10); aproximadamente 30,0 mg de PLGA + FK506 em cada 1,0 mL da solução diluente. A solução foi posteriormente congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 24 horas (liofilizador modelo Pirani 78/1, *Edwards* do Brasil).

De acordo com a técnica de moldagem desenvolvida por Fialho *et al.* (2007), a mistura de pós previamente obtida foi moldada na forma de bastões utilizando uma placa de Teflon[®] aquecida na temperatura entre 100 e 120°C.

Com a finalidade de avaliar a uniformidade, os implantes desenvolvidos foram pesados após a moldagem. O peso médio dos implantes intraoculares foi obtido utilizando os valores de peso de dez implantes. A média e os desvios padrões

absoluto (DP) e relativo (DPR) foram calculados. O fluxograma apresentado na **Figura 16** esquematiza as etapas do processo de obtenção dos implantes intraoculares biodegradáveis.

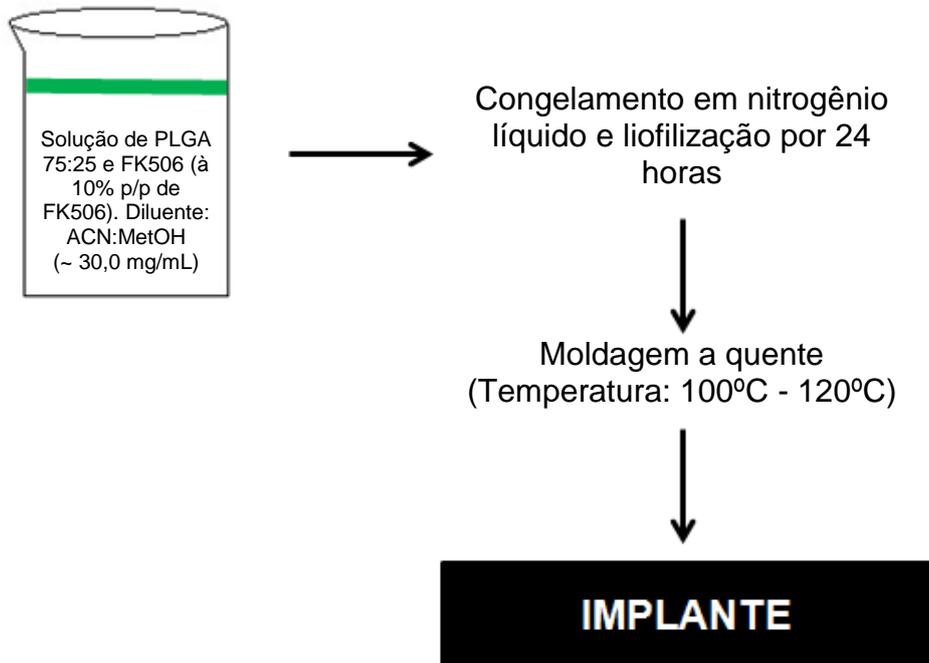


Figura 16 - Fluxograma do preparo dos implantes intraoculares.

1.2.1 Estudo da morfologia de superfície dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os implantes coletados após 1, 4 e 8 semanas de execução do teste de liberação *in vitro*, foram avaliados por MEV com o objetivo de avaliar a morfologia da superfície dos materiais, com relação à presença de poros e canais na matriz polimérica. Além das amostras coletadas do teste de liberação, outra que não foi submetida ao teste, foi também avaliada por MEV. As amostras foram metalizadas com ouro e em seguida analisadas utilizando microscópio eletrônico de varredura SSX - 550 Superscan (Shimadzu; São Paulo, Brasil) operado a 10 kV.

1.2.2 Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A DSC fundamenta-se na medição da diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Esta técnica pode ser utilizada na avaliação de pureza, compatibilidade entre os constituintes de uma formulação, identificação de polimorfismo em matérias-primas, estudo de estabilidade e decomposição de fármacos e medicamentos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Existem na literatura, vários estudos relacionados à aplicação da DSC na área farmacêutica (YOSHINARI *et al.*, 2002; ARAUJO *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2005; BANNACH *et al.*, 2009; BRUNI *et al.*, 2009). Neste trabalho, as análises de DSC foram realizadas utilizando o calorímetro DSC 822e (*Mettler Toledo GmbH, Brasil*) e foram empregadas com as seguintes finalidades:

- Avaliar a estabilidade do polímero e do FK506 na faixa de temperatura de 100-120°C, utilizada no preparo dos implantes pelo método de moldagem a quente; e
- Avaliar a possibilidade de interações entre o fármaco e o polímero.

As amostras avaliadas foram:

- FK506;
- PLGA 75:25;
- Implante contendo 10% p/p de tacrolimus; e
- Mistura física não liofilizada (Tacrolimus + PLGA 1:10).

Primeiramente foram pesadas de 2-3 mg das amostras em uma balança analítica de alta precisão modelo *SE2* (*Sartorius*, Alemanha), utilizando cadinhos de alumínio. Posteriormente as amostras foram hermeticamente seladas. Em seguida os cadinhos foram aquecidos de 25°C a 250°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

1.2.3 Análises Termogravimétricas (TGA)

De acordo Oliveira *et al.* (2011) a TGA é utilizada para medir a variação de massa de uma substância em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. Na área farmacêutica pode ser utilizada com as seguintes finalidades: determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação. Neste trabalho, esta técnica foi utilizada com o objetivo de confirmar os resultados obtidos pelas análises de DSC e auxiliar na avaliação da estabilidade das matérias-primas dos implantes intraoculares desenvolvidos.

As amostras submetidas à análise foram: PLGA 75:25, FK506, a mistura liofilizada (FK506 + PLGA) e o implante. Utilizou-se a termobalança modelo *TGA/SDTA 851e* (*Mettler Toledo GmbH, Brasil*). As amostras foram colocadas em cadinhos de alumina (Al_2O_3) e analisadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min). O aquecimento foi realizado na faixa de temperatura de 25°C-750°C, com razão de aquecimento de 10 °C por minuto.

1.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourrier

A espectroscopia no infravermelho (I.V.) é uma técnica empregada para a identificação de grupos funcionais de moléculas que são expostas a uma radiação no I.V. (1.000 a 100 cm^{-1}) (SALIBA, 2007). Para estas análises foi utilizado o espectrofotômetro modelo Spectrum One FT-IR (*Perkinelmer, Brasil*).

Esta técnica foi utilizada neste trabalho a fim de identificar as matérias-primas utilizadas e principalmente contribuir na interpretação dos resultados obtidos com as análises térmicas realizadas. Cada material possui grupos químicos específicos que dão origem a diferentes bandas no espectro, para o PLGA é encontrado grupo éster

e para o FK506, observam-se grupos hidroxilas, carbonila e amida. O não aparecimento de alguma dessas bandas no espectro do implante ou até mesmo o deslocamento ou intensificação pode ser indicativo de interações.

Para identificação das bandas características do PLGA 75:25 e do FK506, os espectros no I.V. foram obtidos a partir das amostras não liofilizadas (PLGA 75:25 e FK506).

Posteriormente, para avaliar a existência de possíveis interações entre o PLGA 75:25 e o FK506 foram obtidos espectros também do implante e de uma mistura física não liofilizada na proporção 1:10 (FK506:PLGA). Todos os espectros foram comparados com os obtidos para as matérias-primas não liofilizadas.

1.2.5 Estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado em 50 ml de solução salina balanceada (**Tabela 17**) sob condição não-saturante. Este estudo foi realizado em um agitador orbital modelo MaxQ SHKE7000 (*Barnstead International*, Estados Unidos), sob temperatura e agitação constantes de 37°C e 30 rpm respectivamente.

Três implantes previamente pesados foram utilizados para cada tempo de coleta (1, 2, 3, 4 e 6 semanas) (**Figura 17**), sendo que cada implante foi colocado em um tubo com capacidade para 50 mL de meio.

A quantificação do FK506 liberado para o meio foi feita realizada de forma indireta devido ao fenômeno de tautomerização do mesmo em solução aquosa. Quantificou-se o restante de fármaco no implante por CLAE (método descrito na Parte I, item 2.1). Após a determinação da quantidade de FK506 restante nos implantes, calculou-se a quantidade liberada pela diferença entre a quantidade inicial e quantidade final.

Tabela 17 - Composição da solução salina balanceada. Fonte: SALIBA, 2007.

Componentes	Concentração (%p/v)
NaCl	0,64
KCl	0,075
CaCl ₂	0,048
MgCl ₂	0,03
Acetato de sódio	0,39
Citrato de sódio	0,17

**Figura 17 - Representação do estudo de liberação *in vitro***

2 RESULTADOS

2.1 Preparo dos implantes intraoculares biodegradáveis

Os implantes desenvolvidos apresentaram-se como um sistema homogêneo, na forma de bastão. Foram moldados implantes para o estudo de liberação *in vitro* e *in vivo*, sendo que aqueles obtidos para o primeiro estudo possuem diâmetro de aproximadamente 1,0 mm e 4,0 mm de comprimento, já para o estudo de liberação *in vivo* 0,45 mm de diâmetro e 6,0 mm de comprimento (**Figura 18**). O menor diâmetro dos sistemas para o estudo de liberação *in vivo*, foi necessário para que os mesmos pudessem ser inseridos no vítreo utilizando um trocar transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA - **Figura 19**).

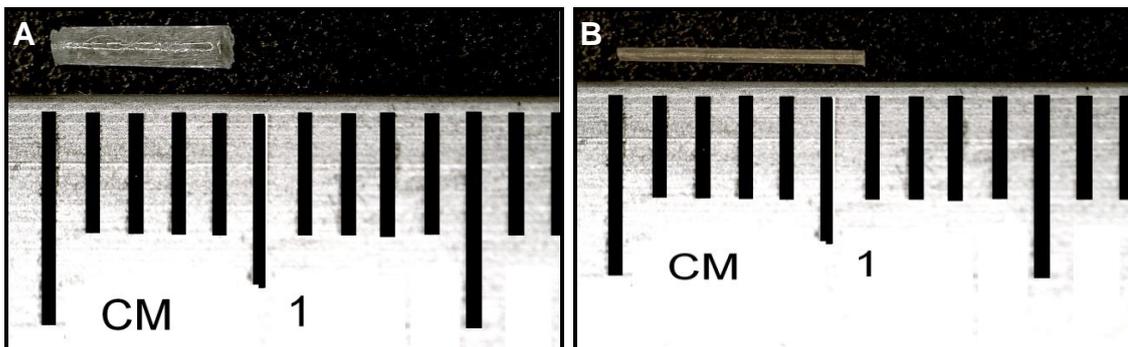


Figura 18 - Implante para estudo de liberação *in vitro* (A) e para o estudo *in vivo* (B).



Figura 19 - Trocar transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA).

O peso médio encontrado para os implantes biodegradáveis desenvolvidos para o estudo *in vitro* foi de $4,68 \pm 0,062$ mg. E daqueles desenvolvidos para o estudo *in vivo* foi de $1,41 \pm 0,095$ mg (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Peso médio dos implantes obtidos.

Peso dos implantes estudo in vitro			
Estudo in vitro		Estudo in vivo	
4,68		1,55	
4,65		1,35	
4,75		1,30	
4,68		1,31	
4,72		1,52	
4,82		1,39	
4,66		1,38	
4,61		1,40	
4,63		1,56	
4,68		1,38	
Média	4,680	Média	1,414
Desvio padrão	0,062	Desvio padrão	0,095
DPR	1,316	DPR	6,752

2.2 Estudo da morfologia de superfície dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As superfícies dos implantes obtidos apresentaram-se morfologicamente homogêneas antes da execução do teste de liberação *in vitro* (**Figura 20**).

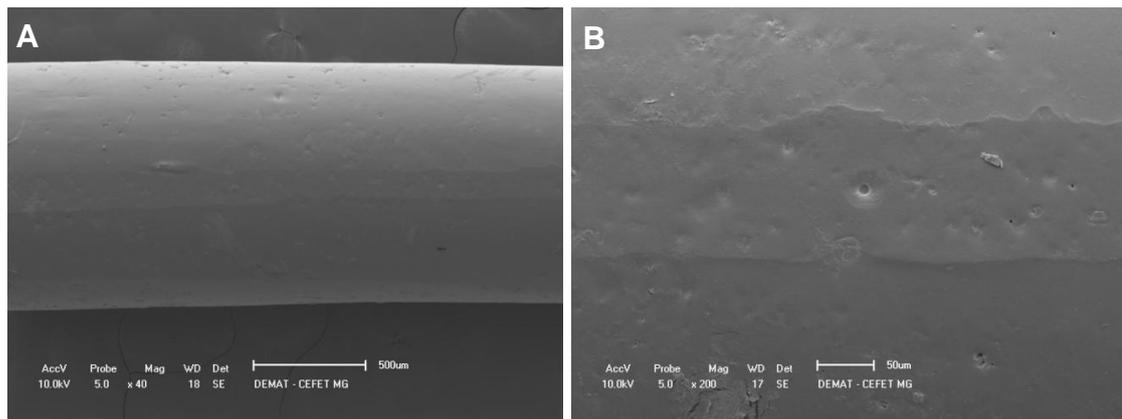


Figura 20 - Fotomicrografia do implante contendo FK506 antes da execução do teste de liberação *in vitro* (A aumento de 40X e B de 200X).

Entretanto as fotomicrografias dos implantes coletados após 1, 4 e 8 semanas de execução do estudo de liberação *in vitro* (**Figura 21, 22 e 23**), mostraram irregularidades na superfície. Foi observado que essas irregularidades foram mais intensas para os dispositivos que continham o fármaco.

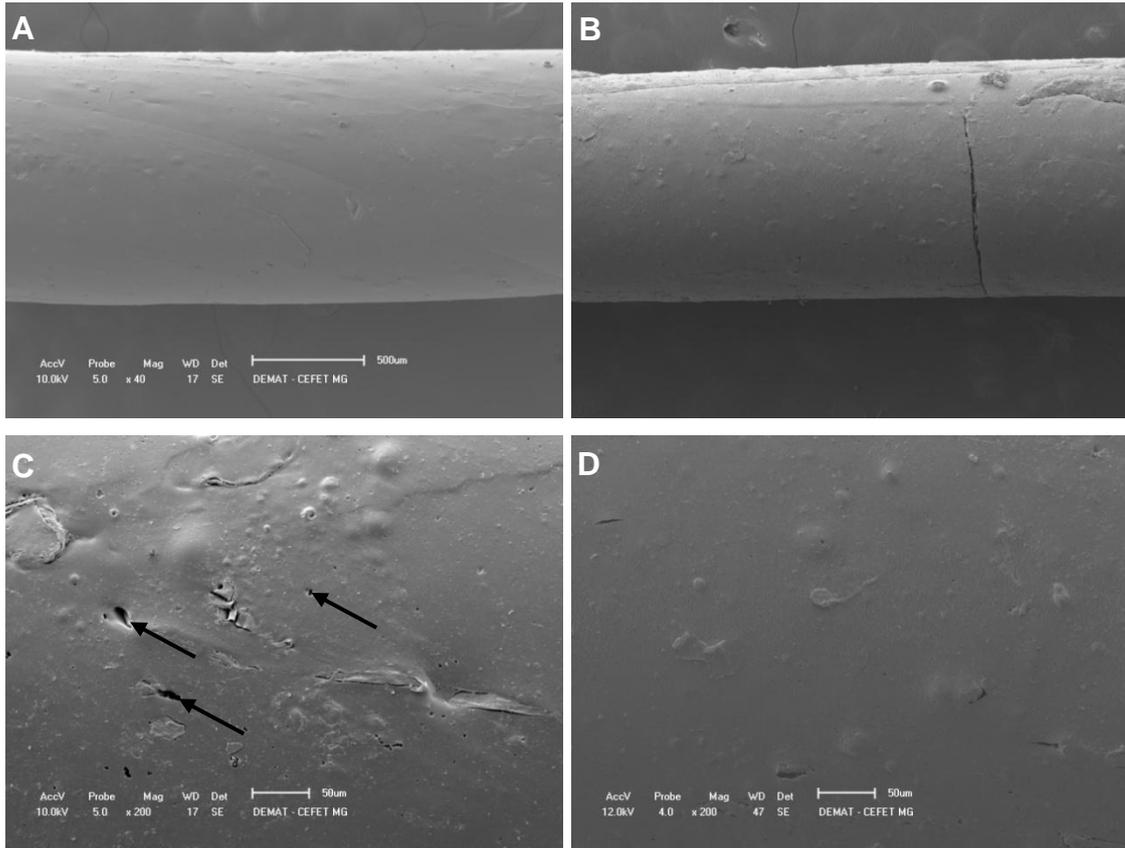


Figura 21 - Fotomicrografia do implante contendo FK506 (A e C) e do implante de PLGA sem fármaco (B e D), após uma semana de execução do teste de liberação *in vitro*. (A e B aumento de 40X; C e D de 200X).

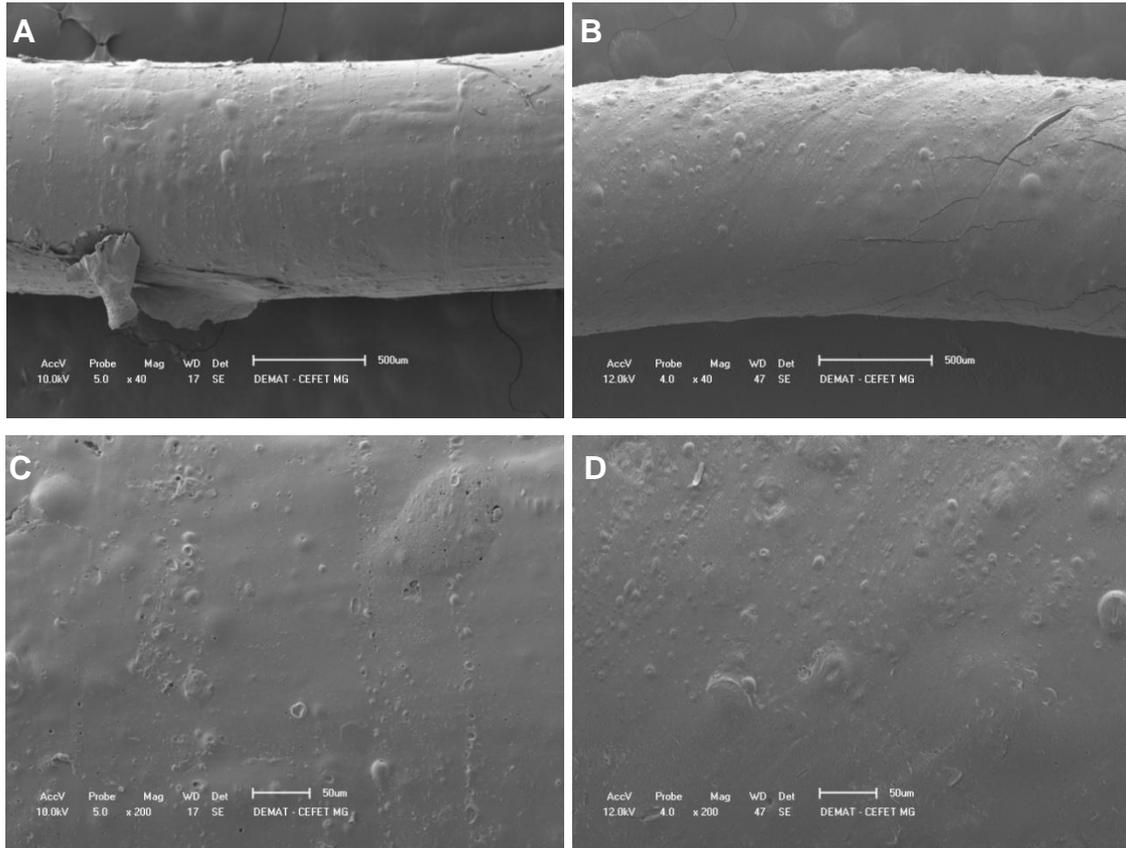


Figura 22 - Fotomicrografia do implante contendo FK506 (A e C) e do implante de PLGA sem fármaco (B e D), após quatro semanas de execução do teste de liberação *in vitro*. (A e B aumento de 40X; C e D 200X)

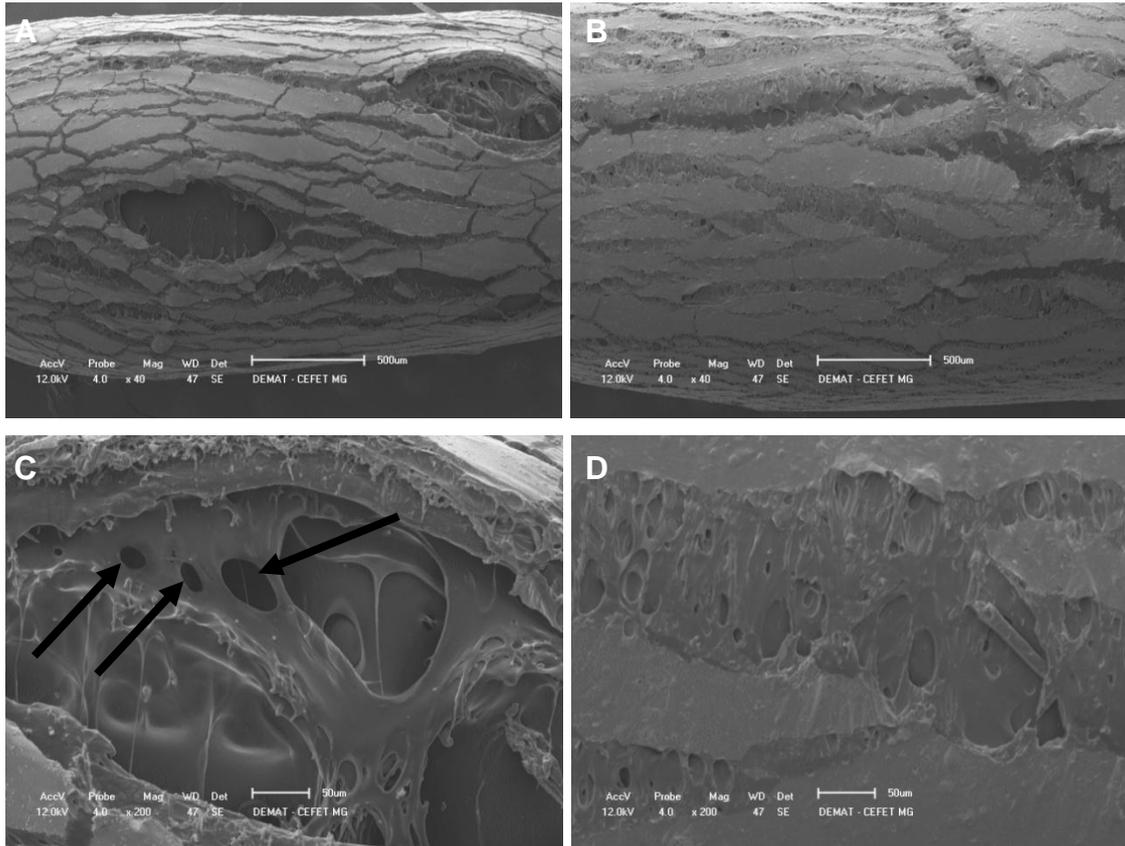


Figura 23 - Fotomicrografia do implante contendo FK506 (A e C) e do implante de PLGA sem fármaco (B e D), após oito semanas de execução do teste de liberação *in vitro*. (A e B aumento de 40X; C e D de 200X)

Após uma semana de início do estudo, os implantes contendo o fármaco apresentaram em suas superfícies alguns poros dispersos (**Figura 21C**) o que pode ser devido à saída do fármaco do dispositivo por mecanismo de difusão. Observa-se também um crescente aumento na irregularidade e porosidade da superfície dos sistemas desenvolvidos em função do tempo de execução do estudo. Após oito semanas de início do estudo, a superfície dos implantes contendo FK506 mostrou-se intensamente irregular e com grandes poros (**Figura 23C**), o que leva à suposição de que o fármaco liberado para o meio durante este período é decorrente tanto de sua difusão, quanto da degradação do polímero.

A superfície dos implantes de PLGA sem fármaco apresentou-se morfologicamente homogênea até a primeira semana (**Figura 21B e 21D**) e ligeiramente irregular a partir da quarta semana (**Figuras 22D**). Entretanto na oitava semana (**Figura 23B e 23D**) constataram-se alterações, mais evidentes na superfície do implante de PLGA

sem fármaco, mas menos intensas quando comparada ao implante contendo o fármaco (**Figura 23A e 23C**). Sugere-se que essa menor intensidade nas alterações da superfície dos implantes de PLGA sem fármaco pode ser devido à maior organização da matriz polimérica na ausência do fármaco, o que retarda a sua degradação.

Os implantes com e sem o fármaco também foram visualizados a partir de sua superfície lateral (**Figuras 24, 25 e 26**) e nessas fotomicrografias fica evidente que o implante contendo o tacrolimus possui maior porosidade do que aquele constituído somente de PLGA e que esta porosidade aumenta ao longo do tempo, à medida que o fármaco vai sendo liberado. Essa observação justifica os resultados de concentração do fármaco obtidos no estudo de liberação *in vitro*, que também aumenta ao longo do tempo do estudo.

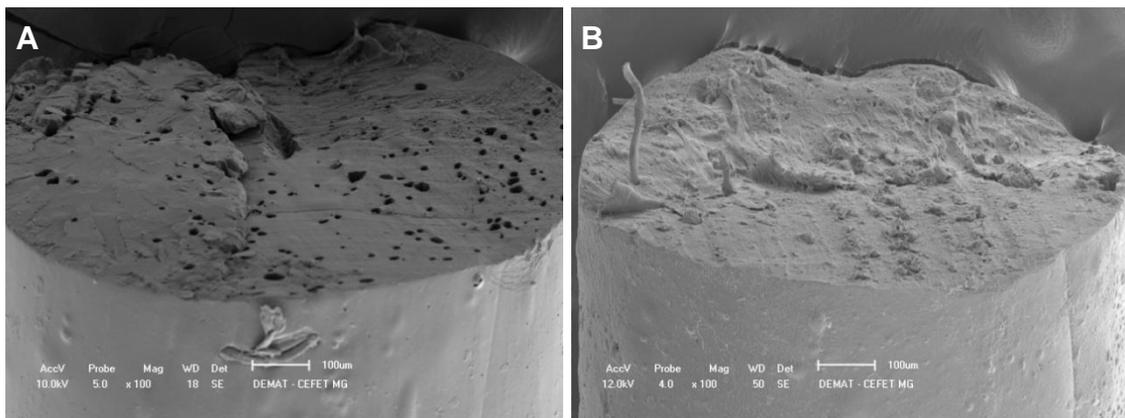


Figura 24 - Fotomicrografia da lateral do implante contendo FK506 (A) e do implante de PLGA sem fármaco (B), após uma semana de execução do teste de liberação *in vitro*. (Aumento de 100X)

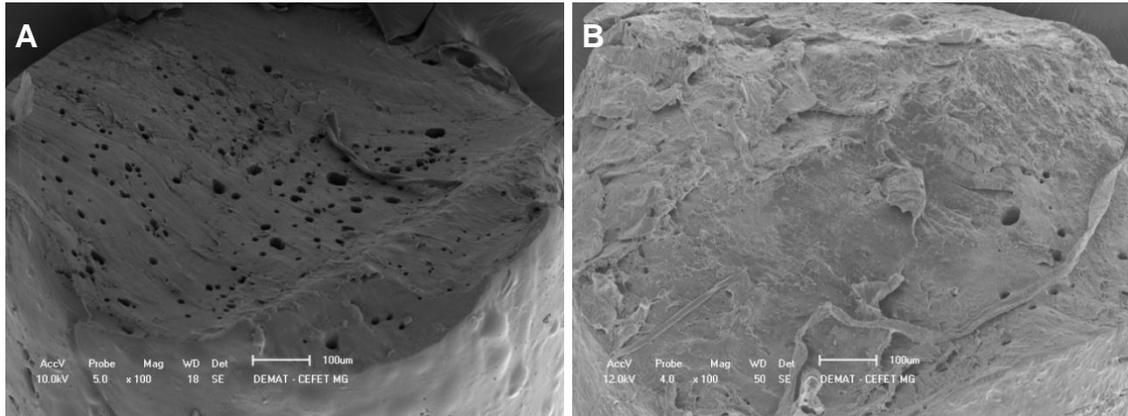


Figura 25 - Fotomicrografia da lateral do implante contendo FK506 (A) e do implante de PLGA sem fármaco (B), após quatro semanas de execução do teste de liberação *in vitro*. (Aumento de 100X)

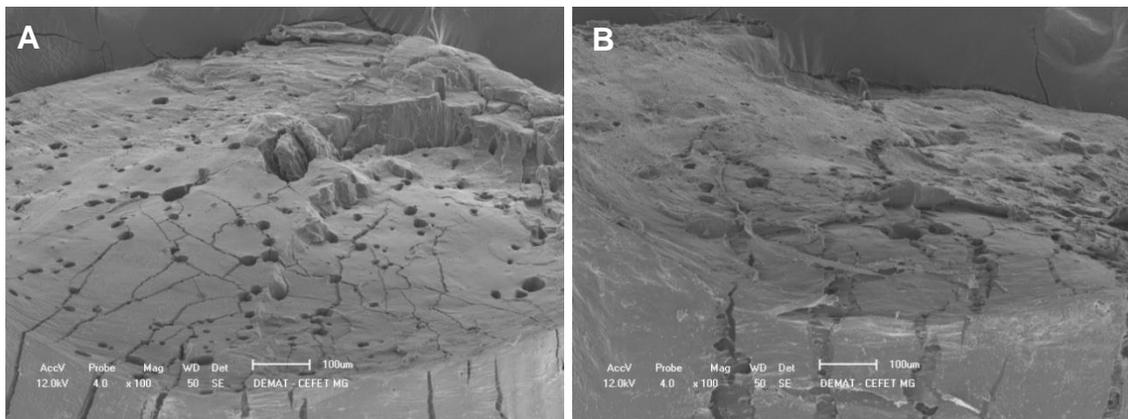


Figura 26 - Fotomicrografia da lateral do implante contendo FK506 (A) e do implante de PLGA sem fármaco (B), após oito semanas de execução do teste de liberação *in vitro*. (Aumento de 100X)

2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A curva de DSC referente ao FK506 está apresentada na **Figura 27** e nela, pode-se observar um evento endotérmico próximo a 130°C (T_{onset} 126,65 °C) com um consumo de energia de 39,78 J.g⁻¹, que se refere à fusão do fármaco. Esse resultado vai ao encontro dos dados encontrados na literatura, os quais descrevem eventos térmicos do FK506 em análises de DSC (YAMASHITA *et al.*, 2003; JOE *et al.*, 2010; SHIN *et al.*, 2010 e POPLE & SINGH, 2011).

Quanto a análise de DSC do PLGA 75:25 (**Figura 27**), pode-se observar um evento característico deste polímero, próximo à 55°C (53,48°C) correspondente a temperatura de transição vítrea. O mesmo evento endotérmico aqui descrito foi encontrado por outros pesquisadores, em temperaturas próximas à 60°C (FIALHO *et al.*, 2007; SALIBA, 2007).

Já na curva de DSC do implante (**Figura 27**), não se observa a fusão do fármaco, o que sugere uma interiorização completa do mesmo nas cadeias poliméricas, uma vez que a porcentagem de FK506 no dispositivo é baixa (10,0%). Adicionalmente, pode-se observar que essa curva de DSC do implante, mantém o mesmo perfil de eventos para o PLGA quando comparado com o perfil da curva de PLGA sem fármaco.

Observa-se também na **Figura 27**, que houve ligeira antecipação do T_{onset} de transição vítrea do PLGA no implante (47,99 °C) quando comparada com o T_{onset} do PLGA sem fármaco (53,48°C). A antecipação observada não foi identificada como uma incompatibilidade entre o polímero e o fármaco. O que justificaria este fenômeno de antecipação seria o posicionamento das moléculas de FK506 entre as cadeias poliméricas, desestabilizando assim as mesmas. Dessa forma, a energia necessária para iniciar o movimento das cadeias, seria alcançada a uma temperatura mais baixa, conferindo ao PLGA no implante um menor T_{onset} de transição vítrea quando comparado ao PLGA 75:25 (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Quanto à estabilidade das matérias-primas na faixa de temperatura utilizada para a moldagem dos implantes (100,0-120,0 °C), a curva de DSC apresentada na **Figura 27** permite concluir que os materiais são estáveis. Nenhum evento que sugira degradação ocorre antes desta faixa de temperatura ou durante a mesma.

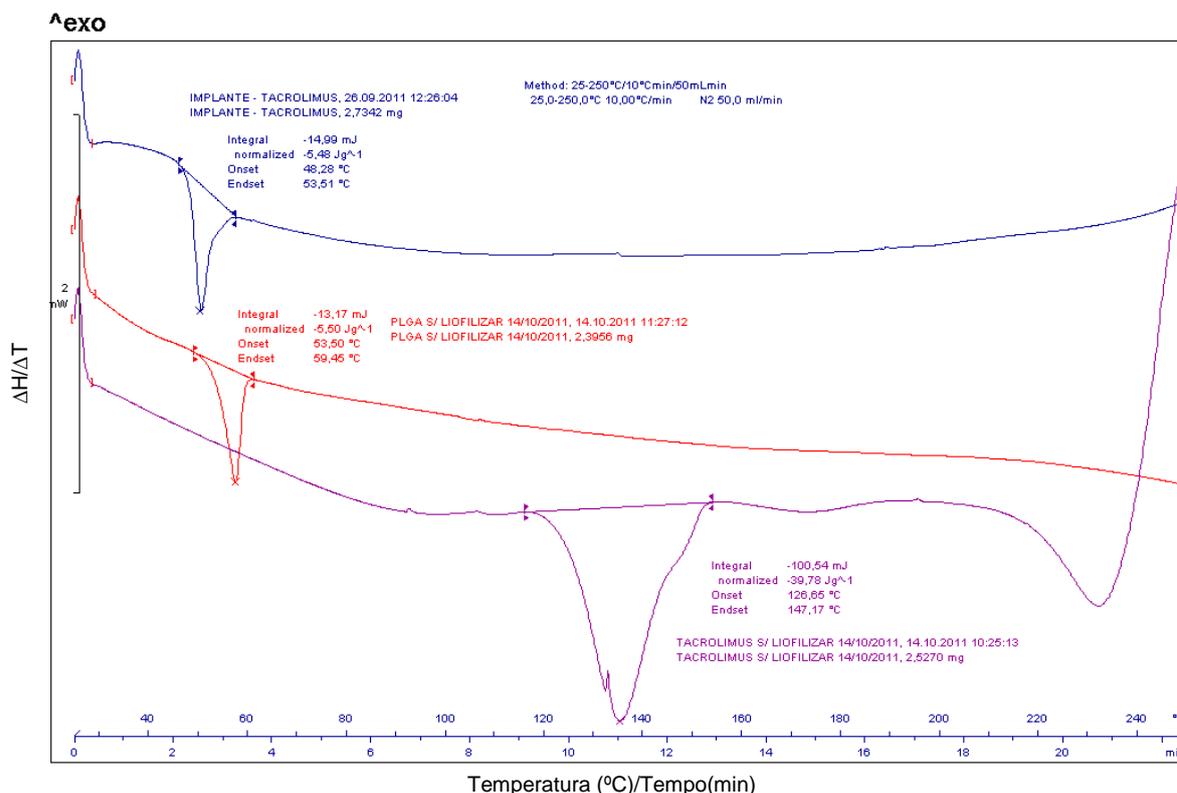


Figura 27 - Curvas de DSC do FK506 (rosa), do PLGA 75:25 (vermelho) e do implante contendo 10% p/p de FK506 (azul)

Com o objetivo de confirmar, que a antecipação citada anteriormente e o não aparecimento do evento de fusão do FK506 no implante, não se tratava de uma incompatibilidade ou interação entre as matérias-primas da formulação; realizou-se a análise de DSC (**Figura 28**) de uma mistura física não liofilizada 1:10 (FK506:PLGA). Observa-se que a fusão do FK506 também não foi apresentada nesta análise (**Figura 28**) e que não houve antecipação do T_{onset} de transição vítrea do PLGA como ocorreu na análise de DSC do implante. As duas observações citadas, dão suporte à hipótese de inexistência de interação e incompatibilidade.

A não antecipação do *Tonset* de transição vítrea do PLGA na mistura física em relação ao PLGA sem liofilizar, sugere que o posicionamento do fármaco entre as cadeias poliméricas ocorra durante o processo de liofilização. O não aparecimento do evento de fusão na mistura física, na qual as cadeias poliméricas do PLGA 75:25 e o FK506 não estão tão próximas, sugere não haver incompatibilidades no implante no qual esta proximidade existe e que o desaparecimento do evento de fusão do FK506 nos dois casos (mistura física e implante) é devido a baixa porcentagem do ativo.

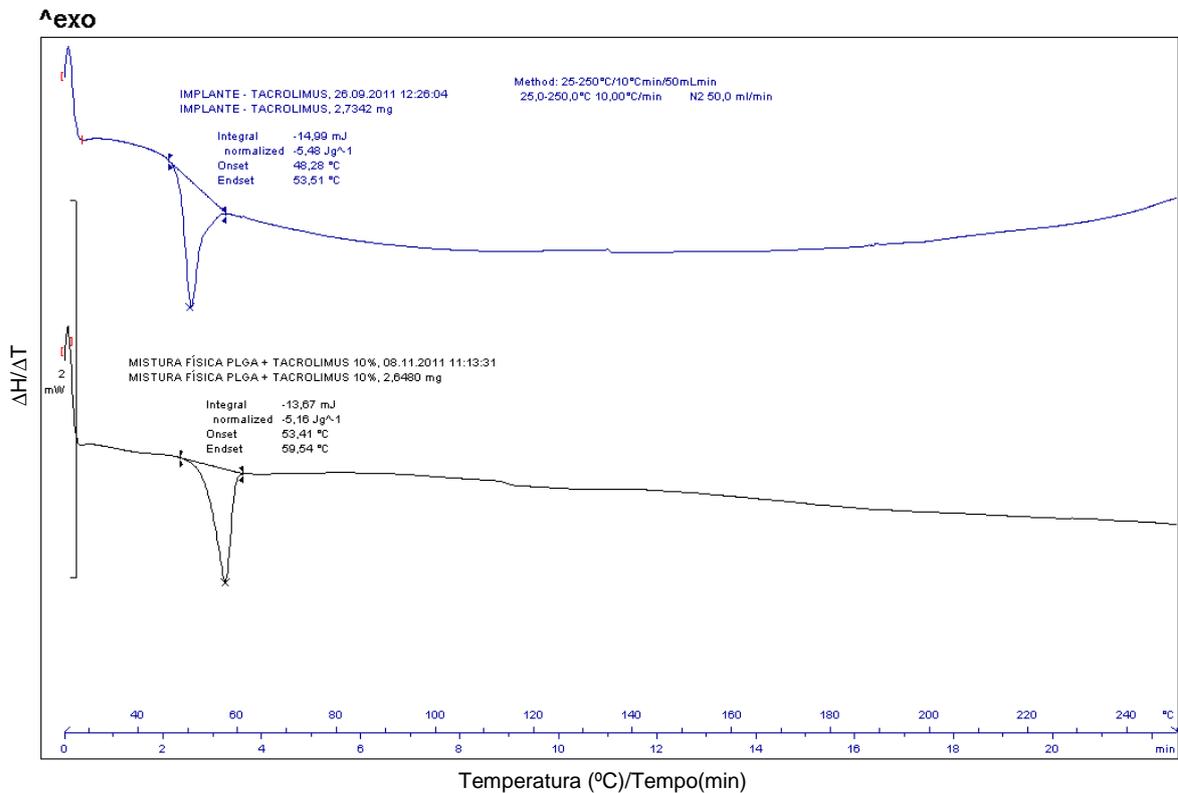


Figura 28 - Curvas de DSC do implante contendo 10% p/p de FK506 (azul) e da mistura física 1:10 (FK506:PLGA) [preto].

2.4 Análises termogravimétricas (TGA)

As amostras estudadas por esta técnica foram as mesmas avaliadas por DSC (PLGA 75:25, FK506, e o implante contendo 10% p/p de FK506), com exceção da mistura física 1:10 (FK506:PLGA) não liofilizada (**Figura 29**). Observa-se que o perfil das três curvas de TGA é semelhante, ocorrem processos de perda de massa nas amostras em uma única etapa (“*step* único”). Em contrapartida pode-se observar que o início de perda de massa* no implante foi antecipado em relação à perda de massa para o PLGA sem fármaco. Esse fato dá suporte à hipótese de que o posicionamento das moléculas de FK506 entre as cadeias poliméricas desestabilizam levemente as mesmas.

Oréface *et al.* (2006), descreve que a estrutura macromolecular é responsável em grande parte pela temperatura de transição vítrea, a qual está relacionada com o aumento da mobilidade das cadeias poliméricas. Mudanças nesta estrutura macromolecular, pela adição de aditivos (como fármacos), podem alterar a estabilidade das cadeias e aumentar a mobilidade das mesmas.

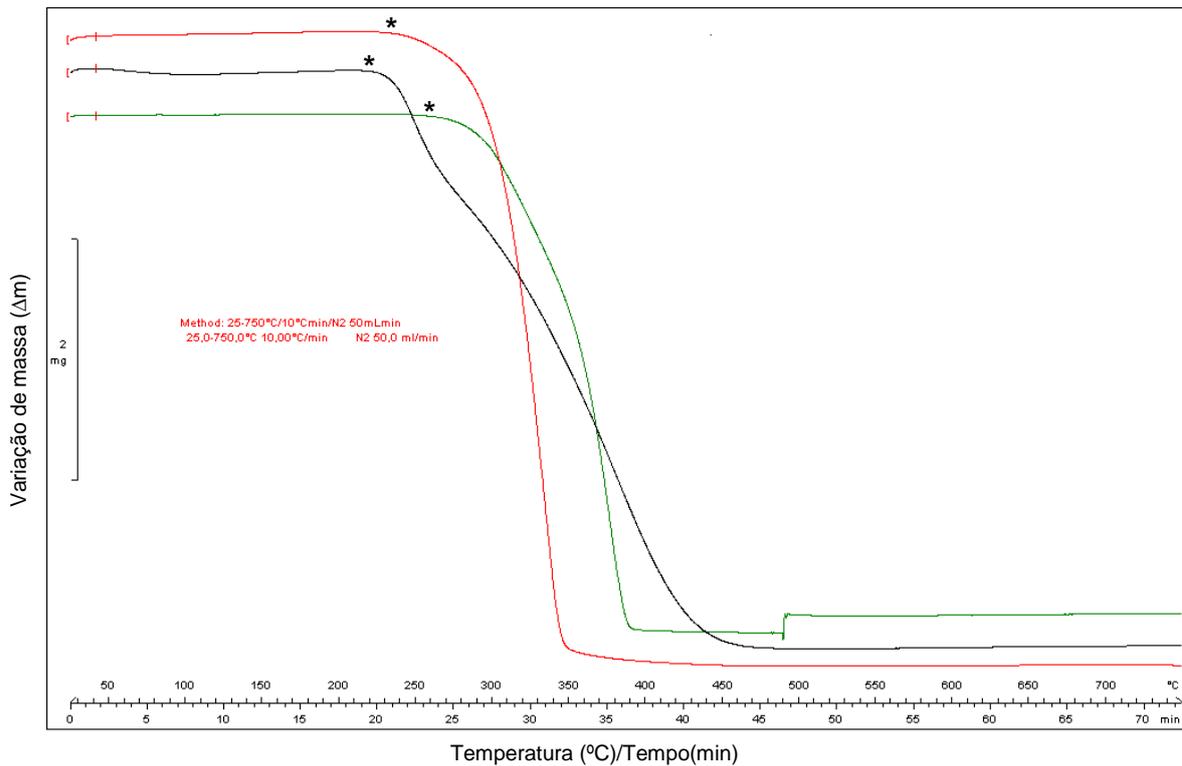


Figura 29 - Curvas de TGA do implante contendo 10% p/p de FK506 (vermelho), do FK506 (preto) e do PLGA (verde).

Além da análise de possíveis interações e incompatibilidades entre as matérias-primas do implante, as análises termogravimétricas também permitiram avaliar a estabilidade dos materiais frente à temperatura de moldagem. Não foi verificada perda de massa antes e durante a faixa de 100,0-120,0°C (**Figura 29**); o que demonstra juntamente com as análises de DSC a viabilidade do processo proposto neste trabalho para a obtenção dos implantes intraoculares. A mistura liofilizada (**Figura 30**), que é utilizada diretamente para moldagem dos implantes, também se mostrou estável na faixa de temperatura em questão.

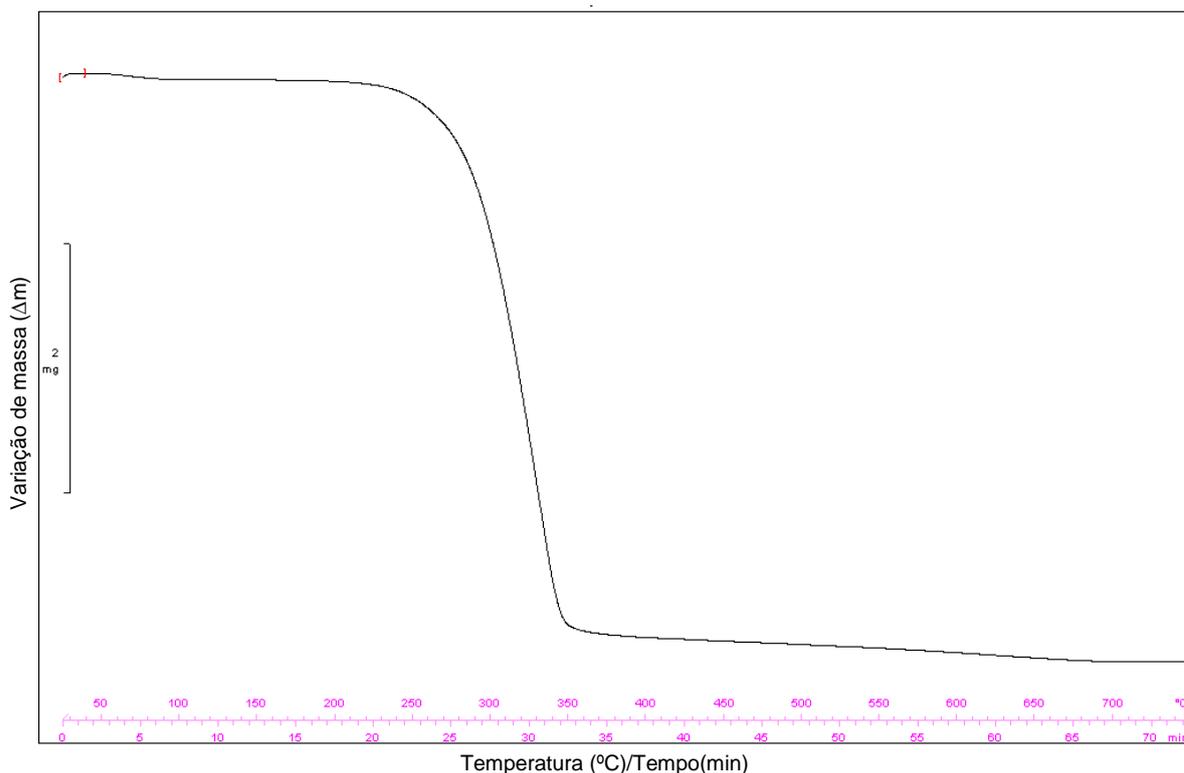


Figura 30 - Curvas de TGA da mistura liofilizada (PLGA:FK506) contendo 10% p/p de FK506.

2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourrier

De acordo com Hane *et al.* (1992), o espectro do FK506 é caracterizado pelo aparecimento de bandas em 3450 cm^{-1} (estiramento O-H), 1740 cm^{-1} e 1725 cm^{-1} (estiramento C=O), 1693 cm^{-1} (estiramento N-H de amida), 1637 cm^{-1} (estiramento C=C), 1194 cm^{-1} (estiramento C-O de éster), 1176 cm^{-1} e 1094 cm^{-1} (estiramento C-O-C de éter). Os dados encontrados neste trabalho confirmam os dados da literatura e foram úteis na confirmação da identidade do fármaco. O espectro do FK506 está disposto na **Figura 31** e nele se encontram todas as bandas descritas por Hane *et al.*, (1992).

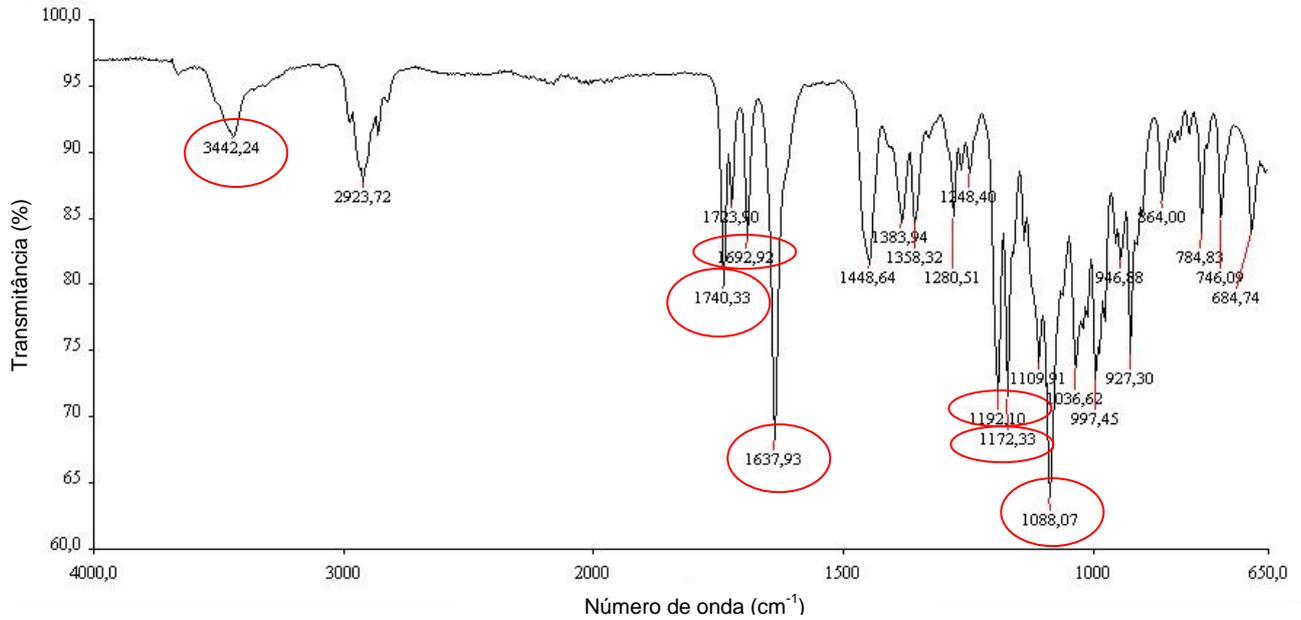


Figura 31 - Espectro de FTIR do FK506.

Já o polímero PLGA 75:25 (**Figura 32**) apresentou uma banda em $1750,86\text{ cm}^{-1}$ atribuída à frequência de estiramento de grupos carbonilas (C=O) de ésteres, banda em $2995,80\text{ cm}^{-1}$ atribuída ao estiramento dos grupos metila (C-H) presentes na molécula, e de 1460 a 1000 cm^{-1} aproximadamente, relativas ao estiramento de ligações (C-O) e (O-H) respectivamente, resultado semelhante ao encontrado na literatura (Yang *et al.*, 2007).

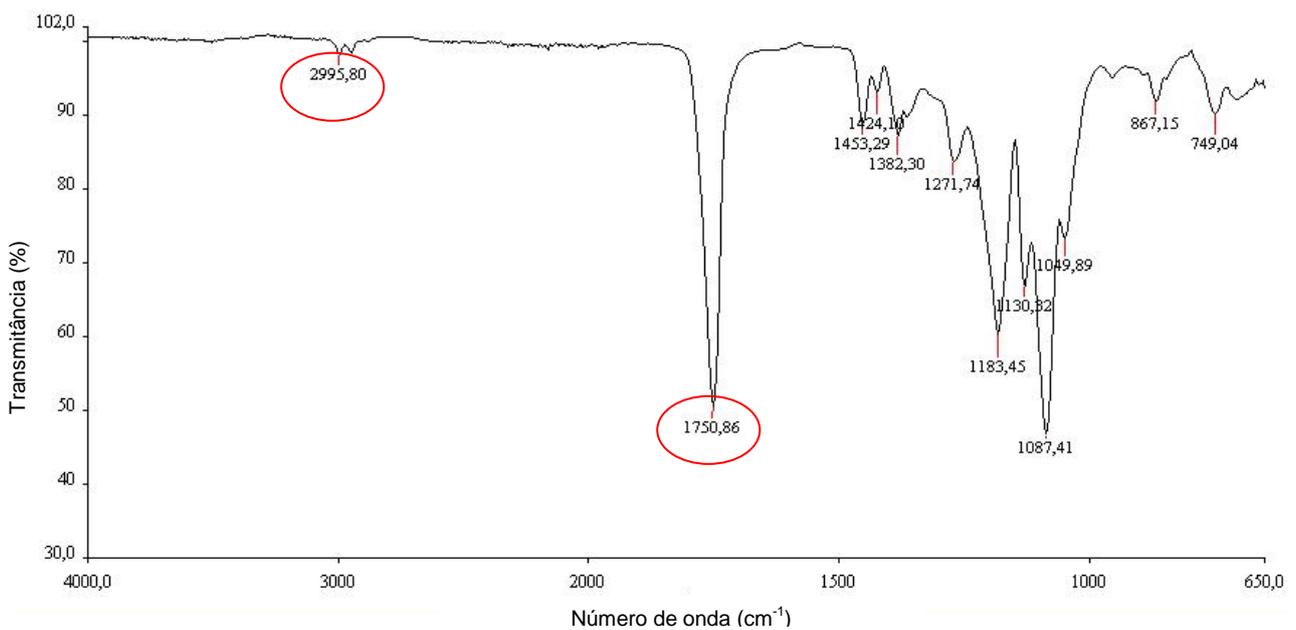


Figura 32 - Espectro de FTIR do PLGA 75:25.

A avaliação da existência de interação química e/ou física no sistema (implante intraocular) foi também avaliada por I.V., comparando os espectros obtidos para o FK506, o PLGA 75:25 com aquele obtido para o implante (**Figura 33**).

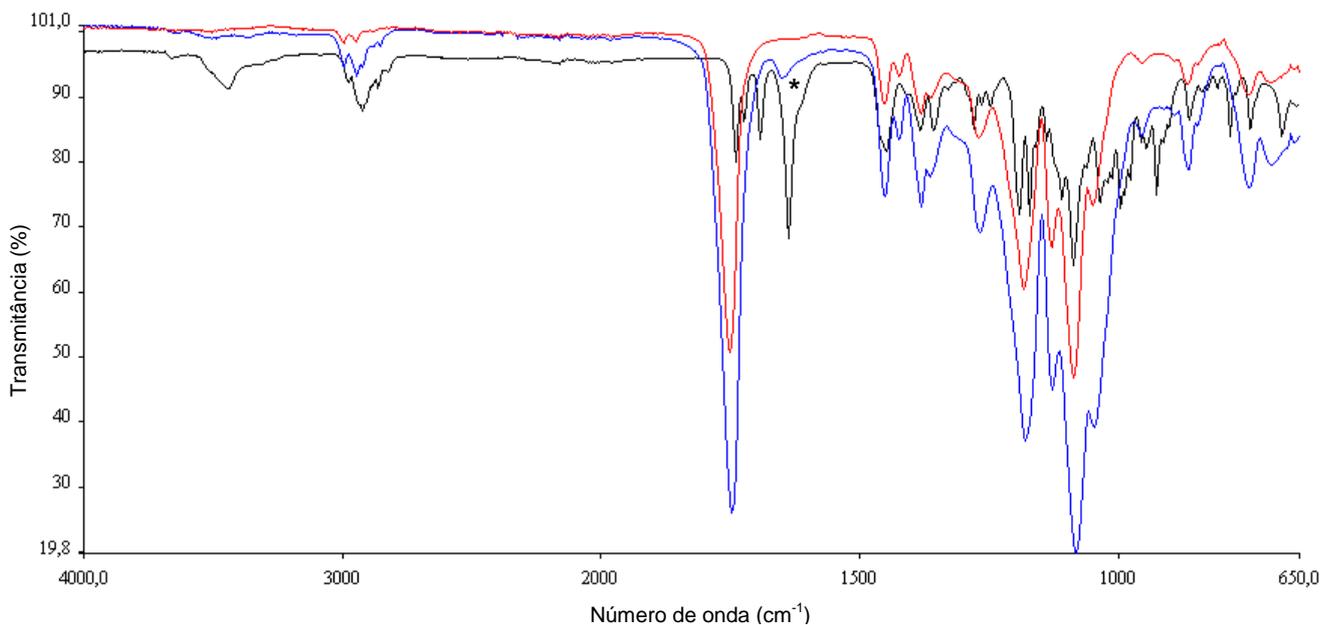


Figura 33 - Espectros de FTIR do FK506 (preto), do PLGA 75:25 (vermelho) e do implante (azul).

Ao avaliar o espectro obtido para o implante, na **Figura 33**, observa-se que ele é muito semelhante ao espectro do PLGA e que as bandas referentes aos grupos químicos do FK506 não foram apresentadas, com exceção daquela referente ao estiramento N-H de amida*, mas em pequena intensidade. O aparecimento dessa banda que não existe no espectro do PLGA (**Figura 32**) sugere a presença do FK506 no sistema. Entretanto, o não aparecimento das outras bandas do FK506 pode ser devido a existência de incompatibilidade/interações ou a pequena porcentagem de FK506 no dispositivo (10%) e sua distribuição entre as cadeias poliméricas, fato que já foi discutido para as análises térmicas.

Com o objetivo de confirmar a ausência de interações foi executada uma análise da mistura física 1:10 - FK506:PLGA e comparou-se o espectro obtido com aquele do implante (**Figura 34**).

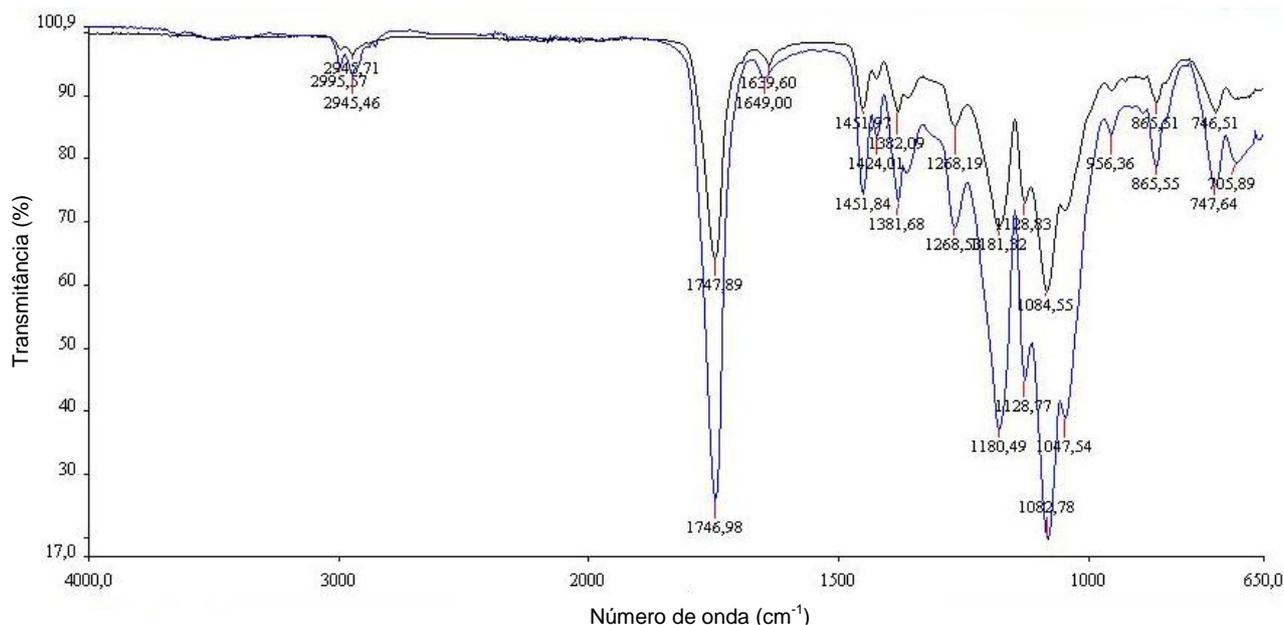


Figura 34 - Espectros de FTIR do implante contendo 10% p/p de FK506 (azul) e da mistura física 1:10 - FK506:PLGA (preto).

Observa-se que no espectro da mistura física também não apareceram as outras bandas do FK506, somente a referente ao estiramento N-H de amida. Esse fato sugere a inexistência de interações entre o PLGA e o FK506, uma vez que, caso esse fenômeno realmente ocorresse no implante, a mistura física deveria apresentar tanto as bandas referentes ao polímero quanto aquelas referentes ao ativo, o que não ocorreu.

Outra forma de avaliar a presença ou não de interações entre o fármaco e o PLGA é verificar se as posições dos estiramentos, dos principais grupos químicos de cada composto permaneceram inalteradas na formulação final (implante) quando comparado com as matérias-primas originais. No espectro do PLGA, observa-se que o estiramento referente ao grupo carbonila ocorre em $1750,86 \text{ cm}^{-1}$ (**Figura 32**) e no implante em $1746,98 \text{ cm}^{-1}$ (**Figura 34**). Já o estiramento referente à ligação N-H (do FK506) ocorre em $1692,92 \text{ cm}^{-1}$ (**Figura 31**) e no implante observa-se um deslocamento do mesmo para um número de onda mais baixo, 1649 cm^{-1} (**Figura 34**). Esse último deslocamento poderia indicar alguma interação da ligação N-H com o PLGA.

Outra observação é que a banda apresentada na mistura física, referente ao FK506 (estiramento N-H) é mais intensa do que a mesma banda apresentada no espectro do implante. Essa diminuição de intensidade no dispositivo sugere que durante o processo de obtenção do mesmo, principalmente durante o processo de liofilização, o fármaco foi capaz de se distribuir entre as cadeias poliméricas.

Os resultados dos estudos de liberação *in vitro* e *in vivo* juntamente com os obtidos das análises térmicas e da espectroscopia no infravermelho, poderão esclarecer a ocorrência de interação entre o FK506 e o PLGA e se esta interação impede a liberação do princípio ativo do sistema.

2.6 Estudo de liberação *in vitro*

O perfil de liberação acumulada do FK506 a partir dos implantes preparados com PLGA 75:25 está apresentado na **Figura 35**. A taxa de liberação acumulada do fármaco foi de aproximadamente 58,2% durante as seis semanas de estudo. Além disso, observam-se através dos desvios padrões apresentados na **Figura 35** que os implantes avaliados apresentaram comportamentos semelhantes frente ao processo de liberação, com exceção no primeiro tempo de coleta (5 dias) que mostrou o maior desvio padrão (9,36).

Em um sistema matricial, como o desenvolvido neste trabalho, a liberação do fármaco é controlada por três fatores: difusão pelos poros da matriz, degradação do polímero ou por uma combinação desses fatores. Comumente, o perfil de liberação pode ser dividido em três etapas: a primeira consiste de uma alta taxa de liberação do fármaco, conhecida como “burst” inicial, possivelmente devido à presença deste na superfície do sistema; a segunda etapa ocorre devido à difusão do fármaco da matriz para o meio externo antes mesmo de ocorrer a erosão da matriz polimérica, e está relacionada com o coeficiente de difusão, saturação do meio de liberação e com a concentração de fármaco no sistema; a terceira fase corresponde a outro

“burst” devido ao intumescimento e desintegração da matriz propriamente dita (VIEIRA, 2011).

Ao observar o perfil de liberação acumulada obtido para o FK506 nota-se a ocorrência de apenas duas etapas de liberação, o “burst” inicial e a etapa de difusão do fármaco, que de acordo com o estudo de MEV, ocorreu sem degradação da matriz polimérica. O não aparecimento da terceira etapa pode ser devido ao tempo do estudo, o qual não foi suficiente para degradação significativa da matriz. Entretanto o tempo definido foi suficiente para alcançar o objetivo do teste que era avaliar a reprodutibilidade dos sistemas.

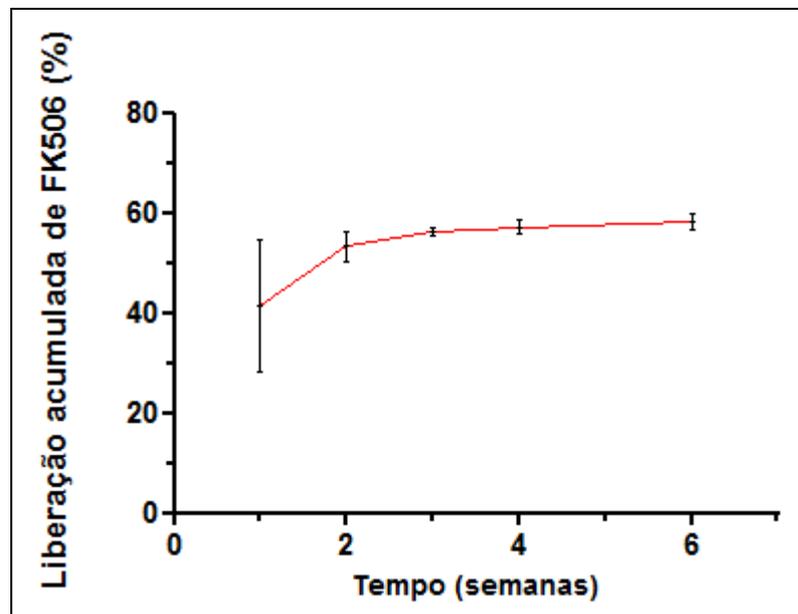


Figura 35 - Liberação acumulada do FK506 a partir dos implantes de PLGA 75:25 contendo 10% p/p de FK506 (Os valores são representados como média \pm desvio padrão, n=3).

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho mostraram que foi possível obter implantes biodegradáveis para a liberação de FK506. O estudo de liberação *in vitro* demonstrou que os implantes são adequados para a liberação prolongada do fármaco sendo, portanto, sistemas promissores para o tratamento de uveítes crônicas.

As técnicas de caracterização empregadas sugerem ausência de incompatibilidades e/ou interações entre o PLGA 75:25 e o FK506, fato que foi confirmado diante do perfil de liberação *in vitro* em que houve liberação de quantidade significativa do fármaco.

PARTE III
Estudo de liberação *in vivo*

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

1. FK506 - Iffect Chemphar Co., Ltda; Shenzhen, China.
2. Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) 75:25 [PLGA 75:25; viscosidade inerente (v.i.) = 0.50 - 0.70 dl/g] Resomer[®] RG 755 S - Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co; Ingelheim, Alemanha.
3. Acetonitrila grau CLAE - Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.
4. Metanol grau CLAE- Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.
5. Cloridrato de Cetamina 100,0 mg/mL - Laboratório Vetbrands; São Paulo, Brasil.
6. Cloridrato de xilasina 20,0 mg/mL - Laboratório Vetbrands; São Paulo, Brasil.
7. Maxitrol[®] (Dexametasona 0,1%; neomicina 0,35% e sulfato de polimixina B 6000UI) - Alcon Laboratórios do Brasil LTDA; São Paulo, Brasil.

1.2 Métodos

1.2.1 Animais

Foram utilizados nesta etapa do trabalho, coelhos fêmeas, da raça *New Zealand*, com peso entre 1,8 e 2,5 Kg e idade média de 4 meses. Durante o período do estudo os animais foram mantidos no biotério da Fundação Ezequiel Dias - FUNED (Belo Horizonte, MG). Os coelhos foram mantidos em pares nas gaiolas, em ambiente com temperatura média de 25 °C, com ar condicionado e exaustor de ar. Não houve restrição de água e a alimentação utilizada foi ração animal própria para a espécie (Nature Multivita, Socil Evalis Nutrição Animal Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil).

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da ARVO (do inglês - *Association for Research in Vision and Ophthalmology*) para o uso de animais em pesquisa em oftalmologia e da CEUA/FUNED (Comissão de Ética no Uso de Animais da FUNED), protocolo 026/2011.

1.2.2 Procedimento de inserção dos implantes

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo 1 recebeu os sistemas biodegradáveis contendo FK506 e o grupo 2 recebeu os sistemas biodegradáveis sem o fármaco. Foi feita implantação do sistema somente em um dos olhos de cada animal, o outro olho serviu como controle.

Os coelhos foram previamente anestesiados com injeção intramuscular de uma mistura de cloridrato de cetamina 30 mg/Kg (Dopalen[®], Laboratório *Vetbrands, Brasil*) e cloridrato de xilasina 3,0 mg/kg (Anasedan[®], Laboratório *Vetbrands, Brasil*).

Os sistemas contendo FK506 foram implantados, com auxílio de um trocar transescleral (Accurus[®] 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA), no vítreo (**Figura 36**) dos olhos dos animais. O implante foi inserido através da cânula transescleral a qual foi retirada posteriormente finalizando a inserção. Após o procedimento, foi administrado a todos os animais, três vezes ao dia durante por uma semana, o colírio Maxitrol[®] para prevenção de infecções.

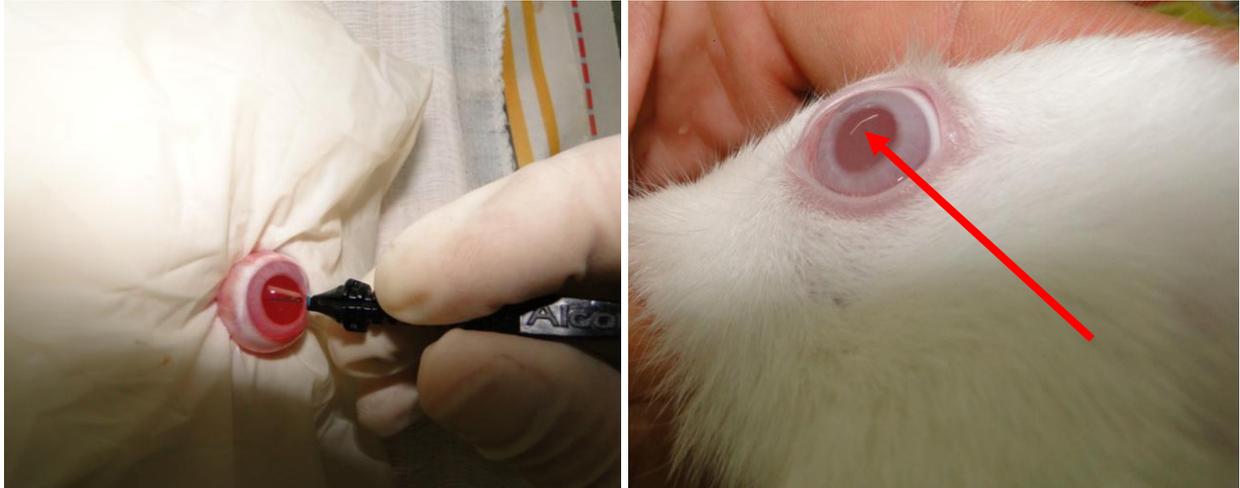


Figura 36 - Procedimento de inserção e localização intravítrea dos implantes.

Quatro animais de cada grupo foram sacrificados por semana, com dose letal de pentobarbital 100,0 mg/kg após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas de implantação dos sistemas desenvolvidos. A cada semana os implantes foram totalmente retirados e armazenados a -80°C até o momento da quantificação do fármaco, para a determinação do perfil de liberação.

1.2.3 Exame Clínico

A avaliação clínica incluiu exames de inspeção ocular e oftalmoscopia binocular direta antes do procedimento de inserção dos dispositivos e semanalmente após a implantação dos sistemas até a sexta semana. Os seguintes dados clínicos foram pesquisados: hiperemia conjuntival, quemose, secreção ocular, ceratite ulcerativa, uveíte anterior, liquefação vítrea, corioretinite, hemorragia intrarretiniana e descolamento da retina.

1.2.4 Análise da concentração de FK506 liberada no vítreo

A concentração de tacrolimus liberada no vítreo foi determinada indiretamente pela determinação da quantidade de FK506 restante nos implantes por CLAE. Os implantes armazenados a -80°C foram previamente descongelados e solubilizados em 500,0 µL de solução diluente (ACN:MetOH - 90:10) e posteriormente submetidos a análise. As condições de análise utilizadas na quantificação foram aquelas descritas na Parte I item 2.1. Foi calculada a diferença entre a quantidade inicial do fármaco e a determinada nos implantes removidos dos olhos dos animais.

2 RESULTADOS

2.1 Exame Clínico

Por meio de inspeção ocular e oftalmoscopia binocular indireta não se observaram evidências de toxicidade do fármaco ou opacidade dos meios oculares nos animais que receberam os implantes durante o período de 6 semanas do estudo. Como pode ser observada na **Tabela 19**, durante todo o estudo a única alteração observada foi hiperemia conjuntival discreta, o que provavelmente não foi devido ao implante de FK506 aplicado e sim devido à manipulação dos animais.

O implante permaneceu junto à parede ocular, no local correspondente à implantação, em todas as semanas do estudo, entretanto em um caso o implante da sexta semana não foi encontrado no vítreo, o que sugere degradação total do mesmo.

Em relação às alterações na retina (hemorragia e descolamento), pode-se observar na **Figura 37** que esta estrutura perante análise macroscópica não se apresentou alterada.

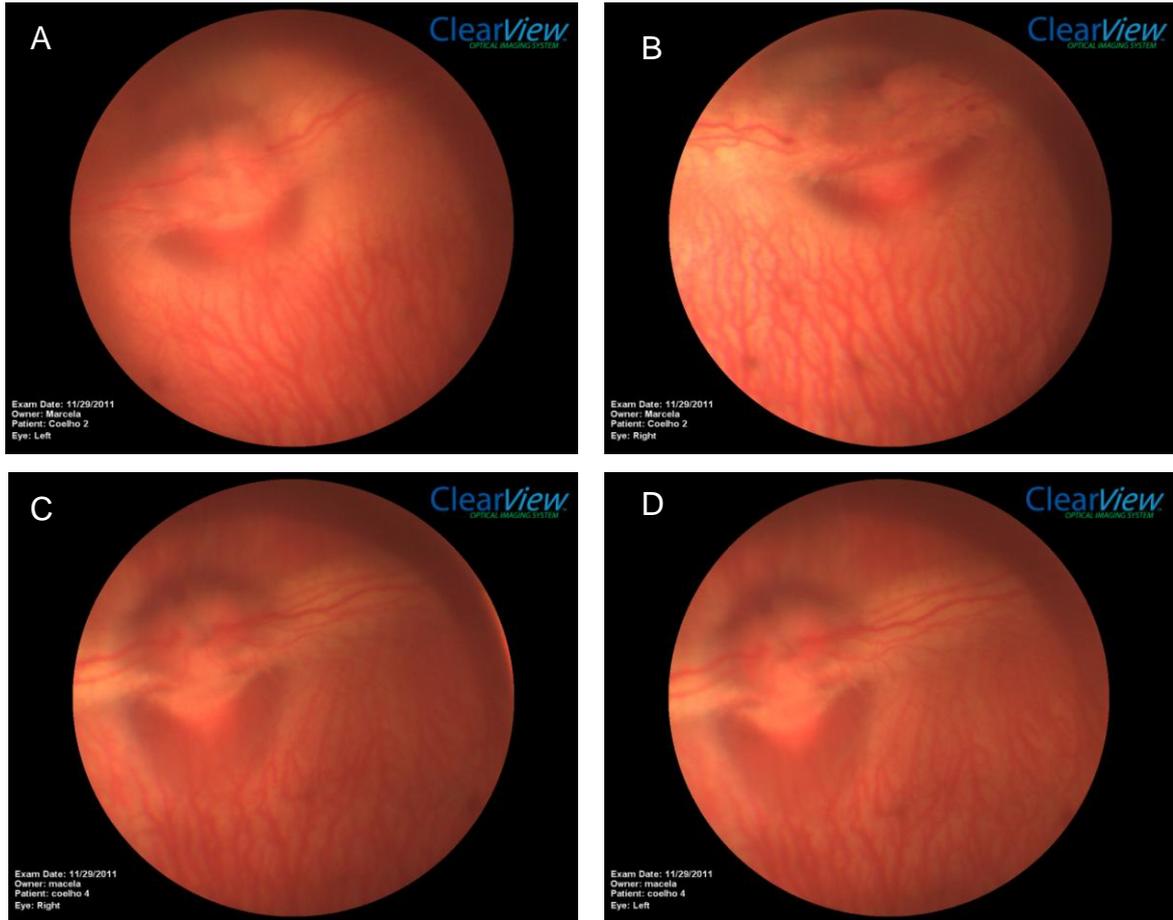


Figura 37 - Exame de fundo de olho em animais da 2ª semana do estudo (A e B) e da 6ª semana (C e D).

Na **Figura 38** pode-se verificar, para fins comparativos, como seriam os quadros de hemorragia retiniana e descolamento da retina.

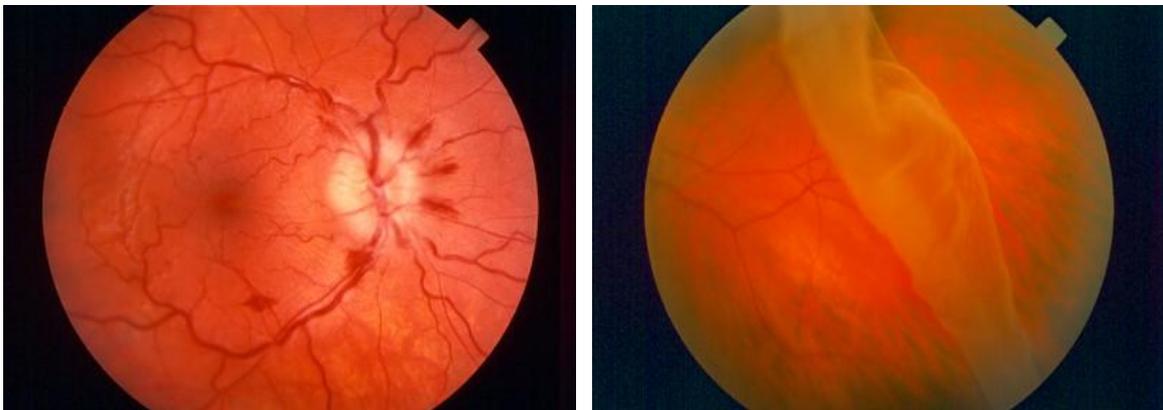


Figura 38 - Representação de hemorragia retiniana e descolamento da retina. Fonte: A - disponível em: <http://med.javeriana.edu.co/oftalmologia/materiales/sis/K64.jpg> e B - <http://www.postoconnorkadrmass.com/graphics/Graphic%209.jpg>.

Tabela 19 – Resultados dos exames clínicos inspeção ocular e oftalmoscopia binocular direta (n = 24).

Sinais clínicos / tempo (sem.)	0	1	2	3	4	5	6
Segmento anterior							
Hiperemia conjuntival	1/24 1-OE	0/24	0/24	1/24 1-OB	1/24 1-OB	0/24	2/24 1-OB 1-OD
Quemose	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Secreção ocular	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Ceratite ulcerativa	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Uveíte anterior	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Segmento posterior							
Liquefação vítrea	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Corioretinite	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Hemorragia na retina	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Descolamento de retina	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24

(Leve 1, moderada 2, grave 3); (Olho direito: OD; Olho esquerdo OE; Ambos os olhos OB);

2.2 Análise da concentração de FK506 liberada no humor vítreo

A concentração de FK506 encontrada no vítreo dos coelhos do grupo 1 durante o período de 6 semanas está apresentada na **Figura 39**.

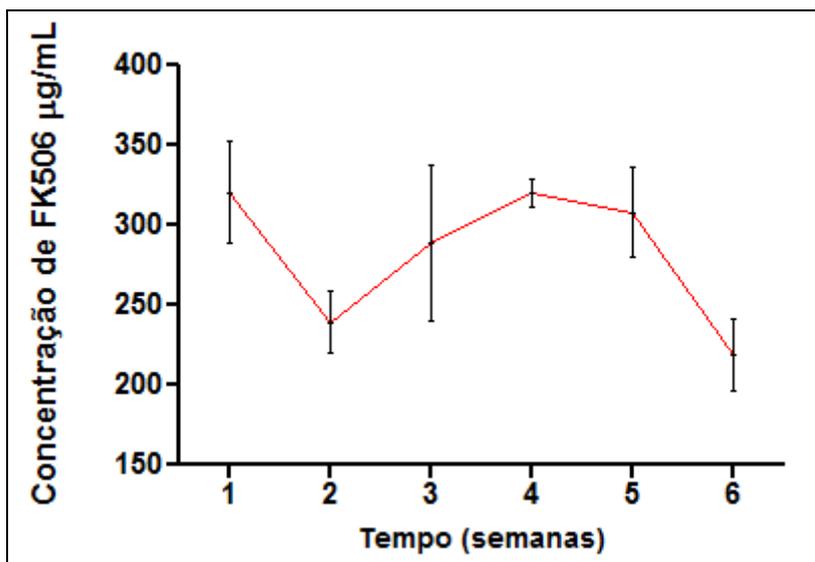


Figura 39 - Concentração de FK506 intravítrea liberada a partir dos implantes ao longo de 6 semanas do estudo (Os valores são representados como média \pm desvio padrão, n=4).

Os valores de concentração de FK506 encontrados no estudo de liberação *in vivo* são consistentes com um perfil de liberação trifásico (SILVA-CUNHA, 2005): um pico inicial, um segundo estágio entre a 2^a e a 4^a semana, provocado pela difusão do fármaco antes do início da erosão polimérica e um outro pico na 4^a semana. Os níveis de FK506 começam a reduzir após a 5^a semana.

Os implantes biodegradáveis desenvolvidos liberaram o FK506 *in vitro* por pelo menos seis semanas. Segundo Friedrich *et al.* (1997), poderia se esperar que a liberação do fármaco *in vivo* ocorresse em uma velocidade mais alta quando comparada ao estudo *in vitro*. Isto se deve ao fato de que o meio que circunda o implante no vítreo não representa o mesmo meio do estudo *in vitro* e nem o mesmo padrão de diluição (condição não-saturante) desse estudo. Além disso, as condições do meio que circunda o implante influenciam fortemente no perfil de liberação. O transporte do fármaco no vítreo e o seu perfil de eliminação do olho, não encontrados *in vitro*, contribuem para uma liberação mais rápida do fármaco. A natureza do meio e dos tecidos adjacentes que criam gradientes de concentração no vítreo devem ser considerados ao se desenvolver sistemas de liberação (FIALHO, 2006).

Cabe ressaltar que, logo na primeira semana do estudo mais que 99,0 % do fármaco foi liberado. Como já citado anteriormente, o FK506 é classe II na classificação biofarmacêutica, ou seja, possui alta permeabilidade em membranas biológicas (TAMURA *et al.*, 2001). Sugere-se que à medida que o fármaco foi sendo liberado dos implantes ele foi distribuído para os tecidos oculares adjacentes (retina e coróide) o que originou um gradiente de difusão do fármaco presente no dispositivo para o vítreo.

De acordo com Sakurai *et al.* (2003), as concentrações de FK506 necessárias para o controle de doenças oculares imuno-mediadas, como a uveíte, não são ainda estabelecidas. Contudo, a concentração sérica mínima de FK506 em pacientes transplantados se encontra entre 2,0 e 10,0 ng/mL. OH-I *et al.* (2007), demonstraram que o FK506, administrado por injeções intravítreas em níveis entre 2,3 e 3,2 ng em olhos de ratos foi suficiente para suprimir a uveorretinite nesses animais e além disso, a produção de INF- γ e TNF- α foi inibida nos olhos dos animais tratados quando comparado com o grupo controle. Teores de FK506 dentro desta faixa (2,3-3,2 ng) foram encontrados neste trabalho durante todo o período do estudo *in vivo*, o que mostra a viabilidade dos dispositivos desenvolvidos para o tratamento da uveíte. Entretanto, ocorreu uma liberação rápida do fármaco para o vítreo, o que demonstra a necessidade de melhorias na formulação a fim de se estender o tempo de liberação do fármaco.

3 CONCLUSÃO

Nesta parte do trabalho, o implante obtido não mostrou evidências de toxicidade ou opacidade dos meios oculares dos animais durante o período do estudo. Além disso, a partir dos dados encontrados na literatura, é possível sugerir que as concentrações do fármaco liberadas para o vítreo, são adequadas para o tratamento ou para a remissão dos sintomas da uveíte.

CONCLUSÃO

Inicialmente, foi desenvolvido um método analítico que se mostrou adequado para quantificação do FK506 nos implantes desenvolvidos e nas amostras dos estudos de liberação *in vitro* e *in vivo*.

Na etapa de desenvolvimento dos implantes, os resultados obtidos demonstraram a possibilidade de obtenção de implantes biodegradáveis para a liberação de FK506, com reprodutibilidade. O estudo de liberação *in vitro* mostrou que os implantes são adequados para a liberação prolongada do fármaco.

As técnicas de caracterização empregadas mostraram ausência de incompatibilidades e/ou interações entre o PLGA 75:25 e o FK506, fato que foi confirmado diante dos estudos de liberação *in vitro* e *in vivo* nos quais foi possível determinar o fármaco pelo método proposto .

No estudo de liberação *in vivo*, foi possível observar a liberação do fármaco no vítreo e em concentrações possivelmente adequadas para o tratamento ou para a remissão dos sintomas da uveíte. Neste mesmo estudo observou-se ausência de toxicidade do FK506 para os tecidos oculares avaliados. O sistema implantado não promoveu opacidade dos meios oculares.

Dessa forma o sistema desenvolvido pode apresentar-se como uma nova e promissora opção de tratamento para uveíte crônica.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretende-se: primeiro, melhorar o dispositivo em relação ao tempo de liberação do fármaco e segundo, avaliar a eficácia dos sistemas desenvolvidos neste trabalho em modelo de uveíte experimental induzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBATI, J.; ADAMIS A. P. Transscleral drug delivery to the retina and choroid. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.21 (2), p.145-51, 2002.

ARAUJO, A. A. S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M. S.; FILHO, M. S.; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International journal of pharmaceutics**, v.260, p.303-314, 2003.

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

BANNACH, G.; ALMEIDA, R. R.; LACERDA, G. L.; SCHNITZLER, E.; IONASHIRO, M. Thermal stability and thermal decomposition of sucralose. **Eclética Química**, v.34, p.21-26, 2009.

BARAR, J.; JAVADZADEH, A. R.; OMIDI, Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.5 p.567-581, 2008.

BOOTH, B. A.; VIDAL, D. L.; BOUHANIK, S.; JACOB, J.T.; HILL, J. M. Sustained-release ophthalmic drug delivery systems for treatment of macular disorders: present and future applications. **Drugs Aging**, v.24(7), p.581-602, 2007.

BOURGES, J.L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; FROUSSART, F.; BOCHOT, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, p.182-1202, 2006.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2003.

BRUNI, G.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.; COFRANCESCO, P.; BELLAZZI, G.; MARINI, A. Physico-chemical characterization of anhydrous D-mannitol. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.95(3), p.871-876, 2009.

CASPI, R. R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. **The journal of clinical investigation**, v.120 (9), p.3073-3083, 2010.

CASPI, R.R.; KUWABARA, T.; NUSSENBLATT, R.B. Characterization of a suppressor cell line which downgrades experimental autoimmune uveoretinitis in the rat. **The Journal of Immunology**, v.140, p.2579-2584, 1988.

CASTRO, A.P. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. **Jornal de Pediatria**, v.82(5), p.166-172, 2006.

CHOUHARY, A.; HARDING, S.P.; BUCKNALL, R. C.; PEARCE, I. Mycophenolate mofetil as an immunosuppressive agent in refractory inflammatory eye disease. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v.22, p.168-75, 2006.

COLTHURST, M. J.; WILLIAMS, R. L.; HISCOTT, P. S.; GRIERSON, I. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**, v.21, p.649-665, 2000.

COMMODARO, A. G., BUENO, V., BELFORT, R., & RIZZO, L. V. Autoimmune uveitis: the associated proinflammatory molecules and the search for immunoregulation. **Autoimmunity reviews**, v.10(4), p.205-209, 2011.

DANTAS, A. M. **Essencial em Oftalmologia**. Rio de Janeiro: Cultura médica, 2011.

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

DAVATCHI, F.; SHAMS, H.; REZAIPOOR, M.; SADEGHI-ABDOLLAHI, B.; SHAHRAM, F.; NADJI, A.; CHAMS-DAVATCHI, C.; AKHLAGHI, M.; FAEZI, T.; NADERI, N. Rituximab in intractable ocular lesions of Behcet's disease; randomized single-blind control study (pilot study). **International Journal of Rheumatic Diseases**, v.13, p.246-252, 2010.

DEUTER, C.M.; KOTTER, I.; GUNAYDIN I.; STUBIGER, N.; DOYCHEVA, D.G.; ZIERHUT, M. Efficacy and tolerability of interferon alpha treatment in patients with chronic cystoid macular edema due to non-infectious uveitis. **British Journal of Ophthalmology**, v.93, p.906-913, 2009.

DIMANTAS, M. A. P.; LOWDER, C.; MUCCIOLI, C. Uveítes anteriores associadas a doenças sistêmicas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, p235-238, 2003.

DONG, X. W.; SHI, G.; YUAN, L.; XIE, S.; WANG, P. L. Intravitreal implantation of the biodegradable cyclosporin A drug delivery system for experimental chronic uveitis. Journal: **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v.244, p.492-497, 2006.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara -Koogan, c1997. 663p.

EC (EUROPEAN COMMISSION). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L221/8.

FIALHO, S. L. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e implantes biodegradáveis para aplicação oftálmica. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2003. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

FIALHO, S. L. Desenvolvimento de implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular de corticóides. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)

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

FIALHO, S. L.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A. Biodegradable implants for ocular delivery of anti-inflammatory drug. **Journal of Drug Development Science and Technology**, v.17(1), p.93-97, 2007.

FRIEDRICH, S.; SAVILLE, B.; CHENG, Y. L. Drug distribution in the vitreous humor of the human eye: the effects of aphakia and changes in retinal permeability and vitreous diffusivity. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v.13(5), p.445-459, 1997.

GAUDANA, R.; ANANTHULA, H. K.; PARENKY, A.; MITRA, A. K. Ocular Drug Delivery. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v.12, (3), p.348-360, 2010.

GOODMAN E GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2006.

GRAJEWSKI, R. S.; SILVER, P. B.; AGARWAL, R. K.; SU, S.B.; CHAN, C. C.; LIOU, G.I. Endogenous IRBP can be dispensable for generation of natural CD4+CD25+ regulatory T cells that protect from IRBP-induced retinal autoimmunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v.203, p.851-856, 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. São Paulo: Elsevier, 2006.

HALE, S.; LIGHTMAN, S. Anti-TNF therapies in the management of acute and chronic uveitis. **Cytokine**, v.33, p.231-237, 2006.

HEEGAND, S. Morphology of the vitreoretinal bander region. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.222, p.1-31, 1997.

HEILIGENHAUS, A.; MISEROCCHI, E.; HEINZ, C.; GERLONI, V.; KOTANIEMI, K. Treatment of severe uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). **Rheumatology**, v.50(8), p.1390-1394, 2011.

HESSELINK, D.A.; BAARSMA, G.S.; KUIJPERS, R. W. A. M.; HAGEN, P. M. Experience with cyclosporine in endogenous uveitis posterior. **Transplantation Proceedings**, v.36, p.372-377, 2004.

HOGAN, A. C.; MCAVOY, C. E.; DICK, A. D.; LEE, R. W. J. Long-term efficacy and tolerance of tacrolimus for the treatment of uveitis. **Ophthalmology**, v.114, p.1000-1006, 2007.

HORWITZ, D. A; ZHENG, S. G.; GRAY, J. D. Natural and TGFbeta-induced Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. **Trends in Immunology**, v.29(9), p.429-435, 2008.

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

HUGHES, P. M.; OLEJNIK, O.; CHANG-LIN, J.; WILSON, C. G. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.2010-2032, 2005.

IMRIE, F. R.; DICK, A. D. Biologics in the treatment of uveitis. **Current Opinion in Ophthalmology**, v.18, p.481-486, 2007.

INTERNATIONAL UVEITIS STUDY GROUP. Definition and Clinical Classification of Uveitis. Disponível em <http://www.iusg.net/>, acesso: 25 de março de 2012.

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

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

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICK, A. W.; RHODES, C. T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24, p.703-27, 1998.

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

JOE, J. H.; LEE, W. M.; PARK, YJ.; JOE, K. H.; OH, D. H.; SEO, Y. G.; WOO, J. S.; YONG, C. S.; CHOI, HG. Effect of the solid-dispersion method on the solubility and crystalline property of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v.395, p.161-166, 2010.

JOSEPH, A.; RAJ, D.; SHANMUGANATHAN, V.; POWELL, R. J.; DUA, H. S. Tacrolimus immunosuppression in high-risk corneal grafts. **British Journal of Ophthalmology**, v.91(1), p.51-55, 2007.

KANE, F. E.; BURDAN, J.; CUTINO, A.; GREEN, K. E. IluvienTM: a new sustained delivery technology for posterior eye disease. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.5, p.1039-1046, 2008.

KEINO, H.; TAKEUCHI, M.; USUI, Y.; HATTORI, T.; YAMAKAWA, N.; KEZUKA, T. Supplementation of CD4+CD25+ regulatory T cells suppresses experimental autoimmune uveoretinitis. **British Journal of Ophthalmology** v. 91, p.105-110, 2007.

KILMARTIN, D. J.; FORRESTER, J.V.; DICK, A. D. Tacrolimus (FK506) in failed cyclosporin A therapy in endogenous posterior uveitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v.6, p.101-109, 1998.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica**, v.215, p.143-155, 2001.

KINO, T.; HATANAKA, H.; HASHIMOTO, M. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces: I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. **The Journal of Antibiotics**, v.40, p.1249-1255, 1987.

KOBAYASHI, C.; KANAI, A.; NAKAJIMA, A.; OKUMURA, K. Suppression of corneal graft rejection in rabbits by a new immunosuppressive agent, FK-506. **Transplantation Proceedings**, v.21, p.3156-3158, 1989.

KOTTER, I.; HAMURYUDAN, V.; OZTURK, Z. E.; YAZICI, H. Interferon therapy in rheumatic diseases: state-of-the-art 2010. **Current Opinion in Rheumatology**, v.22, p.278-283, 2010.

KUNO, N.; FUJII, S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date. **Drugs Aging**, v. 27, p.117-134, 2010.

KUPPERMANN, B. D; BLUMENKRANZ, M. S.; HALLER, J. A.; WILLIAMS, G. A.; WEINBERG, D. V.; CHOU, C.; WHITCUP, S. M. Randomized Controlled Study of an Intravitreal Dexamethasone Drug Delivery System in Patients With Persistent Macular Edema. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, p. 309-317, 2007.

LONDON, N. J. S.; RATHINAM, S. R.; CUNNINGHAM, E. T. The epidemiology of uveitis in developing countries. **International ophthalmology clinics**, v.50(2), p.1-17, 2010.

LOPEZ-GONZALEZ, R.; LOZA, E.; JOVER, J. A.; BENITEZ DEL CASTILLO, J. M.; MENDEZ, R.; HERNANDEZ-GARCIA, C.; PATO, E. Treatment of refractory posterior uveitis with infliximab: a 7-year follow-up study. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.38, p.58-62, 2009.

LLOYD, A. W.; FARAGHER, R. G. A.; DENYER, S. P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, Guilford, v. 22, p. 769-785, 2001.

MERCK. **The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. Rahway: John Wiley & Sons, 2006.

MIERKE, D. F.; SCHMIEDER, P.; KARUSO, P.; KESSELER, H. Conformational Analysis of the cis- and trans-Isomers of FK506 by NMR and Molecular Dynamics. **Helvetica Chimica Acta**, v.74 (5), p.1027–1047, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Uveítes Posteriores Não-Infeciosas**. Portaria SAS/MS n. 498, de 23 de abril de 2010.

MOCHIZUKI, M.; MASUDA, K.; SAKANE, T. A clinical trial of FK506 in refractory uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v.115, p.763-769, 1993.

MOYANO, M. A.; SIMIONATO, L. D.; PIZZORNO, M. T.; SEGALL, A. I. Validation of a liquid chromatographic method for determination of tacrolimus in pharmaceutical dosage forms. **Journal of AOAC International**, v.89 (6), p.1547-1551, 2006.

MUSCH, D. C.; MARTIN, D. F.; GORDON, J. F.; DAVIS, M. D.; KUPPERMANN, B. D. Treatment of cytomegalovirus retinitis with a sustained release ganciclovir implant. The Ganciclovir Implant Study Group. **New England Journal of Medicine**, v.337, p.83-90, 1997.

MURPHY, C. C.; GREINER, K.; PLSKOVA, J.; DUNCAN, L.; FROST, N. A.; FORRESTER, J. V.; DICK, A. D. Cyclosporine vs tacrolimus therapy for posterior and intermediate uveitis. **Archives of ophthalmology**, v.123, p.634-41, 2005.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymers Science**, v.32, p.762-798, 2007.

NAMIKI, Y.; KIHARA, N.; KODA, S.; HANE, K.; YASUDA, T. Tautomeric phenomenon of a novel potent immunosuppressant (FK506) in solution. I. Isolation and structures determination of tautomeric compounds. **The Journal of antibiotics**, v.46 (7), p.1149-1155, 1993.

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

OH-I, K.; KEINO, H.; GOTO, H.; YAMAKAWA, N.; MURASE, K.; USUI, Y.; KEZUKA, T.; SAKAI, J.; TAKEUCHI, M.; USUI, M. Intravitreal injection of Tacrolimus (FK506) suppresses ongoing experimental autoimmune uveoretinitis in Rats. **British Journal of Ophthalmology**, v.91, p.237-242, 2007a.

OH-I, K.; KEINO, H.; GOTO, H.; YAMAKAWA, N.; TAKEUCHI, M.; USUI, M.; IWASAKI, T. Upregulation of neurotrophic factor-related gene expression in retina with experimental autoimmune uveoretinitis by intravitreal injection of tacrolimus (FK506). **British Journal of Ophthalmology**, v.91, p.1537-1540, 2007b.

OKADA, A. A. The dream of biologics in uveitis. **Archives of Ophthalmology**, v.128, p.632-635, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química nova**, v. 34(7), p.1224-1230, 2011.

OLSEN, T.W.; EDELHAUSER, H.F.; LIM, J.I.; GEROSKI, D.H. Human scleral permeability. Effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.36, p. 1893-1903, 1995.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais, fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PAIRE, V.; LEBRETON, O.; WEBER, M. Effectiveness of interferon alpha in the treatment of uveitis macular edema refractory to corticosteroid and/or immunosuppressive treatment. **Journal francais d' ophtalmologie**, v.33, p. 152-162, 2010.

PETERS, D. H.; FITTON, A.; PLOSKER, G. L.; FAULDS, D. Tacrolimus: a review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. **Drugs**, v.46, p.746-794, 1993.

PEYMAN, G. A.; GANIBAN G. J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced drug delivery reviews**, v.16, p.107-123, 1995.

PLEYER, U.; LUTZ, S.; JUSKE, W. J.; NGUYEN, K. D.; NARAWANE, M. RÜCKERT, D.; MONDINO, B. J.; LEE, V. H.; NGUYEN, K. Ocular absorption of topically applied FK506 from liposomal and oil formulations in the rabbit eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.34, p.2737-2742, 1993.

POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, p.82-94, 2011.

PULIDO, J. S.; PULIDO, J. E.; MICHET, C. J.; VILE, R. G. More questions than answers: a call for a moratorium on the use of intravitreal infliximab outside of a well designed trial. **Retina**, v. 30, p. 1-5, 2010.

ROSEN, M. K.; STANDAERT, R. F.; GALAT, A.; NAKATSUKA, M.; SCHREIBER, S. L. Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: Twisted amide surrogate. **Science**, v.248 (4957), p.863-866, 1990.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.24, p.384-387, 2005.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. **International Reviews of Immunology**, v.24 (3-4), p.211-226, 2005.

SAKURAI, E.; NOZAKI, M.; OKADE, K.; KONU, N.; KIMURA, H.; OGURA, Y. Scleral plug of biodegradable polymers containing tacrolimus (FK506) for experimental uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.44, p.4845-4852, 2003.

SALIBA, J. Sistemas biodegradáveis de administração intra-ocular contendo ciclosporina (A) para tratamento da uveíte posterior. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2007. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

SCHULMAN, J. A.; LIANG, C.; KOORAGAYALA, L. M.; KING, J. Posterior segment complications in patients with hepatitis C treated with interferon and ribavirin. **Ophthalmology**, v.110, p.437-442, 2003.

SHAH, S. S.; DENHAM, L. V.; ELISON, J. R.; BHATTACHARJEE, P. S.; CLEMENT, C.; HUQ, T.; HILL, J. M. Drug delivery to the posterior segment of the eye for pharmacologic therapy. **Expert Review of Ophthalmology**, v.5 (1), p.75-93, 2010.

SHAW, K. T.; HO, A. M.; RAGHAVAN, A.; KIM, J.; JAIN, J.; PARK, J.; SHARMA, S.; RAO, A.; HOGAN, P. G. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells (cyclosporin A/FK506/nuclear translocation/DNA binding). **Cell Biology**, v.92, p.11205-11209, 1995.

SHIN, SB.; CHO, HY.; KIM, DD.; CHOI, HG.; LEE, YB. Preparation and evaluation of tacrolimus-loaded nanoparticles for lymphatic delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.74, p.164-171, 2010.

SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S. L. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended to intraocular application. **Drug Delivery**, v. 12(2), p.109-116, 2005.

SILVA, G. R.; FIALHO, S. L.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, p.585-595, 2010.

SLOPER, C. M.; POWELL, R. J.; DUA, H. S. Tacrolimus (FK506) in the treatment of posterior uveitis refractory to cyclosporine. **Ophthalmology**, v.106, p.723-728, 1999.

SMET, M. D.; TAYLOR, S. R. J.; BODAGHI, B.; MISEROCCHI, E.; MURRAY, P. I.; PLEYER, U.; ZIERHUT, M.; BARISANI-ASENBAUER, T.; LEHOANG, P.; LIGHTMAN, S. Understanding uveitis: The impact of research on visual outcomes. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.30, p.452-470, 2011.

SMITH, T. J.; PEARSON, P. A.; BLANDFORD, D. L.; BROWN, J. D.; GOINS, K. A.; HOLLINS, E. T.; SCHMEISSER, E. T.; GLAVINOS, P.; BALDWIN, L. B.; ASHTON, P. Intravitreal sustained-release ganciclovir. **Archives of Ophthalmology**, V.110(2), p.255-258, 1992.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOBACI, G.; ERDEM, U.; DURUKAN, A. H.; ERDURMAN, C.; BAYER, A.; KOKSAL, S.; KARAGUL, S.; BAYRAKTAR, M. Z. Safety and effectiveness of interferon alpha-2a in treatment of patients with Behcet's uveitis refractory to conventional treatments. **Ophthalmology**, v.117, p.1430-1435, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE OFTALMOLOGIA. O olho. Disponível em <http://www.sboportal.org.br>, acesso: 25 de março de 2012.

SOUZA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2007. **Tese** (Doutorado em Ciência de Alimentos).

SRIVASTAVA, A.; RAJAPPA, M.; KAUR, J. Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v.411 (17-18), p.1165-1171, 2010.

STUMPF, T.; LUQMANI, N.; SUMICH, P.; COOK, S.; TOLE, D. Systemic tacrolimus in the treatment of severe atopic keratoconjunctivitis. **Cornea**, v.25(10), p.1147-1149, 2006.

SUHLER, E. B.; SMITH, J. R.; GILES, T. R.; LAUER, A. K.; WERTHEIM, M. S.; KURZ, D. E.; KURZ, P. A.; LIM, L.; MACKENSEN, F.; PICKARD, T. D.; ROSENBAUM, J. T. Infliximab therapy for refractory uveitis: 2-year results of a prospective trial. **Archives of Ophthalmology**, v.127, p.819-822, 2009.

TAMURA, S.; OHIKE, A.; IBUKI, R.; AMIDON, G. L.; YAMASHITA, S. Tacrolimus is a class II low-solubility high-permeability drug: the effect of P-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.91 (3), p.719-729, 2001.

TANAKA, H.; KURODA, A.; MARUSAWA, H.; HATANAKA, H.; KINO, T.; GOTO, T.; HASHIMOTO, M. Structure of FK506: A Novel Immunosuppressant Isolated from *Streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109 (16), p.5031-5033, 1987.

TAPPEINER, C.; HEINZ, C.; SPECKER, C.; HEILIGENHAUS, A. Rituximab as a treatment option for refractory endogenous anterior uveitis. **Ophthalmic Research**, v.39, p.184-186, 2007.

TAYLOR, S. R.; SALAMA, A. D.; JOSHI, L.; PUSEY, C. D.; LIGHTMAN, S. L. Rituximab is effective in the treatment of refractory ophthalmic Wegener's granulomatosis. **Arthritis Rheumatism**, v.60, p.1540-1547, 2009.

THRIMAWITHANA, T. R.; YOUNG, S.; BUNT, C. R.; GREEN, C.; ALANY, R. G. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today**, v.16 (5/6), p.270-277, 2011.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, p.244-251, 2006.

TURGUT, B.; GULER, M.; AKPOLAT, N.; DEMIR, T.; CELIKER, U. The Impact of Tacrolimus on Vascular Endothelial Growth Factor in Experimental Corneal Neovascularization. **Current Eye Research**, v.36(1), p.34-40, 2011.

TURGUT, B.; UYAR, F.; USTUNDAG, B.; CELIKER, U.; AKPOLAT, N.; DEMIR, TAMER. The impact of tacrolimus on growth factors in experimental proliferative vitreoretinopathy. **Retina**, v.(32), p.232-241, 2012.

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

YUAN, J.; CHEN, JQ.; XIE, ZY.; ZHAI, JJ.; ZHOU, SY. Determination of tacrolimus in rabbit aqueous humor by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.868, p.34-41, 2008.

YANG, J.; LEE, CH.; PARK, J.; SEO, S.; LIM, EK.; SONG, Y. J.; SUH, JS.; YOON, HG.; HUH, YM.; HAAM, S. Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, p. 2695-2699, 2007.

YAMASHITA, K.; NAKATE, T.; OKIMOTO, K.; OHIKE, A.; TOKUNAGA, Y.; IBUKI, R.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v.267, p.79-91, 2003.

YASUKAWA T., KIMURA H., TABATA Y., OGURA Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 52, p. 25-36, 2001.

YASUKAWA, T., OGURA, Y., SAKURAI, E., TABATA, Y., KIMURA, H. Intraocular drug delivery using implantable polymeric devices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, p. 2033-2046, 2005.

YOSHINARI, T.; FORBES, R. T.; YORK, P.; KAWASHIMA, Y. Moisture induced polymorphic transition of mannitol and its morphological transformation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.247, p.69-77, 2002.

ZHAI, J.; GU, J.; YUAN, J.; CHEN, J. Tacrolimus in the Treatment of Ocular Diseases. **Biodrugs**, v.25 (2), p.89-103, 2011.

ZHANG, R.; HE, R.; QIAN, J.; GUO, J.; XUE, K.; YUAN, Y. F. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with intravitreal injection of tacrolimus (FK506) encapsulated in liposomes. **Investigative ophthalmology & visual science**, v.51, p.3575-82, 2010.

WALLEMACQ, P. E.; REDING, R. FK506 (Tacrolimus), A Novel Immunosuppressant in Organ Transplantation: Clinical, Biomedical, and Analytical Aspects. **Clinical chemistry**, v. 39(11), p. 2219-2228, 1993.

WARTY, V. S.; VENKATARAMANAN, R.; ZENDEHROUH, P.; MEHTA, S.; MCKAVENEY, T.; FLOWERS, J.; ZUCKERMAN, S.; KRAJAK, A.; ZEEVI, A.; FUNG, J.; TODO, S.; STARZL, T. E. Practical Aspects of FK 506 Analysis (Pittsburgh Experience). **Transplantation Proceedings**, v.23 (6), p.2730-2731, 1991.

WEIJTENS, O; SCHOEMAKER, R. C.; LENTJES, E. G.; ROMIJN, F. P.; COHEN, A. F.; VAN MEURS, J. C. Dexamethasone concentration in the subretinal fluid after a subconjunctival injection, a peribulbar injection, or an oral dose. **Ophthalmology**, v.107(10), p.1932-1938, 2000.

VAN DUYNE, G. D.; STANDAERT, R. F.; KARPLUS, P. A.; SCHREIBER, S. L.; CLARDY, J. Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. **Science**, v.252 (5007), p.839-842, 1991.

VIEIRA, L. C. Desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de ácido rosmarínico para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização: obtenção e caracterização dos sistemas. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2011. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

VENKATARAMANAN, R.; WATTY, V. S.; ZEMAITIS, M. A.; SANGHVI, A. T.; BURCKART, G. J.; SELTMAN, H.; TODO, S.; MAKOWKA, L.; STARZL, T.E. Biopharmaceutical Aspects of FK-506. **Transplantation Proceedings**, v.19 (5-6), p.30-35, 1987.

ANEXO A